Abstracts

Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 17. bis 19. Oktober 1991

Tagungsort
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Kommunikationszentrum

Organisatoren
K. Goerttler
K.-J. Hutter
S. Meuer
M. Stöhr

CHARACTERIZATION OF NEW MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED AGAINST SURFACE MOLECULES ON HUMAN $\gamma\delta^+$ T-CELLS

Ackermann, T., Bender, A., and Kabelitz, D.

Institute of Immunology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 305, 6900 Heidelberg, FRG

By immunizing mice with peripheral bood lymphocytes (PBL) from a patient with chronic T-cell leukemia of $\gamma\delta^+$ T-cell receptor (TCR) phenotype, we have produced two $\gamma\delta^+$ T-cell specific monoclonal antibodies (mAb) termed 18C2 and 23D12. Both antibodies react with PBL from the leukemic patient which express Vδ1 (mAbs A13$^+$ and δTCS1$^+$), but not Vδ2 (mAbs BB3$^-$, TiVδ2$^-$) or Vγ9 (mAbs 7A5$^-$, TiγA$^-$). Both mAbs recognize epitopes on some Vγ9$^-$ Vδ2$^-$ T-cell clones which do or do not express Vδ1. This reactivity pattern was observed on both resting and activated CD4$^-$ CD8$^-$ $\gamma\delta^+$ cells from peripheral blood or postnatal human thymus.
MAb 23D12 precipitates the TCR molecule from the surfaces of a 23D12$^+$ $\gamma\delta^+$ clone and from peripheral blood T-cells from the T-cell leukemia patient.
23D12$^+$ and 18C2$^+$ $\gamma\delta^+$ T-cell clones were used to test the functional properties of the respective mAb: both antibodies induce cytokine production (IL-2, IFN-γ, and TNF-α), autocrine proliferation and cytolysis of FcR-positive target cells. In the presence of exogenous IL-2 both antibodies induce cell death in preactivated $\gamma\delta$ clones, similarly to what has been described for anti-TCR antibodies.

Heterogene S-Phasezeiten in menschlichen Tumoren, gemessen mit der BrdU-Methode in Xenotransplantaten auf Nacktmauesen.

Heinz Baisch und Ullrich Otto

Institut fuer Biophysik und Strahlenbiologie, Urologische Klinik;
Universitaets Krankenhaus Eppendorf,
Martinistrasse 52, 2000 Hamburg 20

Menschliche Nieren- und Blasen-tumoren wurden auf Nacktmaeuse transplantiert. Ueber mehrere Passagen zeigten diese Tumoren ein stabiles Wachstumsverhalten. Wir haben Tumoren der gleichen Passage mit Hilfe der BrdU-Methode untersucht. Den Maeusen wurde 100 mg BrdU/kg Koerpergewicht injiziert und die Tumoren 1 bis 16 Stunden nach der BrdU Gabe entnommen. Die Tumorzellen wurden nach der Methode von Begg et al., Cytometry 6, 620(85) flusszytometrisch gemessen. Im Gegensatz zu Messungen an Zellkulturen liessen sich die relative movements als Funktion der Zeit nicht als Gerade darstellen, sondern hatten einen gekruemmten Verlauf. Insbesondere zeigte sich an den BrdU-Propidiumjodid Histogrammen, dass ein Teil der markierten Zellen deutlich langsamer durch die S-Phase hindurchlief als die Mehrheit. Mit der Annahme einer log-normalen Verteilung der S-Phase-Zeit liessen sich die relative movement Daten gut anpassen. Die verschiedenen Tumoren zeigten erhebliche Unterschiede in der Breite ihrer Verteilung der S-Phasezeit.

Characterization of respiratory burst activity in microglial cells as mediators of tissue destruction in the central nervous system

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

[1]Department of Neuromorphology, Max-Planck-Institute for Psychiatry, and [2]Cellular Biochemistry Group, Max-Planck-Institute for Biochemistry, D-8033 Martinsried, FRG

In the central nervous system macrophages are observed during inflammatory responses, in progressive neurological diseases like multiple sclerosis, brain trauma and after ischemia. When activated, microglial cells transform into macrophages and show a respiratory burst activity which exceeds that of peripheral macrophages. During pathological conditions they can, therefore, be regarded as a major source for reactive oxygen intermediates in the brain mediating tissue damage such as brain edema and ischemia-induced nerve cell death. Accordingly, one therapeutically aims at the prevention of neuronal damage by reducing free radicals, e.g. by scavengers or inhibitors of the production of reactive oxygen intermediates.

The purpose of the present investigation was to establish and compare defined experimental test systems for the study of respiratory burst activity in the brain. As modulators of respiratory burst activity adenosine or its analogues, that are discussed to exert a neuroprotective effect against ischemia-induced brain damage, were used. In one model the production of reactive oxygen intermediates in rat brain slices was measured indirectly by the determination of oxidated lipids. In a second model we measured reactive oxygen intermediates flow cytometrically in a defined glial element, i.e. isolated microglia. The respiratory burst activity was determined by measuring the intracellular oxidation of the membrane permeable and nonfluorescent dihydrorhodamine 123 (DHR) to the cationic and intracellularly trapped, green fluorescent rhodamine 123 in single viable cells.

Studies on rat hippocampal slices showed that adenosine or its analogues resulted in a decreased oxidation of lipids whereas the inhibition of adenosine or its analogues resulted in a Ca^{2+}-dependent increase of lipid peroxidation and increased neuronal cell death.

With our flow cytometrical assay we could confirm that microglia are glial elements of the brain responsible for the formation of reactive oxygen intermediates. In similarity to the results obtained from the brain slice assay, they are responsive to adenosine and its analogues which may, therefore, exert their neuroprotective action via the modulation of respiratory burst activity in microglia.

DNS-Flowzytometrische Befunde und Deletionen des Chromosoms 11 bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen

Barten M, Feichter G, Ludwig Ch, Dalquen P

Institute für Pathologie der Universität Rostock
Institut für Pathologie und Abteilung für Onkologie der Medizinischen Poliklinik , Kanonsspital, Universität Basel

Das Ziel der noch laufenden Studie an Bronchialkarzinomen mit bekanntem klinischem Verlauf, besteht in der Prüfung von Zusammenhängen zwischen DNS-durchflusszytometrischen Befunden und chromosomalen Aberrationen beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom. Die vorliegenden, vorläufigen Ergebnisse beziehen sich auf die ersten 51 ausgewerteten Fälle.

Die durchflsszytophotometrischen Untersuchungen wurden an Zellsuspensionen, die aus paraffineingebetteten Tumorproben hergestellt wurden, vorgenommen. Die Präparationsmethode wurde nach Hedley angewandt. Die Messungen wurden an einem PAS II-Gerät von PARTEC durchgeführt. Die Histogramme wurden mit Hilfe des MCYCLE-Programmes von Rabonovich ausgewertet. Die Deletion des Chromosom 11 wurde mit der southern blot-Technik nach DNS-Präparation aus tiefgefrorenen Tumor-proben nachgewiesen.

Die histologischen Karzinomtypen waren: 30 Plattenepithelkarzinome, 6 Adenokarzinome, 5 Alveolarzellkarzinome und 8 grosszellige Karzinome.
Von 51 flowzytometrisch untersuchten Tumoren zeigten 9 eine diploide, 25 eine und 17 mehrere aneuploide DNS-Stammlinien. Eine besondere Häufung in einem bestimmten DNS-Ploidiebereich wurde nicht beobachtet.

Bei 22 von 48 untersuchten Tumoren liess sich eine Deletion am Chromosom nachweisen. Bevorzugt traten Deletionen im Katalase und beta-FSH kodierten Genbereich (17 mal) und im Bereich des IGF-II Locus (5 mal) auf.

Erste Datenanalysen liessen keine Korrelation zwischen den DNS-zytometrischen Befunden und den beobachteten chromosomalen Deletionen erkennen.

Der CD3+CD4+CD7- Lymphozyt in der Lymphom-Diagnostik - flowzytometrische Charakterisierung dieses Zelltyps bei benignen und malignen Systemerkrankungen

Bauer R, Böhm I, Niedeckem HW, Kreysel HW

Universitäts-Hautklinik und Poliklinik Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
5300 Bonn 1
Tel.Nr.: 0228/280-2549
FAX-Nr.: 0228/280-3834

CD7 ist ein 40-kDa Membranpolypeptid, das auf reifen und unreifen T-Zellen exprimiert wird. Immunhistologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten den Verlust dieses Markers bei kutanen T-Zell-Lymphomen auf Lymphozyten mit cerebriformer Kernstruktur. Der Phänotyp CD3+CD4+CD7- gilt seither als Hinweis auf Sezary-Syndrom. Wir untersuchten flowzytometrisch die diagnostische Validität dieses Zelltyps bei 12 kutanen T-Zell-Lymphomen und verglichen sie mit 300 Analysen von Patienten mit benignen T-Zell-abhängigen Systemdermatosen (generalisierte atopische Dermatitis, Psoriasis vulgaris, Hyper-IgE-Syndrom, kutan-disseminierter Lupus erythematodes, Arzneimittelexanthem, nicht infektiöse Dermatosen bei HIV) und mit gesunden Probanden.
Unsere Analysen bestätigten den Verlust des CD7 Antigens auf T-Helfer-Zellen beim Sezary-Syndrom. Allerdings konnten wir bei benignen T-Zell-Prozessen und bei gesunden Probanden ebenfalls CD7 negative Lymphozyten ohne Sezary-Struktur nachweisen. Der physiologische CD4+CD7- Phänotyp unterschied sich in der CD4 Rezeptorendichte signifikant von CD4+CD7+ Lymphozyten. Kontrollen mit CD14 schlossen CD7 negative Monozyten im Lymphozyten-Gate aus. Physiologische CD4+CD7- Zellen wiesen eine geringere CD3+ Expression auf, exprimierten kein HLA-DR, zeigten anhand von CD29 das gleiche Verhältnis von naiven zu memory-T-Zellen wie CD4+CD7+ Lymphozyten und waren stets CD25 negativ. Ihre Zirkulation im peripheren Blut konnte durch alpha- oder gamma-Interferon im Gegensatz zu CD4+CD7+ Zellen nicht beeinflußt werden.
Der bei reaktiven, inflammatorischen Dermatosen charakterisierte Zelltyp CD4+CD7- kann flowzytometrisch exakt von der Sezary-Zelle mit gleicher Markerkonstellation anhand der CD4+ Expression unterschieden werden. Die Kenntnis einer physiologischen CD4+CD7- Zelle vermeidet flowzytometrische Fehldiagnosen. Funktion und Herkunft dieses bislang unbekannten Zelltyps sind noch unklar, werden aber derzeit untersucht.

MULTISCAN I: DESIGN AND FIRST RESULTS OF A NEW SLIT SCANNING FLOW CYTOMETER

Wolfgang Beisker, Stefan Müller, Eva Maria Weller, Michael Nüsse

GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung, 8042 Neuherberg, FRG

A dual laser high resolution confocal slit scanning instrument in epi-illumination technique has been developed for general use. Integral light parameters can be implemented as well. A high aperture objective with a numerical aperture of 1.20 (ZEISS Ultrafluar) is used for excitation and emission. The numerical aperture of the excitation beam can be controled by the laser optics in order to adapt the spatial resolution of the excitation. The lower limit of fluorescence detection (at 0.8 μm spatial resolution) has been found to be 200-300 molecules of FITC. Data acquisition can be done at a maximum rate at 40 MHz for up to 4 parameters or 20 MHz for up to eight parameters using 4 PC-Boards. Live display of scans as well as two 1d- and one 2d-histogram is possible for data rates of up to 200 scans per second.

An interactive data analysis software package (DAS V3.30, running on all IBM-compatible computers) has been developed for further data analysis including all needs of flow cytometry and other data analyses. Data formats can be 1d-histograms, 2d-histograms, list mode data files of up to 15 parameters and slit scanning data files of up to 8 parameters with a maximum of 1024 samples per scan and channel.

VERLAUFSKONTROLLE BEI AKUTEN LEUKÄMIEN ZUR ERFASSUNG MINIMALER RESTERKRANKUNGEN

D. Berchtold, J. Drach, H. Glassl, C. Gattringer, H. Huber

Univ. Klinik für Innere Medizin, Hämatologisch - Onkologische Abteilung
Anichstraße 35
A - 6020 Innsbruck
AUSTRIA

Der Nachweis einer minimalen Resterkrankung bei Akuten Leukämien nach immunzytologischen Kriterien ist schwierig, solange es keine leukämie-spezifischen Marker gibt, da pathologische Zellen von normalen Blasten besonders bei Knochenmarksregeneration nicht zu unterscheiden sind. Wir untersuchten die Zellen vor Therapiebeginn auf atypische Markerkoexpression und abnormen nukleären DNA-Gehalt und versuchten, sie damit durchflußzytometrisch so genau zu charakterisieren, daß auch minimale Zellzahlen eindeutig zu identifizieren sind. Dazu verwendeten wir bei der Erstuntersuchung ein breites Spektrum an Antikörpern,wodurch es uns in etwa der Hälfte aller Akuten Leukämien gelang, derartige leukämie-assoziierte Markerkombinationen bzw. DNA-Aneuploidien nachzuweisen, die wir in der Folge als Parameter für die Verlaufskontrollen heranziehen konnten. Diese Zelltypisierung ermöglichte es uns, auch Zellzahlen von 0,1% durchfluß-zytometrisch eindeutig nachzuweisen, was wir auch anhand von Verdünnungsexperimenten aufzeigen konnten.

Einfluß von Schwebstäuben auf die Ca^{2+}_i-Konzentration in Rinder-Alveolarmakrophagen

Berg, I., Schlüter, T., Gercken, G. & Tárnok, A.*

Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, und * ZMNH, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg, Universitätskrankenhaus Eppendorf

Verschiedene Schwebstäube (Durchmesser kleiner 4,0 µm) aus Müllverbrennungsanlagen, Elekrizitätswerken und Industrieanlagen beeinflussen in unterschiedlicher Weise die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in Rinder-Alveolarmakrophagen (Berg et al., J.Aerosol.Med., 4, 181, 1991). Das Schlüsselenzym dieser Reaktionen, die NADPH-Oxidase, soll über G-Proteine an den Phosphatidylinositol-Zyklus gekoppelt sein (Maridonneau-Porini et al., J.Immunol., 137, 2925, 1986). In diesem Zusammenhang wurden die Veränderungen der intrazellulären Calcium (Ca^{2+}_i) - Konzentration durch Schwebstäube untersucht.
Alveolarmakrophagen wurden durch bronchoalveolare Lavage gewonnen und über Dichtegradienten auf über 95 % angereichert. Die Ca^{2+}-Messung erfolgte mit dem Ca^{2+}-Indikator Indo1 am Durchflußzytometer. Suspensionen verschiedener Stäube wurden den Zellen zugegeben und Veränderungen des Calcium-Gehaltes bestimmt. Als ein Ergebnis konnte eine sukzessive Erhöhung des Ca^{2+}_i-Gehaltes nach Inkubationen mit Quarzstaub festgestellt werden. Über die Resultate mit weiteren Staubinkubationen wird berichtet.

Aktivitäts- und Zytotoxizitäts-assoziierte Marker während der HIV-Infektion

Böhm I, Bauer R, Müller C, Sandow U*, Kreysel HW

Universitäts-Hautklinik und Poliklinik Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
5300 Bonn 1
Tel.Nr.: 0228/280-2549
FAX-Nr.: 0228/280-3834
* Wissenschaftliches Institut der Ärzte Deutschland (WIAD e.V.)

Die fortschreitende CD4+ Defizienz während der HIV-Infektion ist das charakteristische und allgemein bekannte Phänomen der erworbenen Immunschwäche. An der CD4+ Zahl orientieren sich zunehmend Infektionsprophylaxe, Einsatz von Virustatika und prognostische Einschätzung des Krankheitsbildes.
Vor dem Hintergrund des komplexen immunologischen Netzwerkes haben wir flowzytometrisch bei 253 HIV-Patienten nach weiteren krankhheitstypischen Veränderungen zirkulierender mononukleärer Zellen gefahndet und diese Parameter über 2 Jahre verfolgt. Das Patientenkollektiv wurde nach Klinik und immunologischen Stadien klassiert. Wir bestimmten die Expression von CD3, CD4, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD19, CD25 und HLA-DR (monoklonale Antikörper der Fa. Becton Dickinson und Dianova) und werteten Prozent- und Absolutzahlen aus.
Wir konnten zeigen, daß 1. in allen HIV-Stadien T- Zellen des Phänotyps CD3+HLA-DR+ signifikant erhöht waren, 2. trotz hoher HLA-DR-Expression keine entsprechende Expression von CD25 auftrat, 3. die CD4+ Defizienz zunächst durch Abnahme der CD4+CD7+ Lymphozyten entstand und erst am Ende der Krankheit auch CD4+CD7- Zellen aus dem Blut verschwanden, 4. die Expansion von CD8+ Zellen ausschließlich den zytotoxischen Zelltyp CD3+CD8+CD11b- betraf und mit dem Auftreten der generalisierten Lymphadenopathie einherging, 5. in einem Teilkollektiv doppelt markierte CD4+CD8+ Lymphozyten bis zu 40% nachweisbar waren, 6. die Monozyten stadienabhängig eine erhöhte CD4 Dichte besaßen und 7. B-Lymphozyten trotz teilweise extremer Hypergammaglobulinämie nicht vermehrt zirkulierten. Der Vergleich von Klinik und immunphänotypischem Befund der Flowzytometrie in allen Stadien der HIV-Infektion über 2 Jahre muß unseres Erachtens dahingehend interpretiert werden, daß der Immundefekt des HIV-Patienten durch eine permanente Immunstimulation über lange Zeit entsteht. Die sich entwickelnde CD4+ Defizienz ist möglicherweise die Folge von Hyperaktivität und/oder Zytotoxizität im Rahmen eines autoimmunologischen Vorgangs während des langen Krankheitsverlaufs.

Interaction of fluorescence labeled LDL and HDL and FITC-LDL-receptor antibodies with human leukocytes as analyzed by flow cytometry

T. Brüning, E. Kovacs, S. Barlage, H. Hohage, G. Schmitz

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 1, D-8400 Regensburg

The flow cytometric measurement of lipoprotein receptors on human white blood cells allows the recognition of several lipid disorders including LDL-receptor defects causing familial hypercholesterolemia (FH) and abnormalities of the cellular processing of HDL found in HDL-deficiency syndromes such as Tangier disease, HDL-deficiency with xanthomas and LCAT-deficiency. Fluorescence labeled receptor-specific LDL- and HDL-subfractions separated by preparative isotachophoresis were used in ligand binding studies. Ligand binding at 4°C and receptor mediated endocytosis at 20°C or 37°C on leukocytes isolated from 8 ml of EDTA-blood was determined with receptor-specific DiI-LDL- and RITC-HDL-subclasses and with FITC-labeled receptor antibodoes. The analyses of LDL-receptors were done either with lymphocytes stimulated with phytohemagglutinine (PHA) or with monocytes preincubated with lipoprotein deficient serum. Hetero- and homozygous forms of FH could be detected on cells from patients with LDL-receptor deficiencies. The combined use of fluorescent LDL and LDL-receptor antibodies allows the discrimination of LDL-receptor deficiencies and internalization defects. In addition, the patient's own LDL can be checked for potential ligand defects in competition experiments using highly receptor-specific control DiI-LDL.

HDL-deficiency syndromes can be recognized by determination of HDL binding sites on monocytes or granulocytes of these patients. Using fast migrating RITC-HDL, a higher HDL binding activity was found in all analphalipiproteinemias analyzed. By measuring HDL binding activity under postprandial conditions, the hypercatabolic type of HDL-deficiency (Tangier disease) could be discriminated from the asynthetic type (HDL-deficiency with xanthomas). In addition to lipoprotein receptors, we analyzed in the HDL-deficient patients the expression of several membrane proteins responsible for adhesion, proliferation and inflammation. In HDL-deficiency with xanthomas a higher expression for adhesion molecules for endothelial cells (CD 11) was found, whereas in Tangier disease, which is associated with splenomegaly, inflammatory proteins (CD 58) and complement components (CD 35) showed an enhanced expression. These additional analyses of surface antigens offer new possibilities of a more detailed diagnosis of defects in lipid and lipoprotein metabolism.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE DIFFERENZIERUNG VON EINZELZELLPOPULATIONEN AUS TUMORGEWEBE: MODELLSYSTEM ZUR MARKIERUNG VON OBERFLÄCHENANTIGENEN UND ZUR DNA-BESTIMMUNG.

E. Busch, N. Moniwa , N. Harbeck, M. Schmitt, F. Jänicke, H. Höfler* und H. Graeff.
Frauenklinik und *Pathologisches Institut der Technischen Universität München.

Der durchflusszytometrischen DNA-Bestimmung und gleichzeitigen Markierung von Oberflächenantigenen an frischem Tumorgewebe sind durch die Technik der Gewebeaufarbeitung methodische Grenzen gesetzt. Wir haben eine Methode entwickelt, um natives Tumorgewebe ohne Zerstörung von Oberflächenantigenen und Zellrezeptoren in homogene Einzelzellsuspensionen aufzuarbeiten.
Zur Gewebeaufarbeitung wurden verschiedene Enzyme (Kollagenase II, Dispase, Pronase, Hyaluronidase, Trypsin) und entsprechende Enzymkombinationen ausgetestet. Der enzymatische Gewebeverdau ergab mit Kollagenase II (1 mg/ml, 440 U/mg) die besten Ergebnisse, dennoch wurde selbst hier eine teilweise Zerstörung von Oberflächenrezeptoren festgestellt. Ein mechanischer Gewebeaufschluß mit einer Ausbeute von ca. 10^7 Zellen / g Karzinomgewebe bei minimalem Zelldebris wurde deshalb bevorzugt. Zur Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen wurden folgende Antikörper eingesetzt: CD15 für Granulozyten, CD45RB für mononukleäre Zellen, anti-Fibroblast 5B5 für Fibroblasten (alle Antikörper von Dakopatts), anti-CA125 (Histocis) für Ovarkarzinomgewebe, sowie 12H12 bzw. 2E11 (Prof. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg) für Mammakarzinomgewebe. An einem Modellsystem aus Tumorzellinien (BT20, T47D), Zellen der peripheren Blutbahn sowie Fibroblasten wurde die Spezifität der Antikörper überprüft. Die Fixierung erfolgte mit 50% Ethanol, wobei die Einzelzellsuspensionen erst nach der spezifischen Antikörpermarkierung fixiert wurden. Danach wurden die Zellmembranen mit 0,05% NP-40 weitgehend ohne Veränderung der Reaktivität mit den spezifischen Antikörpern für eine simultane DNA-Bestimmung durchlässig gemacht.
So gelingt die schonende Aufarbeitung von nativem Tumorgewebe in Einzelzellsuspensionen und die exakte Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen durch einen Cocktail monoklonaler Antikörper. Dies ermöglicht die durchflusszytometrische DNA-Bestimmung sowie die gleichzeitige Messung von Oberflächenrezeptoren und -antigenen sowie intrazellulären Antigenen (z.B. Proteasen und deren Inhibitoren) spezifisch an Tumorzellen aus nativem Gewebe.

Analysis of cell cycle distribution by flow cytometry (FCM) and assessment of genotoxicity by alkaline elution in rat ovarian tumor cell lines sensitive (O-342) and resistant (O-342/DDP) to cisplatin (DDP) after treatment with DDP

G. CHEN[1], K.-J. HUTTER[2] and W. J. ZELLER[1]

1) Institute of Toxicology and Chemotherapy, and 2) Institute of Radiology and Pathophysiology, German Cancer Research Center, 6900 Heidelberg, FRG

DDP-sensitive and -resistant rat ovarian tumor cell lines were used to determine cell cycle distribution by FCM and assess DNA damage by alkaline elution. O-342/DDP cells displayed a near diploid karyotype (2n), while O-342 cells showed a multiploidy (2n and 4n) by FCM as we reported earlier. Following DDP exposure, O-342/DDP cells accumulated in S phase at 12 and 24 h, which reversed to untreated control level after further 24 h incubation (at 48 h); in O-342 cells, although the G_1 peak of the resistant subpopulation (2n) remained unchanged like the corresponding peak in O-342/DDP cells, the cell cycle was mostly disturbed at 12 h, which was partially released at 24 h and at 48 h after DDP treatment. The maximum of DDP-induced DNA interstrand crosslinks (ISCL), which were 8.5 fold higher in O-342 cells, occurred at 12 h post DDP treatment in both cell lines. At 24 h, 84% of DNA-ISCL in O-342/DDP cells and 28% in O-342 cells were repaired. On the other hand, DDP-induced DNA single strand breaks (SSB) predominantly occurred at 12 h in O-342/DDP cells and at 24 h in O-342 cells. Altogether, our results indicate:

(1) O-342 cells consist of two subpopulations with different DNA-contents, one sensitive and another resistant to DDP;

(2) the DDP sensitive fraction (higher mode) in O-342 cells may account for the 8.5 fold increase in DNA-ISCL in this line as assessed by alkaline elution;

(3) O-342/DDP cells can more quickly remove DNA-ISCL by DDP as compared with O-342 cells.

CELL CYCLE DISTRIBUTION OF AN OVARIAN CANCER ASSOCIATED ANTIGEN

W. E. Corver, 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.

For immuno-targeting of activated lymphocytes to tumour cells, monoclonal and bispecific monoclonal antibies are used. Killing of the tumour cells can depend on the availability of tumour associated surface antigens. A high and cell cycle independent expression of these target antigens is demanded. To elucidate antigen expression during the cell cycle, bivariate flow cytometry is applied on vitro cultured cell lines. Surface antigens are labeled with an direct or indirect immunofluorescence technique and propidium iodide is often used for DNA staining.

Now, with the aid of cell cycle specific monoclonal antibodies it is possible to discriminate between cycling and non-cycling cells. Applying a triple labeling technique we were able to analyse the expression of a tumour associated antigen, recognized by the monoclonal antibody OV632, during the cell cycle compartments on the ovarian tumour cell line OVCAR-3. The cell line was tested at logarithmic and stationary growth phases. Relative antigen densities were determined and corrected for the influence of cell diameter, which increases during DNA-replication until cell division. Our data show, that the surface antigen expression is almost unchanged during the G_1, S and G_2/M-phase, but is significantly decreased in a subpopulation of cells in the G_0/G_1-phase of the cell cycle. A large number of these cell also showed a relatively low PCNA expression, indicating a non-proliferative state of these cells. These data could implicate a low susceptibility of non-proliferative cells for immunotherapy and escape from immune attack during in vivo therapy with monoclonal and bispecific antibodies.

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF FLOW CYTOMETRIC DNA PLOIDY IN LUNG CANCER.

M. Danova[1], A. Paccagnella[4], R. Fiocca[2], M. Giordano[1], E. Ronchetti[3], F. Bosi[2], A. Favaretto[4], A. Riccardi[1], G. Mazzini[3].

[1]Department of Internal Medicine, 2nd Medical Clinic, [2] Department of Pathology, University and I.R.C.C.S. San Matteo, [3] Histochemistry Study Center C.N.R., Pavia; [4]Department of Oncology, Padova, ITALY.

Lung cancer is a heterogeneous disease comprising a wide spectrum of tumors with different biological, morphological and therapeutic hallmarks. Clinical criteria such as stage, age loss of weight and performance status have prognostic implications, but only indirectly reflect the biological properties of the tumor itself. Flow cytometry (FCM) provides a fast and precise method for the determination of DNA content in a large number of cells. Various solid tumors, including lung cancer, with a normal DNA content are associated with a more favorable prognosis than those with an abnormal DNA content. However, the clinical significance of the DNA content for determining the management of surgically treated patients is still unclear in primary lung cancer. In this study we evaluated the usefulness of FCM DNA ploidy (performed with a Partec PAS II arc lamp flow cytometer, Basel Switzerland) and as prognostic factors in a series of tumor samples from 117 patients (median age 62 yrs range 34 -76 yrs) with various type of lung cancer (46 small cell, 60 adenocarcinoma and 11 squamous cell carcinoma). When possible, examination was done in 2 - 3 different tumor samples and the accuracy of the FCM measurements was indicated by the coefficient of variation that was relatively low (mean 3.7, S.D. ± 0.7). Among the studied patients 67/117 (57.2%) patients were aneuploidy (all hyperdiploid with a median DNA index, DI =1.3). The relationship between flow cytometric DNA-ploidy and other prognostic factors such as histological type, clinical stage, patient sex and age with survival was then investigated. DNA-ploidy correlated with histological malignancy grading, since poorly differentiated non-small cell tumors were significantly ($p = 0.041$) more frequently aneuploid (around 30%) with respect to low grade astrocytomas (around 10%). Patients with DNA-aneuploid tumors (i.e. with $DI \neq 1.00$) survived for a shorter time (24.4 weeks) than patients with DNA diploid tumors (54.1 weeks) ($p < .001$). This difference was confirmed by Cox's multivariate analysis. Aneuploid tumors were associated with a worse survival ($p = .0002$) when compared with diploid tumors, resulting in a relative risk point estimate (RR) of 3.41, 95% confidence interval (C.I.) = 1.56-3.24. We therefore suggest that the flow cytometric measurement of DNA-ploidy has a relevant significance in predicting the survival in patients with lung cancer. Supported by C.N.R., by A.I.R.C. and by I.R.C.C.S. San Matteo.

DNA-zytometrische Hinweise bei Nierenzellkarzinomen auf Metastasierungstendenz

J.Dose, M.Kropff, Christiane Schröttle, A.Böcking, L.Füzesi

Institut für Pathologie, Neues Klinikum der RWTH, 5100 Aachen

Für die Therapie und insbesondere für die klinische Nachsorge bei Patienten mit Nierenzellkarzinom ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Patient Metastasen entwickelt, von entscheidender Bedeutung. Gesucht werden verläßliche Prognoseparameter, mit deren Hilfe eine klinische Nachsorge gezielter geplant werden kann.

Bei 34 Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom aus den Jahren 1979 bis 1989 wurde formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebeblöcke nach Zellvereinzelung und Feulgenfärbung mit einem TAS-plus TV-Bildanalysesystem (Leitz, Wetzlar) DNA-zytometrisch gemessen.

Wir konnten zeigen, daß die Häufigkeit von Fernmetastasen beim Nierenzellkarzinom nicht nur von der Primärtumorausdehnung (Stadiumeinteilung nach UICC), sondern auch vom DNA-Malignitätsgrad abhängig ist. Damit trägt der DNA-Malignitätsgrad zur besseren Abschätzung der Metastasierungstendenz bei Nierenzellkarzinomen bei.

Die Apoptose hämatopoetischer Zellen nach Wachstumsfaktor-Entzug ist mit Hilfe von DNA-Färbungen erkennbar.

Joachim Ellwart, Reinhard Mailhammer

GSF-Institut für Experimentelle Hämatologie, Marchioninistr. 25, 8000 München 70

Eine Reihe muriner, hämatopoetischer Zellinien wächst streng wachstumsfaktorabhängig. Der Faktorentzug führt zum programmierten Zelltod, der Apoptose. Die für die Apoptose typische DNA-Fragmentierung in Bruchstücke von ungefähr 200 Basenpaaren und Vielfachen davon wird mit der DNA-Gel-Elektrophorese nachgewiesen. In einigen der Zellinien beobachteten wir im DNA-Histogramm nach Wachstumsfaktorentzug das Auftreten eines zweiten G_1-Peaks. Ob wir DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, Propidium-Jodid oder Ethidium-Bromid zur DNA-Färbung verwendeten, spielte für das Erscheinen des zweiten Peaks keine Rolle. Die Fluoreszenzintensität dieses neuen Peaks betrug etwa die Hälfte der des G_1-Peaks. Zink, das die Endonukleasen blockiert und damit die Zerhackung der DNA verhindert, verhindert die Entstehung der apoptosetypischen DNA-Leiter auf dem Agarose-Gel und des zweiten Peaks im DNA-Histogramm. Den gleichen Effekt hat der Proteinsynthese-Hemmer Cycloheximid, das den aktiven Zelltod unterbindet. Wir sorteten vitale, gleichzeitig mit Hoechst 33342 und Propidium-Jodid gefärbte 32Dcl23 Zellen, denen der für sie notwendige Wachstumsfaktor IL-3 24 h lang entzogen wurde, nach blauen und gelben Fluoreszenzparametern. Bei absterbenden Zellen, die noch nicht mit Propidium-Jodid anfärbbar waren, trat die bekannte Verschiebung des Hoechst 33342-Emissionsspektrums zu den gelben Wellenlängen hin auf. Die gesorteten, vitalen, ungeshifteten Zellen zeigten im DNA Agarose-Gel undegradierte DNA, während die Zellen mit dem ins Gelbe geshifteten Emissionsspektrum, aber mit intakten Zellmembranen, nur degradierte DNA aufwiesen. Mit diesen Experimenten wurde gezeigt, daß die Zellen im fluoreszenzverminderten DNA-Peak bzw. die spektrumverschobenen Zellen eindeutig apoptotische Zellen sind.

FLUO-3 AS A USEFUL TOOL IN FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS FOR MEASUREMENT OF CYTOPLASMIC CALCIUM IN PMN

J. Elsner, J. Roesler, M.L. Lohmann-Matthes and A. Emmendörffer

Fraunhofer Institute ITA, Department of Immunobiology, Nikolai-Fuchs-Str.1, 3000 Hannover 61, FRG

The recently developed fluorescent Ca^{2+} indicator, fluo-3, was used to investigate the role of intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in different cells. The loading of the acetoxymethyl ester of fluo-3 (fluo-3 AM) into human polymorphonuclear leukocytes (PMN) and peripheral blood leukocytes (PBL) was performed. Calcium transients were investigated in PMN in response to FMLP, C5a and IL-8 using flow cytometry equipped with a 488 nm argon laser. The following results were found: 1) an increase of more than 200 arbitrary fluorescence units 5 sec upon stimulation, followed by a decrease of fluorescence within 60 sec to the basal level, 2) $[Ca^{2+}]_i$ changes in subpopulations in a mixture of PMN and PBL after stimulation with FMLP, 3) simultaneous measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in the green fluorescence (525 nm) and surface marker expression in the red fluorescence (585 nm) using an anti-CD16 phycoerythrin-conjugated antibody, 4) a different time course in Ca^{2+} mobilization of neutrophil subpopulations in response to FMLP, 5) the existence of two neutrophil subpopulations upon addition of low concentrations of IL-8, only one of them showed an increase in $[Ca^{2+}]_i$. These data demonstrate that fluo-3 is a useful tool to measure $[Ca^{2+}]_i$ using conventional flow cytometers to resolve changes in single cell $[Ca^{2+}]_i$ distribution.

Kinetik transfundierter neutrophiler Granulozyten in peripherem Blut und bronchoalveolärer Lavage eines Patienten mit X-chromosomal vererbter chronischer Granulomatose (CGD)

Emmendörffer, A., Lohmann-Matthes, M.-L., and Rösler, J.

Fraunhofer Institut, Abteilung Immunbiologie, Nikolai-Fuchs-Str. 1, 3000 Hannover 61

Patienten mit CGD haben ein erhöhtes Risiko, an rezidivierenden Infektionen verursacht durch Bakterien oder Pilze zu erkranken. In dem hier vorgestellten Fall wurde ein zweieinhalbjähriger Patient wegen einer Aspergillus Pneumonie mit Leukozytentransfusionen, Amphothericin B und IFN-gamma behandelt. Während einer vorübergehenden Phase künstlicher Beatmung untersuchten wir die Leukozyten des peripheren Bluts und der bronchoalveolären Lavage. Unter Verwedung durchflußzytometrischer Methoden konnten die neutrophilen Granulozyten des Patienten und die aus der Transfusion anhand der Expression von Cytochrom b558 (Moab 7D5) und der Produktion von Sauerstoffradikalen (DHR 123) deutlich unterschieden werden.
In beiden Kompartimenten konnten transfundierte Granulozyten gemessen und ihre Kinetik bis zu 24 Stunden verfolgt werden. Dabei bot die Durchflußzytometrie den Vorteil, daß selbst eine kleine Anzahl transfundierter Granulozyten erfaßt werden konnten, selbst zu Zeitpunkten extremer Leukozytose. Da funktionell intakte Granulozyten in der BAL nachgewiesen werden konnten, ist es durchaus denkbar, daß die Leukozytentransfusionen zu dem therapeutischen Erfolg der Gesamttherapie beigetragen haben.

Analyse von Granulozytenfunktionen im Rahmen verschiedener pädiatrischer Grunderkrankungen mit Hilfe der Durchflußzytometrie

Emmendörffer, A., Elsner, J., Breidenbach, T., Lohmann-Matthes, M.-L., und Rösler, J.

Fraunhofer Institut Hannover, Abt. Immunbiologie, Nikolai-Fuchs-Str. 1, w-3000 Hannover 61
Tel.: 0511/5350-290; Fax.: 0511/5350-155

Rezidivierende Infektionen, verursacht durch Bakterien, Pilze oder Hefen, stellen eine besondere Herausforderung an den behandelnden Arzt dar und erfordern eine intensive Diagnostik. Ziel der Maßnahmen ist, primäre Phagozytendefekte zu erkennen und die adäquate Therapie durchführen zu können. Unter Verwendung der Durchflußzytometrie wurden von uns Patienten mit folgenden Grunderkrankungen untersucht:
1. Chronische Granulomatose
2. Schwere connatale Neutropenie
3. Glykogenose Typ Ib
4. Patienten unter G-CSF Therapie im Rahmen von chemotherapeutischen Regimens

Durch Analyse von Granulozytenfunktionen, wie z.B. die Produktion von Sauerstoffradikalen (DHR 123) und die Messung der Calciumfreisetzung (Fluo-3), und die Bestimmung der Oberflächenrezeptoren konnten in den Fällen 1. und 3. verschiedene pathologische Subpopulationen der Granulozyten erkannt und in allen Fällen durch Zytokintherapie (IFNγ <1.> bzw. G-CSF <2.-4.>) bedingte Veränderungen des Aktivierungsgrads der Granulozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben werden. Als Marker für die Aktivierung der Granulozyten eigneten sich insbesondere die Expression von FcγRI, CD16, HLA-DR, CR3, CD14 und ICAM-1. Mit Ausnahmen von CD 16 werden diese Marker verstärkt auf den aktivierten Granulozyten der Patienten exprimiert. Zusammenfassend bietet die Durchflußzytometrie gerade bei der Diagnostik von möglichen Phagozytendefekten bei Kleinkindern die Möglichkeit, mit geringem Probenmaterial schnell eine zuverlässige Diagnose zu stellen bzw. den Einfluß der eingeleiteten Therapie auf die Granulozyten zu kontrollieren.

FLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER EXPRESSIONSMUSTER VON INTERMEDIÄR-FILAMENT-PROTEINEN IN NIERENZELLKARZINOMEN

Hans Fack[1], Heinz Baisch[1], Ullrich Otto[2]

Universitätskrankenhaus Eppendorf
Martinistraße 52
2000 HAMBURG 20

[1]) Institut für Biophysik und Strahlenbiologie
[2]) Urologische Klinik

Die cytoskeletalen Intermediär-Filamente (IF) stellen eine heterogene Gruppe von Proteinen dar. Ihre Expression ist abhängig vom Zelltyp und Differenzierungszustand der Zellen.
In unseren Untersuchungen bestimmten wir die IF-Expressionsmuster in Nierenzellkarzinomen (RCC) mit dem Ziel, die Expressionsmuster mit verschiedenen histologischen Differenzierungstypen (Grading nach Syrjänen und Hjeld) und eventuell vorhandenen heterogenen Subpopulationen der Karzinome zu korrelieren.
Für unsere Messungen standen uns 30 Nierenzellkarzinome (Primärtumoren und Metastasen) zur Verfügung, die unterschiedliche Differenzierungstypen repräsentieren. Von den 30 Karzinomen lagen 20 als serielle Xenotransplantate auf der nackten Maus (nu/nu; NMRI) vor, 3 als Zellkultur sowie als Xenotransplantat, 3 als Primärtumor und als Xenotransplantat und 4 allein als Primärtumor. Von den vorliegenden Tumoren wurden mechanisch Einzelzellsuspensionen hergestellt, die dann mit unterschiedlichen Antikörpern gegen diverse Intermediär-Filamente immunhistologisch markiert wurden, um anschließend flußzytometrisch gemessen zu werden, dabei wurde jeweils der Anteil an positiven Zellen kalkuliert.
Differenzierte Tumoren zeigten relativ einheitliche Muster, wohingegen undifferenzierte Tumoren eine größere Mustervielfalt aufwiesen. Dies deutet darauf hin, daß die IF-Expression ein differenzierungsabhängiges Charakteristikum dieser Tumoren ist. Die Quantifizierung der Inter- und Intra-Tumorheterogenität und die Korrelation von IF-Expressionsmustern zu spezifischen Differenzierungs- und Grading-Typen könnte als weiterer hilfreicher Parameter bei der Tumordiagnostik genutzt werden.

(Die Arbeit wurde von der DFG gefördert und ist ein Teil der Doktorarbeit von H.Fack am Fachbereich Zoologie der Universität Hamburg)

Zytogenetische Basis DNA-zytometrischer Malignitäts-Gradierung von Nierenzellkarzinomen

L. Füzesi, JU. Schaaf, Nadja Reichl, J. Dose, A.Böcking

Institut für Pathologie, Neues Klinikum der RWTH, 5100 Aachen

In dieser Studie wird eine Korrelation zwischen den numerischen bzw. selektiven chromosomalen Aberrationen und der DNA-zytometrisch erfassbaren Tumorprogression gezeigt. Weiterhin wird ein Modell der zytogenetischen Tumorprogression dargestellt.

In diesem Beitrag wird gezeigt, daß die Nierenzellkarzinome zwei zytogenetisch unabhängige Gruppen bilden. Die papillären Nierenzellkarzinome sind mit einer Trisomie 17 und Trisomie 7 und die klassischen klarzelligen Nierenzellkarzinome mit einer Deletion am kurzen Arm des Chromosoms 3 charakterisiert. Durch eine gleichzeitige zytogenetische und DNA-zytometrische Analyse können wir zeigen, daß die Nierenzellkarzinome unabhängig von den tumortypspezifischen chromosomalen Aberrationen eine gemeinsame zytogenetisch und DNA-zytometrisch erfassbare, schrittweise Tumorprogression vollziehen. Dieser Prozess beinhaltet einen selektiven, vom Tumortyp unabhängigen Chromosomenverlust und eine Polyploidisierung. Die wesentlichen Schritte dieses Geschehens lassen sich mithilfe der DNA-Zytometrie verfolgen.

A new flow cytometric method for immunophenotyping using silver enhanced 1 nanometer colloidal gold particles conjugated to monoclonal antibodies

Henk Garritsen[1], Ine Segers[2], Richard Doornbos[2], Bart de Grooth[2], Bernhard Wörmann[1], Wolfgang Hiddemann[1] and Jan Greve[2]

1 Dept. Int. Med. A, Westfälische Wilhelms Universität, Albert Schweitzerstr. 33, 4400 Münster
2 Cell Characterization Group, Dept. of Applied Physics, University of twente, Enschede, The Netherlands

Colloidal gold particles conjugated to monoclonal antibodies are excellent markers used in electron- and bright field microscopy. In this study we report the use of 1 nanometer colloidal gold particles as markers in flow cytometry.
Peripheral blood lymphocytes obtained after density gradient centrifugation (Ficoll Hypaque) were labeled with either anti-CD3 (Leu 4), anti-CD4 (Leu3) or anti-CD57 (Leu7). One nanometer colloidal gold conjugated to a goat anti mouse antibody (Auroprobe One GAM, Amersham) was used as a secondary antibody. Controls consisted of identical fluorescent labeled antibodies. We studied changes in the scattering properties of the colloidal gold labeled cells. The following scatter properties were investigated: forward scattering, axial Light loss, othogonal light scattering and orthogonal depolarized light scattering. Using one nanometer gold particles no differences could be found between labeled and unlabeled cells. We then developed a silver enhancement procedure for colloidal gold labeled cells in solution, in analogy to procedures used in bright field microscopy. Using this silver enhancement procedure we found extreme differences in some scatter parameters (orthogonal light scattering and orthogonal depolarized light scattering) between labeled and unlabeled cells. With these scattering differences immunophenotyping was possible (comparisson to fluorescent labeled antibodies $r^2 = 0.96$). Furthermore the changes in scattering properties of labeled cells could be observed using different wavelengths of incidence light (488nm,633 nm, 670nm and 780 nm) enabling immunophenotyping with diode lasers as sources of incidence light. Combining colloidal gold particles conjugated antibodies with fluorescent conjugated antibodies was also possible. In conclusion we feel that 1 nanometer colloidal gold particles combined with the developed silver enhancement procedure have a great potential as markers in flow cytometry.

Kinetik der Fluoreszenzmarkierung für die Durchflußzytophotometrie

Wolfgang Göhde*, Eva-Maria Schmidt**,
Wolfgang Göhde (jun.)***, Matthias Schliermann**,
* Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie - Radioonkologie der Universität Münster
** Partec GmbH, Münster
*** Physikalisches Institut der Universität Münster

Die Markierung von Zellbestandteilen mit fluoreszierenden Farbstoffen verläuft je nach Art der Bindung an das Zielmolekül mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Der Markierungsvorgang läßt sich mit Hilfe der Durchflußzytophotometrie verfolgen. Werden mehrere Fluorochrome gleichzeitig oder nacheinander eingesetzt,kann es zu beträchtlichen Interaktionen kommen. Ein Beispiel dafür ist der Energietransfer vom Mithramycin zu dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (Zante et al. 1976).

Mit Hilfe eines neuen List-Mode-Progamms, das es erlaubt, Messungen über Zeiträume bis zu 9 Stunden bei File-Größen die nur durch den Massenspeicher begrenzt sind, kontinuierlich auszuführen, wurde die zytochemische Interaktion von DAPI und Sulforhodamin (SR 101) an Ehrlich Ascites Tumorzellen getestet. Dapi und SR 101 wurden von Stöhr et al. (1973) zur simultanen Fluorochromierung der DNS und des Gesamtproteins eingeführt. Das Protein der Zellen färbt sich innerhalb von 12 min bis zu 90% des Maximums an, das dann erst innerhalb von einigen Stunden erreicht wird. Wird SR 101 zu DAPI-gefärbten Zellen zugefügt, nimmt die Intensität der DAPI-Fluoreszenz parallel zur Zunahme der SR-Fluoreszenz um 15% ab. Gleichzeitig kommt es zu einer deutlichen Abnahme des Variationskoeffizienten (CV).

Die Ergebnisse zeigen, daß Sulforhodamin solche Bindungsstellen des DAPI in den Zellen besetzt, die nicht DNA sind und daß DAPI vom SR 101 aus solchen unspezifischen Bindungstellen verdrängt wird.

Für die hochauflösende Durchflußzytophotometrie der DNS empfiehlt sich daher die Zugabe von Sulforhodamin.

Literatur:

Zante et al.: New Preparating and Staining Procedures for Specific and Rapid Analysis of DNA Distributions.
Pulse-Cytophotometry, 1976, 97-106.

Stöhr et al.: Extended application of flow microfluorometry by means of dual laser excitation.
Histochem 1977, 51, 305-313.

Einsatz zytometrischer Methoden bei der Reinigung und Charakterisierung peripherer Gliazellkulturen

R. Gold [1], G. Rothe [2], W.E.F. Klinkert[1]

[1] MPI für Psychiatrie, Abteilung Neuroimmunologie
[2] MPI für Biochemie, Arbeitsgruppe Zellbiochemie

Am Klopferspitz 18a, 8033 Planegg-Martinsried

Mechanismen der lokalen Antigenpräsentation im peripheren Nervensystem können in-vitro an Schwannzell(SC)-Kulturen untersucht werden. Da die aus neugeborenen Ratten präparierten Primärkulturen relativ stark durch Fibroblasten kontaminiert sind, müssen spezifische Reinigungsschritte durchgeführt werden um ein Überwachsen bzw. Störeinflüsse durch kontaminierende Zellen auszuschliessen. Dies wird über eine komplement-vermittelte Lyse mit polyklonalen Thy 1.1 Antiseren erreicht. Unser Ziel war die Etablierung durchflußzytometrischer Methoden zur Optimierung der Versuchsbedingungen des Zytotoxizitätsassays sowie zur quantitativen Charakterisierung der so gewonnenen SC-Kulturen .

Die Antigenbindungskapazität der polyklonalen Antiseren wurde durch indirekte Immunfluoreszenz in einer Verdünnungsreihe an Fibroblastenkulturen im Vergleich zu einem monoklonalen (nicht-komplementbindenden) Thy 1.1 Antikörper als Standard getestet. Die Komplementaktivierung wurde an Thymocyten von AKR Mäusen als homogene, in hohem Maße Thy 1.1 exprimierende Zellpopulation untersucht. Die Analyse des Zytotoxizitätsassays wurde am FACScan mit Carboxyflurosceindiacetat (CFDA) und Propidiumiodid (PI) als Marker zur Lebend/Tot-Unterscheidung durchgeführt. Mit einer Verdünnungsreihe des Antiserums beladene Thymocyten wurden bei Raumtemperatur mit Kaninchenkomplement und CFDA inkubiert. Die Reaktion wurde durch Verdünnung auf Eis effektiv abgebrochen und anschließend PI hinzugegeben. Durch diesen Versuchsansatz konnte eine spezische Toxizität über 95 % bei weniger als 5 % unspezifischer Toxizität erreicht werden.

Die Reinheit der Sekundärkulturen wurde durch Analyse von S-100 als zytoplasmatischer SC-Marker sowie von Thy 1.1 als Fibroblasten-Oberflächenmarker im Vergleich zu den Primärkulturen überprüft. Da S-100 ein sehr labiles, lösliches Antigen ist, wurden die Zellen zunächst mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Im Vergleich verschiedener Detergentien zur Permeabilisierung erwies sich 0.025 % Nonidet P 40 am geeignesten: bei hohem spezifischem S-100 Signal wurden die Scattercharakteristiken und die Homogenität der Zellpopulation nur geringfügig verändert .

So gereinigte SC-Kulturen wurden dann durch Aktivatoren der Adenylcyclase auch ohne Axonkontakt zur Differenzierung gebracht . Dies konnte durchflußzytometrisch durch Immunfärbung der zytoplasmatischen Myelinproteine nachgewiesen werden .

Zytometrische Analysen können bei der Reinigung und Charakterisierung von Gliazellkulturen vorteilhaft eingesetzt werden.

COMPARISON OF HELIUM CADMIUM AND ARGON UV-LASER EXCITATION FOR FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS

B. Goller, K. Bauer, C. Eichner, M.Kubbies

Department of Cell Biology, Research Center
Boehringer Mannheim GmbH, 8122 Penzberg

Several UV-excitable fluorochromes are unique in the flow cytometric performance for cell genetic and cell physiological studies. In order to circumvent the use of expensive ion argon lasers with UV-capability (351nm/364nm, 50mW) we used a multimode HeCd-laser (325nm, 30mW) for several flow cytometric UV-fluorochrome dependent experiments.

1. Three A-T specific DNA fluorochromes (DAPI, HOECHST 33258, HOECHST 33342) tested for cell cycle analysis in permeabilized and vital cells exhibit comparable CVs of the G_0/G_1 peak and cell cycle distribution.

2. Cell proliferation of lymphocytes stimulated with PHA was measured with the BrdU-Hoechst quenching technique. Excitation with the 325nm HeCd line showed normal cell cycle discrimination and better resolution of the first cell cycle.

3. Calcium studies were performed by loading the cells with Indo 1-AM and stimulation with anti-CD3. The Indo 1-ratio decreased slightly and the CV of the ratio histogram increased. However, still good results and discrimination of positive and negative cells were achieved using the HeCd laser.

4. Cellur glutathione content was measured via monochlorobimane. Better separation between positive and negative populations were given with the UV-argonlaser, but HeCd excitation gave satisfying results.

A major disadvantage using the multimode HeCd laser was the failure to obtain good forward scatter signals. However, improvement of scatter signal characteristics might be obtained using HeCd lasers in TEM_{00} mode.

In conclusion the HeCd laser might be a cheaper alternative for most flow cytometric applications requiring UV-exciable fluorochromes for cellular analysis.

SIMULTANEOUS USE OF FLUO-3 AND SHARF-1 TO STUDY CHANGES IN $[CA^{2+}]_i$ AND pH_i IN NATURAL KILLER CELLS AND TARGET CELLS DURING CYTOTOXIC INTERACTION.

Marja van Graft, Werner H. Koopman, Bart G. de Grooth, Jan Greve.

Department of Applied Physics, Cell Characterization Group, University of Twente, P.O. Box 217, 7500 AE ENSCHEDE, the Netherlands.

During cytotoxic interaction conjugates are formed between Natural Killer (NK) cells and Target cells (TC). The conjugated cells are tightly bound via membrane bound adhesion molecules. Upon binding the killing mechanism is triggered in the NK-cell. The TC is killed either by membrane perforation, or via triggering of the apoptosis mechanism. During the cytotoxic process the conjugated cells interact via membrane bound molecules leading to triggering of the intracellular signal transducing mechanism, presumably in both cells. Thus, changes can be expected in $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i in both NK-cells and TC.

A method is developed on an Argon ion laser equipped flow cytometer to:
1. distinguish populations of single cells (NK-cells, TC) and conjugates,
2. determine $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i in these cell populations.

$[Ca^{2+}]_i$ and pH_i can be measured using the fluorescent dyes Fluo-3 (ex. 490 nm; em. 525 nm) and SNARF-1 (ex. 490 nm; em. 580/645 nm), respectively. NK-cells and TC are separatedly loaden with either Fluo-3 or SNARF-1, mixed, and measured simultaneously. Based on the different emission spectra Fluo-3 loaden cells can be distinguished from SNARF-1 loaden cells. Double positive events are considered as to be conjugates between a Fluo-3 loaden cell and a SNARF-1 loaden cell.

Results show that both in NK-cells and TC the $[Ca^{2+}]_i$ increases upon conjugate formation. In NK-cells conjugate formation results in an increased pH_i. No significant pH_i changes have been observed in TC upon conjugate formation.

The role of flow cytometry and image processing in cytogenetics.

Daryll K. Green

MRC Human Genetics Unit
Western General Hospital
Crewe Road
Edinburgh EH4 2XU
Scotland

Chromosomes, which previously were individually karyotyped with a 600 G-band pattern have since that time been subjected to close scrutiny by cytometrists. Using the skills of microscopy, flow cytometry, molecular biology and gel electrophoresis the course resolution of 2-3Mbpairs associated with G-banding has been reduced by many orders of magnitude. The primary aim of many of the current studies is to establish how much of the genome is important to health and quality of life and where in the genome and in what form the important genes occur. Conventional transmission microscopy and fluorescence activated flow cytometry provide strong clues regarding the important areas of the genome through the observation and measurement of added, deleted or translocated DNA. Sorted chromosomes, cut with a whole range of restriction fragment length enzymes has provided thousands of chromosome specific DNA probes which have been painstakingly mapped to the genome and in many cases linked with inherited diseases. Amplification using unique or repeated areas of the genome by polymerase chain reaction (PCR) has given rise to a further set of DNA probes whose characteristics are carefully controlled by the researcher as oppose to the random nature of probes derived from DNA cut with restriction enzymes. Flow cytogenetics has been used for generating ALU-PCR chromosome painting probes for specific chromosomes. Image processing has been used for the measurement of fluorescently labelled metaphase chromosomes, probed and painted by *in-situ* hybridisation. Chromosome rearrangements, which are either inherited or induced by radiation damage can be readily identified by this approach.

Durchflußzytometrische Untersuchungen an Schilddrüsentumoren und kultivierten Schilddrüsentumorzellen

Daniela Grimm, F. Hofstädter, J. Bauer, Rita Menze, Pia Steinbach und Sigrid Meckl

Dr. Daniela Grimm
Institut für Pathologie
Universität Regensburg
Universitätsstr. 31
W-8400 Regensburg

Für viele klinisch-pathologische Fragestellungen in Bezug auf Schilddrüsentumore sind vor allem Differenzierungskriterien und Proliferationsverhalten sowohl in vivo, als auch in vitro von Bedeutung.
In dieser Studie wurden 20 Schilddrüsentumoren (2 follikuläre und 5 papilläre Schilddrüssenkarzinome sowie 13 follikuläre Schilddrüsenadenome) bezüglich ihres DNA-Gehaltes mittels Propidiumiodid-DNA-Färbung durchflußzytometrisch untersucht. Simultan wurde Cytokeratin mittels direkter Immunfluoreszenztechnik und Thyreoglobulin mit indirekter Immunfluoreszenzmethode am FACSCAN bestimmt. Papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome wiesen alle einen aneuploiden DNA-Gehalt auf, während alle benignen follikulären Schilddrüsenadenome einen diploiden DNA-Index besaßen. Die papillären Schilddrüsenkarzinome waren deutlich Cytokeratin-positiv und nur schwach positiv für Thyreoglobulin, während die follikulären Schilddrüsentumore vor allem Thyreoglobulin exprimierten und nur eine schwache Positivität für das Intermediärfilament Cytokeratin aufwiesen.
An der von uns etablierten Schilddrüsenkarzinomzellinie ONCO-DG1 wurde an exponentiellen und Plateau- Monolayerzellen sowie an multizellulären Tumorsphäroidzellen durch direkte Immunfluoreszenzfärbung mit dem Proliferations-assoziierten Antigen KI 67 der Anteil der proliferierenden Zellen durchflußzytometrisch bestimmt.
Die Anwendung von frischem Tumorgewebe und von kultivierten Tumorzellen erlaubt durchflußzytometrisch Multiparameteranalysen von Tumormarkern, Ploidie- und Proliferationsratenbestimmungen. Diese neue Methode liefert Informationen über das maligne Potential der Neoplasmen sowohl im Primärtumor, als auch in kultivierten Zellen.

DNA-DURCHFLUSSZYTOMETRIE BEIM PRIMÄREN MAMMAKARZINOM: EINE VERBESSERTE METHODE ZUR EXTRAKTION REINER ZELLKERNE AUS PARAFFINSCHNITTEN UND KORRELATION DER ERGEBNISSE ZU ANDEREN PROGNOSEFAKTOREN.

N. Harbeck, E. Busch, M. Moniwa, M. Schmitt, F. Jänicke, *C. Fellbaum, H. Höfler* und H. Graeff.
Frauenklinik und *Pathologisches Institut der Technischen Universität München.

Die Bedeutung von Ploidität und S-Phase beim primären Mammakarzinom wird widersprüchlich diskutiert, nicht zuletzt wegen unterschiedlicher Methoden bei Gewebeverarbeitung und durchflußzytometrischer Messung. Wir haben, ausgehend von Hedley's Methode (1983), eine verbesserte Technik zur Extraktion von reinen Zellkernen aus formalinfixierten Paraffinschnitten entwickelt: nach Entparaffinierung und Rehydrierung werden die 50 um Schnitte in 0.5% Pepsin (pH 1.5, 37 °C, 2h) inkubiert. Anschließend werden die Einzelkernsuspensionen gewaschen, filtriert und in PBS-EDTA mit 100 U/ml RNAse resuspendiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt mit Propidiumjodid. Formalinfixierte periphere humane Blutlymphozyten und Hühnererythrozyten werden als interne Standards parallel mit den Schnitten verarbeitet. Das Vorhandensein "nackter" Einzelkerne wird unter einem Laser-Scanning-Mikroskop kontrolliert. Die Messergebnisse sollten mit einem entsprechenden histologischen Korrelat (HE-Schnitt) verglichen werden.
Bei 155 primären Mammakarzinomen wurden Ploidität und S-Phase bestimmt. 40 Tumoren (26%) waren diploid und 115 aneuploid. Von 36 (90%) auswertbaren diploiden Tumoren hatten bei einem "Cutoff" von 5% (mediane S-Phase) 21 (58%) eine niedrige und 15 eine hohe S-Phase. Zwischen Ploidität, S-Phase und "klassischen" Prognosefaktoren bestand keine Korrelation. Nur Höhe der S-Phase und Östrogenrezeptorstatus waren invers korreliert: 84% der diploiden Tumoren mit niedriger S-Phase waren östrogenrezeptorpositiv, aber nur 53% derer mit hoher S-Phase. Patientinnen mit diploiden Tumoren und niedriger S-Phase hatten verglichen mit denen mit hoher S-Phase ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben. Gleiches galt für Patientinnen mit diploiden Tumoren verglichen mit denen mit aneuploiden Tumoren (19 Monate minimales medianes Follow-up). Um jedoch entgültige Aussagen über die klinische Bedeutung der durchflußzytometrischen DNA-Messung beim primären Mammakarzinom machen zu können, sind längere Nachbeobachtungszeiten und ein größeres Patientengut erforderlich.

Echtzeit-Analyse von Slit-Scan Profilen fluoreszenzgefärbter Chromosomen mit dem Personal Computer

Rainer Heilig[1], Michael Hausmann[1], Wim Rens[2], Jacob A. Aten[2], Christoph Cremer[1,3]

1 =Institut für Angewandte Physik der Universität,
Albert-Überle-Straße 3-5, W-6900 Heidelberg, BRD
2 =Laboratorium für Radiobiology, Gebouw F-0, AMC,
Meibergdreef 9, NL-1105 AZ Amsterdam, Niederlande
3 =Interdisziplinäres Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen (IWR) der Universität,
Im Neuenheimer Feld 368, W-6900 Heidelberg, BRD

Für die biologische Dosimetrie muß eine Vielzahl von Chromosomen auf Aberrationen hin untersucht werden. Dazu bietet die Slit-Scan Flußphotometrie eine geeignete Methode, da ca. 100 Chromosomenprofile pro Sekunde aufgenommen werden können. Hier wird die Echtzeit-Analyse dieser Profile vorgestellt:

Nach einer Voranalyse des Profils hinsichtlich Länge und Gesamtfluoreszenzintensität (Profilfläche) werden die Zentromerregionen gesucht, die sich durch signifikante Minima im Profil auszeichnen. Diese Minima werden durch die Untersuchung der Krümmungskurve ermittelt. Dazu werden Extremabereiche gemäß dem Vorzeichen der jeweiligen Krümmung definiert, worin die absoluten Extremwerte festgelegt werden. Anhand vier verschiedener Kriterien werden die Minima durch ein Schwellwertverfahren klassifiziert. Entsprechend der Anzahl gefundener Zentromere wird das Profil einem Nichtchromosom, einem normalen Chromosom oder einem di- bzw. multizentrischen Chromosom zugewiesen und gegebenenfalls der Zentromerindex berechnet.
Der Auswertealgorithmus wurde in Assembler für IBM-kompatible PC's geschrieben. Die Auswertung dauert im Schnitt 600 μs auf einem AT-386 (25 MHz ; cache-Speicher).

Durch die Anwendung von Zwei-Parameter Slit-Scan Flußphotometrie und der anschließenden Auswertung der aufgezeichneten Doppelprofile lassen sich auch Translokationen erkennen, die durch eine spezifische Markierung mittels in situ Hybridisierung in Suspension sichtbar gemacht werden.
Als Modell wurden Chromosomen einer Hamster-Mensch-Hybridzellinie mit menschlicher DNA hybridisiert, so daß neben den Humanchromosomen auch Interspeziestranslokationen detektiert werden konnten. Dabei wurden an die Hybridisierungsregionen FITC gebunden und das Chromosom mit PI bzw. DAPI gegengefärbt, so daß die Hamsterchromosomen nur für das PI/DAPI-Signal ein Profil ergaben, während Human- und Translokationschromosomen für beide Wellenlängen deutliche Profile zeigten.

EXPRESSION DES INTERZELLULÄREN ADHÄSIONSMOLEKÜLS 1 (ICAM-1) AUF BRONCHIALCARCINOMZELLINIEN: BEEINFLUSSUNG DURCH TUMORNEKROSE-FAKTOR-ALPHA (TNF-α)

J. Heymanns, C. Hennig, M. Rotsch und K. Havemann

Zentrum Innere Medizin, Abteilung Hämatologie/Onkologie/Immunologie, Philipps-Universität, 3550 Marburg

Tumorzellen verschiedener Gewebe exprimieren Antigene, die als Adhäsionsmoleküle für Tumorwachstum, Metastasierungsverhalten und für die immunologische Abwehr bedeutsam sein können. So konnte gezeigt werden, daß Zellinien des kleinzelligen Bronchialcarcinoms (SCLC) verschiedene Antigene des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) aufweisen, nichtkleinzellige Bronchialcarcinomzellinien (NSCLC) dagegen nicht (J.Heymanns et al., J Cancer Res Clin Oncol 117, Suppl S 11, 1991). Das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 (CD54) wird stark auf Gefäßendothelzellen sowie auf aktivierten T- und B-Zellen exprimiert und zeigt Homologien zu NCAM.
Wir untersuchten die Expression von ICAM-1 auf 21 Bronchialcarcinomzellinien (11 SCLC vom klassischen und varianten Subtyp, 10 NSCLC aller histologischen Typen). Während alle SCLC-Linien negativ waren, zeigten 8 von 10 NSCLC-Linien eine Markierung mit CD54, die in ihrem Ausmaß sehr unterschiedlich war: die stärkste Expression fand sich bei den 3 großzelligen Linien. Zwei von drei Adenocarcinomen waren negativ.
Da eine Zunahme der ICAM-1 Expression durch Zytokine wie IFN-τ, IL-1 oder TNF-α bekannt ist, untersuchten wir den Einfluß von TNF-α bei den NSCLC Linien. Die Ergebnisse zeigen bei allen 5 getesteten Linien eine deutliche Zunahme der ICAM-1 Expression (Inkubation 16 h mit TNF-α 10 ng/ml Medium), dabei ist diese Zunahme dosisabhängig, beginnend bei 0,1 ng/ml mit einem Maximum bei 10 ng/ml (Linie LCLC U-1810). Die Untersuchung der Kinetik der TNF-α Effekte bei der Linie U-1810 zeigte bei konstanter Dosis von 10 ng/ml eine Zunahme der ICAM-1 Expression bereits nach 2h Inkubation, ein Maximum wird nach 16h erreicht. Bei einem Entzug von TNF-α nach 16h Inkubation beginnt die Abnahme der ICAM-1 Expression bereits nach 8h und hat nach 72h noch nicht den Ausgangswert erreicht.

Praktikabilität der DNA-Zytophotometrie als Diagnosehilfe in der Zervixzytologie

M. Hilgarth, H. Lenzer und B. Großmann

Universitäts-Frauenklinik, Zytologisches Laboratorium
Hugstetterstr. 55, D-7800 Freiburg i.Br.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der DNA Einzelzell- Zytophotometrie eingesetzt um schwierige oder zweifelhafte zytologische Diagnosen zu überprüfen. An 81 Zervixabstrichen mit zweifelhaftem Befund (Gruppe III), die innerhalb eines 1/2 Jahres im Zytologischen Laboratorium der Universitäts-Frauenklinik Freiburg i.Br. anfielen, wurde mittels der DNA-Zytophotometrie der zweifelhafte Befund aufgelöst.

Besondere Schwerpunkte lagen auf dem zeitlichen Aufwand für Vorbereitung und Messung der Abstriche, Erfassen von Tendenzen bei nur wenig gemessenen Zellen, der Aussagekraft der Histogramme im Hinblick auf Übereinstimmung mit zytologischen, histologischen- oder klinischen Befunden. Weiterhin wurde eine kalkulatorische Berechnung der Kosten für die Bearbeitung der Präparate erstellt.

Diese Untersuchung stellt einen Beitrag zur Minimierung des subjektiven Untersucherfehlers dar. Sie dient der Objektivierbarkeit der zytologischen Diagnostik und eignet sich als Maßnahme zur Qualitätssicherung im Zytologischen Labor.

MACRO FLOW PLANKTOMETER – ein neues PC-gesteuertes Gerät zur Messung und Bilderfassung von Großplankton und Fischbrut im Durchfluß

R. Hüller, E. Gloßner, S. Schaub, V. Kachel

Max-Planck-Institut f. Biochemie
Arb.Gruppe Zellmeßtechnik
Am Klopferspitz
D-8033 Martinsried
Tel. 089/8578-2571
Fax 089/8578-3777

Die Untersuchung der taxonomischen Eigenschaften, Zustands- oder Wachstumsbedingungen von umfangreichen, lebenden Plankton- oder Fischlarvenpopulationen mit dem Lichtmikroskop oder durch Bildanalyse weist einige Nachteile auf. Diese bestehen vor allem in dem enormen Zeitaufwand für die Analysen, der ungenauen Bestimmung des dreidimensionalen Volumens sowie schwer zu quantifizierenden, nicht-morphologischen Eigenschaften wie zB. Magen- oder Pigment-Inhalten. Die Anwendung des Durchfluß-Meßprinzips auch auf solch relativ große Organismen ist geeignet, die genannten Probleme zu überwinden und neue Möglichkeiten der Analyse in der marinen Biologie zu eröffnen.

Das MACRO FLOW PLANKTOMETER stellt eine neue Entwicklung auf diesem Gebiet dar. Es ist als PC-gesteuertes Laborgerät für den Einsatz an Land und auch auf Forschungsschiffen konzipiert. Das Gerät basiert auf dem Meßverfahren nach Coulter und erlaubt daher die Volumenmessung von lebendem Plankton und Fischlarven in dem sie natürlich umgebenden Medium. In naher Zukunft wird darüber hinaus noch die gleichzeitige, laserangeregte Messung von Absorption und Fluoreszenz möglich sein. In Abhängigkeit der bis zu dreiparametrigen Messung kann noch im Durchfluß zusätzlich eine Bildaufnahme von ausgewählten Organismen mit besonders interessierenden Eigenschaften durchgeführt werden. Dabei dienen die Meßimpulse als Trigger für eine Blitzeinrichtung, in der ultrastarke Leuchtdioden für kurze Zeit (3 µs) mit hohen Strömen (7 A) belastet werden. Damit wird der aufzunehmende Organismus im Durchlicht belichtet und sein Absorptionsbild auf dem hochempfindlichen CCD-Sensor einer Videokamera erzeugt. Die Meßergebnisse und ausgewählte Bilder können im PC durch ein umfassendes Softwarepaket weiter analysiert und ausgewertet werden.

Das neue Meß-System wird vorgestellt und es werden Ergebnisse von Volumenmessungen und im Durchfluß erzeugte Bilder von Zooplankton (bis zu einer Größe von 1,5 mm), von Fischeiern (mit einem Durchmesser bis zu 3 mm) und von Fischlarven (mit einer Länge von bis zu 15 mm) gezeigt.

FLOWZYTOMETRISCHES SCREENING MIKROBIELLER KONTAMINATIONEN

Karl-Josef Hutter

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

In vielen Bereichen der pharmazeutischen Industrie oder der Getränke- und Lebensmitteltechnologie ist es eine zwingende ökonomische Notwendigkeit, Kontaminationen durch Mikroorganismen in einem möglichst frühen Stadium der Produktion - spätestens jedoch bei der Endproduktkontrolle - nachzuweisen. Mit Hilfe fluoreszenzoptischer Verfahren, wie der Fluoreszenzserologie und der Durchflußzytometrie, kann die Anzahl der Keime schnell in Suspension analysiert werden.

Ausgehend von der Tatsache, daß die Zahl der auftretenden Keime/Jahr unter gleichen Produktionsbedingungen relativ konstant ist, können gegen diese Bakterien- oder Hefekontaminationen Antikörper entwickelt werden. In der durchflußzytometrischen Analyse sind simultan verschiedene Spezies der Lactobacillaceae, Streptococceae und der Saccharomycetaceae nachzuweisen.

Flow cytometric analysis of cells undergoing apoptosis.

Ottmar Janssen, Sebastian Wesselborg and Dieter Kabelitz

Institute for Immunology, University of Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld 305, 6900 Heidelberg, FRG

We have recently described that i.) restimulation of clonal or polyclonal T cell populations by anti-receptor antibodies, ionomycin, staphylococcal enterotoxins, and phytohemagglutinine (PHA), and ii.) exposure of various non-transformed or transformed cell lines to extracts and purified lektin I of the european mistletoe both result in the induction of programmed cell death termed apoptosis.
Apoptosis is morphologically characterized by chromatin condensation and cleavage of genomic DNA to nucleosomal sized fragments of 200 base pairs and multiples. This cleavage is due to activation (or deactivation of a repressor) of Ca2+/Mg2+ dependent endonucleases.
However it proved to be difficult to analyze apoptosis in a given cell population, especially in terms of quantitation. We use three parameters to characterize this kind of cell death in cells growing in suspension culture. i.) Growth inhibition is measured by decrease in ^{3}H-thymidine-uptake. ii.) Cleavage of total genomic DNA is analyzed by electrophoresis and/or by a colorimetric DNA fragmentation assay. iii.) The percentage of cells undergoing apoptosis is quantitated using propidium iodide (PI) and FACS analysis.
We compare three methods of quantitation, namely measuremant of PI-cells directly after culture and quantitation of hypodiploid DNA in cells either fixed in cold ethanol or stained in a hypotonic citrate buffer.

EFFECTS OF RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE/MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR (GM-CSF) ON BLOOD CD 34-CELLS : STUDIES IN MULTIPLE MYELOMA (MM) PATIENTS

Andreas KIRSCH, Stefan SERKE, Dieter HUHN

Universitätsklinikum Rudolf Virchow-Charlottenburg
Abtlg. Innere Medizin und Poliklinik, Hämatologie-Onkologie, Freie Universität Berlin
Spandauer Damm 130 1000 Berlin 19 Germany

In order to evaluate feasibility of mobilization of blood CD34-cells in MM-patients on standard-chemotherapy, 7 patients with stage IIIa MM have been treated with melphalan plus prednisolone for 4 courses, with GM-CSF given in either courses 1+3, or in courses 2+4.
Monitoring of blood CD34-cells showed efficacy of GM-CSF, with 473 CD34-cells/ml (all courses with no GM-CSF) versus 7149 CD34-cells/ml (all courses with GM-CSF), p = 0.046. Phenotype of CD34-cells did not change with GM-CSF, neither with regard to coexpression of CD3-,CD13-, CD19-,CD33-,CD71- and HLA-DR-antigens, nor with regard to cell-cycle state, nor with regard to in vitro clonogenity. In conclusion, GM-CSF effectively increases circulating hemopoietic cells, enabling for harvest of blood stem cell grafts in multiple myeloma patients.

FLUOROGENE RHODAMIN-110- UND RHODOL-DERIVATE ZUR MESSUNG VON PROTEINASE- ODER GLYKOSIDASE-AKTIVITÄTEN IN LEBENDEN ZELLEN

S . Klingel, G. Rothe, Ch. Zirkelbach, G. Valet

Arbeitsgruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, W-8033 Martinsried,

Die Untersuchung spezifischer Enzymaktivitäten in lebenden Zellen ist zur Charakterisierung pathophysiologischer Vorgänge z.B. beim Abbau der Extrazellulärmatrix durch inflammatorische Zellen oder metastasierende Tumorzellen von großer Wichtigkeit. Enzyme können auch Marker für zelluläre Aktivierungs- oder Differenzierungsprozesse sein oder in Promotor-Studien als Reporteraktivität benutzt werden. Durchflußzytometrische Enzymaktivitätsmessungen sind mit den in biochemischen Küvettenansätzen üblichen Substraten (z.B. 4-Methoxy-2-naphthylamine oder 7-Amino-4-methyl-coumarine) schlecht durchführbar, da die UV-anregbaren Substrate bereits hohe Eigenfluoreszenz besitzen, die mit der nur um 40 - 60 nm kürzerwelligen Fluoreszenz der Reaktionsprodukte überlappt, und die Reaktionsprodukte außerdem schnell aus den Zellen herausdiffundieren. Die pH-Wert insensitive Fluoreszenz des 488-nm anregbaren Farbstoffs Rhodamin 110 (R110) läßt sich bei der Substratherstellung dagegen durch Substitution mit spezifisch abspaltbaren Gruppen vollständig auslöschen (Biochem. J. 209: 299-307, 1983). Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob Derivate des R110 oder verwandter Verbindungen als membrangängige Substrate zum Enzymnachweis in lebenden Zellen geeignet sind.

Durch symmetrische Substitution der beiden freien Aminogruppen des R110 mit *N*-terminal geblockten Peptiden gelang es, spezifische Substrate für die Endopeptidasen phagozytierender Zellen zu synthetisieren, die intralysosomal in einer zweistufigen Reaktion zu fluoreszentem R110 umgewandelt wurden. $(Z\text{-Phe-Arg})_2$-R110, $(Z\text{-Arg-Arg})_2$-R110 und $(Z\text{-Ala-Arg-Arg})_2$-R110 erwiesen sich als sensitive Substrate zur Messung der Cysteinproteinasen Cathepsin B und L von Monozyten und Makrophagen. Die Spezifität des intrazellulären Umsatzes konnte durch Hemmung mit dem spezifischen Inhibitor Z-Phe-Ala-CHN_2 nachgewiesen werden. Eine spezifische, d.h. DFP-hemmbare Messung der Serinproteinase Elastase in neutrophilen Granulozyten gelang mit $(Z\text{-Ala-Ala})_2$-R110.

Ausgehend vom Rhodol, das als Hybrid von Rhodamin 110 und Fluorescein eine freie Amino-Gruppe und eine freie Hydroxyl-Gruppe enthält, wurde versucht, in einer einstufigen Reaktion umwandelbare Substrate für Hydrolasen zu entwikkeln. Dies gelang durch spezifische Derivatisierung der NH_2- oder OH-Gruppe als Proteinase- oder Glykosidase/Esterase/Lipase-Substrat, während die andere Gruppe durch eine permanente Schutzgruppe (z.B. Tosyl für OH oder Benzoyl für NH_2) geblockt wurde. Die Fluoreszenz von bisubstituierten Substraten des Rhodols, wie *N*-(Z-Arg-Arg)-*O*-benzoyl-Rhodol, erwies sich als vollständig gequencht, während die spezifische intrazelluläre enzymatische Spaltung durch Cathepsin B und L in Monozyten ein fluoreszentes monosubstituiertes Reaktionsprodukt erzeugte.

Gefördert durch DFG SFB 207, Projekt G6.

Prognostische Einschätzung invasiver duktaler Karzinome der Mamma anhand klinikopathologischer und kernbildanalytischer Parameter

K.D. Kunze, F. Theissig, G. Haroske, V. Dimmer, W. Meyer

Institut für Pathologie
der Medizinischen Akademie Dresden
Fetscherstraße 74

O - 8019 Dresden

Die prognostische Bedeutung des Zellkernbildes wurde an Feulgen-gefärbten Paraffinschnitten von 187 invasiven duktalen Mammakarzinomen untersucht. Die Ergebnisse wurden mit verschiedenen klinikopathologischen Prognosefaktoren verglichen. Die statistische Bewertung erfolgte mit der multivariaten linearen Diskriminanzanalyse und der Cox'schen Regressionsanalyse. Mit klinikopathologischen Parametern läßt sich die Prognose mit einer Güte von 74,5 % vorhersagen. Mit Hilfe kernbildanalytischer Merkmale und verschiedener DNA-Parameter erzielt man eine Klassifikationsgüte von 85,5 %. Durch die Kombination der kernbildanalytischen Merkmale und der DNA-Parameter mit den klinikopathologischen Faktoren läßt sich das Klassifikationsergebnis für die Einschätzung der individuellen Prognose auf 90,9 % steigern. Von besonderem prognostischem Wert sind dabei zwei Chromatinstrukturmerkmale, der Lymphknotenstatus und der Histogrammtyp nach AUER.

Flowzytometrische DNA-Analyse von 157 Nierentumoren
Eine prospektive Studie

Th. Liedl, H. Cullmann, B. Liedl, D. Jocham*, A. Hofstetter

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

Im Zeitraum von 7/87 bis 11/90 konnten Operationspräparate von 157 Nierentumorpatienten flowzytometrisch auf ihren DNA-Gehalt untersucht werden. Proben aus zwei verschiedenen Tumorarealen wurden mit dem entsprechenden Normalgewebe verglichen. Die Präparation erfolgte nach der modifizierten Vindelovmethode: Die durch Enzym- und Detergenswirkung entstandene Kernsuspension wird mit Propidiumjodid als interkalierenden DNA-Farbstoff markiert.

Neben der - auch von anderen Arbeitsgruppen gefundenen - deutlichen Grading-Abhängigkeit der Aneuploidierate (G1:17% -> G3:74%) ergeben sich folgende Resultate:

1. Near-diploide Karzinome (DNA-Index 1,1 - 1,3) treten bei hohem, hypertetraploide (DI > 2,0) bei niedrigem Differenzierungsgrad gehäuft auf. Tripioide Tumorklone (DI 1,3 - 1,7) finden sich vermehrt in hohen Karzinomstadien.
2. Normales Nierengewebe weist eine Proliferation von im Mittel 6,3% auf. Mehr als 60% der euploiden Tumoren zeigen ein vom Normalgewebe unterschiedliches Proliferationsverhalten. Die durchschnittliche Tumorproliferation steigt in den höheren G- und T-Klassen bis auf 16% an.
3. Allein durch DNA-Analyse sind 75% der Nierentumoren sicher zu diagnostizieren. Mit genauer erfassung von Aneuploidie- und Proliferationsklassen läßt sich ein individueller Risikoscore für Patienten erstellen.

Da sich die flowzytometrische Kernpräparation als störungsarme, schnelle Labormethode etabliert hat und sich in einer ersten eigenen Nachbeobachtung deutliche Prognoseunterschiede zwischen den gebildeten Fallgruppen abzeichnen, wird die DNA-Analyse nun routinemäßig durchgeführt. Es ist beabsichtigt, die flowzytometrischen Resultate neben anderen klinischen Parametern als wesentliche Grundlage für eine Therapieentscheidung bei Nierentumorpatienten einzusetzen.

Technische und methodische Probleme der flowzytometrischen DNA-Analyse

Th. Liedl

Cytologisches Forschungslabor der Urologie
Klinikum Großhadern, Marchioninistraße 15, 8000 München 70

Die Urologie Großhadern befaßt sich seit über vier Jahren mit der DNA-Analyse urologischer Tumoren. In diesem Zeitraum wurden über 350 OP-Präparate der Niere und Prostata sowie mehr als 700 Blasenspülflüssigkeiten flowzytometrisch untersucht. Die Eignung für das klinische Routinelabor verlangt einen Kompromiß zwischen Zeit- und Kostenaufwand, Zuverlässigkeit und klinischer Aussagekraft.

Vier verschiedene **Präparationsmethoden** wurden einem langstreckigen Vergleich unterzogen. Die optimale Methode ist vom Ausgangsmaterial und Fragestellung abhängig: Für Tumorblöcke - prognostische Information - ist dies die Einparameter-DNA-Messung einer durch Detergens und Enzym gewonnenen Kernsuspension. Bei Blasenspülflüssigkeiten - diagnostische Aussage - hat sich die DNA/Cytokeratin-Doppelmarkierung intakter Zellen bewährt.

Die Wahl der richtigen **Reagenzien** für die Präparation ist von entscheidender Bedeutung: So können Fixative AK-Bindungsstellen verändern oder störende Autofluoreszenz hervorrufen. Die Wahl des DNA-Farbstoffes ist von der anregenden Lichtquelle und der Belegung des zweiten Fluoreszenzkanals abhängig. Ein Vergleich der Substanzen begründet die eigene Entscheidung für Methanol und Propidiumjodid.

Kleine, oft unbeachtete **Meßfehler** können die empfindliche DNA-Analyse einer Probe entwerten: Große Orifice, Klumpung, Probenshift und vieles mehr bilden die Ursache für artefiziell erhöhte Variationskoeffizienten, G2M-Phasen und Proliferationen. Es wird ein Ablaufplan vorgestellt, der diese Meßfehler auf ein Mindestmaß reduziert.

Die drei innerhalb des Cellfit-Programms (BD) angebotenen **Auswertealgorithmen** und die mögliche Background-Korrektur wurden auf ihre Zuverlässigkeit und klinische Aussagekraft überprüft.

Die vorgestellten standardisierten Präparations-, Meß- und Auswerteanleitungen zeichnen sich durch einfache, schnelle Handhabung aus und werden bereits in einigen anderen Kliniken mit Erfolg eingesetzt.

THE DETERMINATION OF PROTEIN, RNA AND DNA CONTENTS IN THE CELLS OF DIFFERENT PLOIDY

ERVAND S. MAITESIAN

CENTRE ANTOINE LACASSAGNE

36, VOIE ROMAINE NICE

06054 FRANCE

Using a combined cytochemical method that allows to determine protein, RNA, DNA and ^{3}H-thymidine label in the same cells, these macrocomponents were measured both in ^{3}H-thymidine marked and non-marked hepatocytes in the liver at the cancer. The total protein content after naphtol yellow S staining was measured on charted preparations of isolated hepatocytes. The RNA content in the same cells was measured after gallocyanin-chromalum staining. The total protein and RNA contents were measured using microscope-photometre IBAS (Opton, Germany) of the 490 and 546 nm accordingly. Then in these cells was measured the DNA content for determination of ploidy level after Feulgen reaction.

In the cells being in S-phase the protein and RNA content was lower by 30% than in cells of the same ploidy, but not incorporating ^{3}H-thymidine. It was shown that the total protein and RNA contents increased proportionally with increasing the cell ploidy at the cancer. It is proposed that the decrease in protein and RNA contents may be partly depend on energetic expences of that started DNA synthesis in the cells of same ploidy.

Veränderung des DNA-Histogramms durch Hl-Histon-Extraktion

M.Moustafa - W.Sachsse

Institut für Genetik, Arbeitsgruppe Cytogenetik
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Bei der mikrofluorometrischen Untersuchung auf ihren DNA-Gehalt zeigen Leberzellen höhere Fluoreszenzwerte als Thymuszellen vom selben Organismus. Dies basiert auf einer stärkeren Chromatin kondensation in den Thymuszellen im Vergleich zu der lockeren Chromatin der Leberzellen. Dadurch ergaben sich zweifelhafte DNA-Bestimmungen.
Mehrere Arbeitsgruppen haben versucht, durch RNase-Einwerung Lockerungen der Chromatinstruktur zu erreichen, ebenso durch saure Extraktion oder höhere Salzkonzentrationen, um dadurch vergleichbare mikrofluorometrische DNA-Messungen zu bekommen.
Wir haben die beiden letzteren Methoden in die Flow Cytometrie eingeführt, dafür wurde die DNA mit dem AT-spezifischen Fluro-chrom, Höchst 33258, gefärbt.
In diesem Versuch haben wir Goldhamsterzellen (Leber, Milz und Spermatozoen) verwendet.
Die saure Extraktion (PH2,5) führte zu einer höheren Fluoreszens-intensität als die 1M NaCl-Extraktion, bei gleicher Inkubations-zeit (15 Min.), dabei ist die relative DNA-Mengen dem Fluoroszens-intensität proportional dargestellt. Damit ist die Hl-Extraktion in Verbindung mit einem nicht interkalierenden Farbstoff für die flowcytometrische Untersuchung von Vorteil.

Endosomal pH Regulation and the Maturation Model for Lysosome Biogenesis

R.F.Murphy

Department of Biological Sciences & Center for Fluorescence Research in Biomedical Sciences Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA 15213/USA

We have used flow cytometry to demonstrate that endocytosed material destined for lysosomes undergoes a biphasic acidification, with a rapid initial acidification to pH 6 followed by a slower acidification to pH 5. Recent evidence from both *in vitro* and *in vivo* studies indicates that the difference in pH between early and late compartments is due to the action of the Na/K-ATPase. Evidence from a number of groups suggests that the initial site of exposure of endocytosed material to lysosomal enzymes is the early endosome. In view of this, we have previously suggested that the normal mechanism for production of lysosomes involves maturation rather than fusion with pre-existing lysosomes. A prediction of this model is that isolated endosomes should be capable of undergoing maturation to dense lysosomes *in vitro*. Confirming this prediction, we have shown that endosomes can undergo an ATP-dependent increase in buoyant density in the absence of dense lysosomes. Associated with this increase is a change in appearance of the endosomal fraction from electron-lucent to electron-dense. The density increase is inhibited by benzylamine, a membrane-soluble weak base which dissipates proton gradients, indicating that acidification of the endosome interior is required for maturation. We suggest that the removal of pH regulatory elements, such as the Na,K-ATPase, during recycling of receptors from early endosomes leads to progressive acidification and eventual formation of a dense lysosome. Additional evidence for the link between receptor recycling and lysosome biogenesis comes from studies of a Chinese hamster ovary cell line with a a pleiotropic, temperature-sensitive defect in receptor recycling. This cell line, TfT1.11, was isolated by fluorescence-activated cell sorting for retention of a pulse of labeled transferrin after an extended chase (hence the name Transferrin Trapping). TfT1.11 shows a block in the normal receptor recycling pathway at the non-permissive temperature. This block is also associated with an inability to transfer endocytosed material to dense lysosomes, as predicted by the maturation model. Flow cytometry and cell sorting have been of significant utility as a tool for analyzing the endocytic pathway in mammalian cells.

Ein einfacher Test zur quantitativen Analyse des oxidativen Burst im Vollblut per Durchflußzytometrie

Carl Thomas Nebe*, Karin Hartmann#, Michael Braun# und Christian Birr#

*Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinik Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 1, 8400 Regensburg

#ORPEGEN, Im Neuenheimer Feld 517 und Czernyring 22, 6900 Heidelberg

Für die Leukozyten-Funktionsdiagnostik wurde von uns ein Testkit entwickelt, das erstmals eine artefaktfreie und reproduzierbare Analyse des oxidativen Burst im Durchflußzytometer erlaubt. Dadurch wird der Test auch in der Routine einsetzbar. Die Untersuchung der Zellfunktion ist von elementarer Bedeutung für die Beurteilung des Immunstatus, da Schwankungen der Zellzahlen und Subsets in einem breiten Bereich unter Gesunden üblich sind und auf Einzelzellebene in keinem Zusammenhang mit ihrer Funktion stehen. So hat die Analyse des zellulären Immunstatus durch Phänotypisierung mit monoklonalen Antikörpern in den letzten Jahren trotz erheblicher Euphorie zu Beginn außer bei AIDS und wenigen anderen Immundefekten zu keinen verwertbaren Resultaten geführt.

Bisherige Publikationen verwenden sehr unterschiedliche Methoden zur Prüfung der Burstaktivität, denen eine Isolierung der Leukozyten vor Inkubationsbeginn gemeinsam ist. Dieses Vorgehen ist kaum reproduzierbar (wie auch die Dichtegradientenisolation der Lymphozyten) und schädigt in erster Linie die sehr sensiblen Granulozyten. Bei unserem Verfahren werden die Zellen erst auf Ihre Funktion geprüft und anschließend fixiert und die Erythrozyten lysiert, d.h. der erreichte Zustand "eingefroren". Die Fixierung wird erst durch einen an Zellinhaltsstoffe (Mitochondrien) bindenden Farbstoff (Rhodamin 123) möglich. Eine DNA-Färbung führt weiterhin zu einer Elimination von Streulichtartefakten. Mehrfachansätze zeigen sehr geringe Schwankungen (unter 5%). Die Einflußparameter des Tests (Validierungsdaten) werden vorgestellt. Die Verwendung einer low (chemotaktisches Peptid) und high Kontrolle (E.coli) erlaubt (im Gegensatz zu Immunkomplex-gebundenem Dichlorohydrofluorescein, H_2-DCF) die Untersuchung physiologischer Stimuli.

Es ergeben sich folgende Anwendungsgebiete:

1. Prüfung von Medikamenteneffekten in vitro und ex vivo (Hemmung und Verstärkung)
2. Aufdeckung von angeborenen und erworbenen Immundefekten der Phagozyten (v.a. Granulozytenfunktionsdefekte wie CGD)
3. Prognose des Krankheitsverlaufes z.B. bei Sepsispatienten

A computer program models selective endoreplication

Paul Neumann &
Helmut Zacharias

Zoologisches Institut der Universität, Biologiezentrum,
D-2300 Kiel 1

During endoreplication, different organisms in different taxa carry out DNA syntheses without nuclear divisions. The result of such endocycles is either a polyploid nucleus or a polytene architecture of the chromosomes. Since not all sequences of the genome may be reduplicated simultaneously and to the same extent, endocycles provide an opportunity for cell differentiation at the DNA level as a result of amplification or underreplication.

We have designed a numerical model which simulates differential endoreplications (1). The program SIMREP can be executed with MS-DOS. It uses diploid DNA contents derived from meiotic or mitotic nuclei together with data on DNA amounts present after a given number of endocycles. SIMREP can be applied to genomes containing arbitrary numbers of chromosomes (maximum 24) to model details of their replication behaviour.

The application of SIMREP will be demonstrated during the poster presentation. Options:

* Chromosome identification with an n = 6 karyotype (Drosophila hydei),
* Timing of underreplication in a unique chromosome (D. nasutoides),
* Underreplication of pericentrically dispersed heterochromatin (D. melanogaster),
* Sex chromsomes of a chironomid midge revealed by underreplication (Prodiamesa olivacea),
* Masking of differential replication in whole nuclei.

Reference:

(1) Zacharias H & Neumann P 1989,
Comput Methods Programs Biomed 28: 235-242.

The prognostic value of histopathological grading, DNA-index, and mean nuclear volume in cancer.

Karsten Nielsen[1], Jens Overgaard[2], Søren M. Bentzen[2], Eywin Bruun[3].

Institute of Pathology, Aalborg Hospital[1], Danish Cancer Society[2], Department of Experimental Clinical Oncology, and Department of Urology, Gentofte Hospital[3].

Seventy-five consecutive patients with prostatic cancer diagnosed between 1979 and 1983 were classified with respect to histological grade (according to Shelley), DNA-index (diploid and aneuploid), and mean nuclear volume (mnv) of the cancer cells. Nine patients were still alive at the time of analysis (minimum observation time 7.4 years). Univariate analyses showed that grade ($p = 0.004$), DNA-index ($p = 0.0002$), and mnv ($p = 0.009$) were all significantly associated with crude survival.

A Cox Proportional Hazards Model was used to analyze the prognostic value of the three malignancy measures and patients age. However, when the two strongest of these, grade ($p = 0.0025$) and DNA-index ($p = 0.0035$), were corrected for, age ($p = 0.07$) and mnv ($p = 0.22$) had no independent impact of crude survival.

Micronuclei Induced by the Tear Gas 2-Chlorobenzylidene Malonitrile (CS) Contain Single Chromosomes Demonstrated by the Combined Use of Flow Cytometry and Immunofluorescence Staining with Anti-Kinetochore Antibodies.

Michael Nüsse[+], Stefan Recknagel[#] and Wolfgang Beisker[+]

[+]GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung, AG Durchflußzytometrie
Ingolstädter Landstr. 1, 8042 Neuherberg, BRD
[#]Institut für Biophysik, Universität Frankfurt

The effects of the tear gas 2-chlorobenzylidene malonitrile (CS) on micronucleus induction and cell cycle progression were studied in Chinese hamster and Ehrlich ascites tumor cells using flow cytometric analysis of micronuclei and nuclei in suspension and immunofluorescence staining of kinetochores in micronuclei. In both cell lines CS induced a dose dependend inhibition of a fraction of cells in mitosis observed by simultaneous flow cytometric measurements of DNA content and side scatter intensities of cell nuclei. Micronucleus frequency increased during the delayed division of cells accumulated by CS in mitosis and reached a pleateau when most of these cells have divided. The height of this plateau depended on the concentration of CS in medium. Results obtained by flow cytometric analysis of the frequency of CS-induced micronuclei did not agree quantitatively with results obtained by microscopic analysis due to some cells showing CS-induced fragmented nuclei. Nearly all CS-induced micronuclei contained kinetochores, the majority of which (60 - 70%) showed one kinetochore per micronucleus demonstrating the presense of one distinct metaphase chromosome in these micronuclei. DNA distributions of micronuclei measured by flow cytometry showed pronounced peaks similar to the DNA distributions of chromosomes measured by flow karyotyping. Even micronuclei containing two of the large chromosomes could be observed as distinct peaks in the distributions. The combined results of flow cytometric analysis of micronucleus distributions and immunofluorescence staining of kinetochores in micronuclei show that CS damages the spindle fibers of single chromosomes during mitosis thus possibly leading to aneuploidy and polyploidy.

STUDYING BREAST CANCER WITH MULTIPARAMETRIC FLOW CYTOMETRY

M.G. ORMEROD, J.C. TITLEY, T.A.D. SMITH & I. FERNANDO

Institute of Cancer Research, CRC Laboratories, Sutton, SM2 5NG, England.

Several studies have now shown that tumour proliferation, as measured by the S phase fraction (SPF) of the cell cycle using DNA flow cytometry, is an indicator of poor prognosis. DNA ploidy is also a prognostic factor but is generally less useful. Flow cytometric measurement may soon become routine in the assessment of breast cancer.

To make an accurate estimation of SPF, the DNA histogram needs to be of high quality; careful attention must be paid to the method of cell/tissue preparation and storage. In diploid tumours, if possible, the malignant should be separated from the normal, stromal nuclei. In fresh biopsies, this can be done either physically or by using an epithelial specific marker - such as cytokeratin. In fixed tissue, light scatter should be used to discriminate between normal and malignant nuclei.

Our studies of a rat mammary tumour model have shown that SPF does not always reflect the true proliferative status of a tumour. A kinetic measurement, as is given by the flow cytometric deoxybromouridine/anti-BrdU method, is more informative. This is too complicated to be used routinely. The combination of a DNA measurement with that of a proliferation-associated nuclear antigen needs to be explored.

A fine needle aspirate of a breast tumour will usually yield sufficient cells for a DNA analysis. We have been using this method to monitor the effects of treating tumours prior to surgical removal and will report our preliminary results.

STUDYING APOPTOSIS BY FLOW CYTOMETRY

M.G. Ormerod, G. Rodriguez-Tarduchy and M. Collins
Institute of Cancer Research, The Haddow Laboratories, Cotswold Road, Sutton and The Chester Beatty Laboratories, Fulham Road, London.

Apoptosis is a form of programmed cell death distinct from necrosis. It is thought to be responsible for cell clearance in several physiological processes, such as embryogenesis and metamorphosis. At the molecular level it is characterised by cleavage of nuclear DNA at internucleosomal sites.

We have used flow cytometry to study an immortalised interleukin-3 (IL-3) dependent haemopoetic cell line which undergoes apoptosis when deprived of IL-3. Twelve hours after IL3 withdrawal, a conventional DNA histogram showed a sub-diploid DNA peak. Cells were sorted from this peak and from the normal G1 peak. Morphologically, the nuclei from the former were smaller and fragmented; electrophoresis of DNA from the sorted cells confirmed that this peak contained the apoptic cells.

Cultures undergoing apoptosis were also labelled without fixation by a brief incubation with the bis-benzimide, Hoechst 33342. The apoptic cells could be identified as a separate population which took up the dye faster. The advantage of this method is that it can be combined with measurements of other functional parameters - such as membrane potential. Cells can also be sorted for further biochemical studies.

This work was supported by the Cancer Research Campaign.

USING THE BRDU-HOECHST/PI METHOD TO STUDY CELL CYCLE KINETICS IN ASYNCHRONOUS CULTURES.

M.G. Ormerod and M. Kubbies, Boehringer Mannheim Research Center, Penzberg, FRG; Inst. Cancer Research, Sutton, Surrey, UK.

Flow cytometry of asynchronously proliferating cells continuously labelled with BrdU and stained with Hoechst/PI can reveal the proliferative history and the cell cycle status of cells in the G1, S and G2/M phases of their cycle. At least two complete cell cycles of proliferating cells can be displayed. In addition, cell cycle arrest in any of the phases of the cycle can be revealed without resort to complex analysis of exit kinetics. Like the S phase compartment in a conventional DNA histogram, the G1 and G2/M compartments of the 1st and 2nd cell cycles are stretched and resolved as a function of replicative history. Due to the gentle staining procedure, intra- and extracellular epitopes can be additionally stained with antibodies allowing a multi-parametric analysis of the cell kinetics of sub-populations (bone marrow) or gene-expression (induction of differentiation). All labelling procedures can be performed without significant loss of cells.

Genauigkeit und Auflösung der durchflußzytometrischen DNA-Messung

Friedrich J. Otto und Heidrun Lewalski

Fachklinik Hornheide, Experimentelle Tumorforschung,
Dorbaumstraße 300, 4400 Münster.
Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität
Bismarckstraße 16, 6300 Gießen

Die extreme Konstanz der zellulären DNA-Menge in Geweben und klonalen Zellpopulationen stellt eine Herausforderung für die Präparations- und Färbemethoden, insbesondere aber auch für die Meßtechnik dar. Zugleich bietet sie die Möglichkeit, die Meßgenauigkeit einzustellen und zu überprüfen.
An Beipielen von menschlichen Lymphozyten, Forellenerythrozyten, Säugetierspermien und Chromosomen wird die mit geeigneter Färbung und adäquater Instrumentierung erreichbare Meßgenauigkeit und Auflösung demonstriert. Als Vorbehandlung wird je nach Zelltyp eine Kernisolierung bzw. Kerndekondensation mit Hilfe von proteolytischen Enzymen oder Detergenzien durchgeführt. Für die spezifische und quantitative Anfärbung der DNA werden die Fluorochrome DAPI und Hoechst eingesetzt. Die erreichbaren Variationskoeffizienten liegen im Bereich von 0,6-0,8%.

Genetische Instabilität und Tumorprogression beim malignen Melanom

Friedrich J. Otto und Johannes Schumann

Fachklinik Hornheide
Abteilung für Experimentelle Tumorforschung
Dorbaumstraße 300
4400 Münster

Anhand sequentieller Bestimmungen des DNA-Index bei Patienten mit metastasierendem Melanom wurden die im Lauf der Tumorprogression auftretenden Ploidieänderungen studiert.
Es wurde eine Korrelation zwischen der Häufigkeit der Ploidieänderungen und der Überlebenszeit gefunden. Häufige Änderungen, die als Ausdruck genetischer Instabilität gewertet werden, gehen mit einer Verkürzung der Überlebenszeit einher und stellen somit einen prognostisch ungünstigen Faktor dar.
Die Ploidieänderungen zeigen Gesetzmäßigkeiten, die mit Veränderungen des Chromosomenbestandes erklärt werden können:
Bei diploiden oder nahe-diploiden Tumoren ist oftmals ein leichter Anstieg des DNA-Index zu beobachten, der als Vermehrung einzelner oder einiger weniger Chromosomen interpretiert werden kann.
Bei diploiden oder nahe-diploiden Tumoren ereignen sich außerdem große Sprünge des DNA-Index in den tetraploiden oder hypotetraploiden Bereich, die vermutlich durch Verdopplung des gesamten Chromosomensatzes und eventuell nachfolgenden Chromosomenverlust verursacht werden.
Bei tetraploiden oder hypotetraploiden Tumoren kommt es häufig zu einer geringen Abnahme des DNA-Index, die mit dem Verlust einzelner oder einiger weniger Chromosomen erklärt werden kann.
Die Vermutung, daß die von vielen Tumoren bekannte charakteristische Häufigkeitsverteilung der DNA-Indizes durch derartige Veränderungen des Chromosomenbestandes zustande kommt, wird durch diese Befunde beim malignen Melanom unterstützt.

Detection of virus infected leucocytes during lethal hog cholera virus (HCV) infection

T. Pauly, M. König, G. Unger, A. Saalmüller, and H.-J. Thiel

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

Hog cholera virus (HCV), a member of the genus pestivirus, is the causative agent of hog cholera, also known as classical or European swine fever. The disease is associated with fever and diarrhea and the terminal stage is signified by neurological symptoms and hemorrhages. Immunological implications, including a general leucopenia and a thymus atrophy during disease have been also described.

Recently developed monoclonal antibodies (mAb) against porcine leukocyte differentiation antigens and virus structural proteins allow the detection of changes in leucocyte subpopulations and determination of the phenotype of virus infected leucocytes. To study these parameters in the course of disease development, three-month-old outbred swine were infected with HCV and changes in leucocyte subpopulations and synthesis of viral proteins were monitored by three-color-flow cytometry.

Seven days after infection intracellular viral antigen can be detected in the monocyte population, whereas at the end-stage of disease (day 15 - 19) viral proteins are found in all leucocyte populations. The general leucopenia is primarily due to a dramatic depletion of the B-lymphocyte compartment.

Analyses of the T-lymphocyte population, which can be classified in swine regarding the expression of the differentiation antigens CD4 and CD8 into four subpopulations, reveal a decrease of the $CD4^-CD8^-$ γ/δ TcR T-lymphocyte subpopulation and a proportional increase of the $CD4^-CD8^+$ cytolytic T lymphocytes. Viral antigen can be detected in all of the four subpopulations.

The data show that HCV can infect cells of the peripheral blood leucocyte compartment and that the infection causes an immunological disorder in the leucocyte populations. This may play a key-role for the manifestation of the virus infection and the further development of the symptoms of disease.

CYTOMETRICAL CHARACTERIZATION OF THE MTC-CELL LINE AND ITS CLONES

R.PFRAGNER[1],F.TATZBER[2],P.PÜRSTNER[3],J.AUNER[3],A.MANDL[1], H.REICHL[4]

[1]Institute of Functional Pathology,
[2]Institute of Biochemistry,
[3]Dept.of Obstetrics and Gyecology;
University of Graz
[4]Hämosan GesmbH, Graz,Austria

Cells from the Medullary Thyroid Carcinoma-line MTC-SK were incubated with different culture media and supplements: Ham's F12 medium with addition of sex specific fetal calf serum or bovine allantoic fluid. Cytometrical analyses of cells revealed differences in proliferation capacity, cell bound protein, and estradiol- and progesterone-receptor expression, dependent on culture conditions. Furthermore cytometric DNA analysis (Flow-Cytometer Partec Pas II) showed different DNA-composition and duplication-rates, indicating at least two subpopulations of the MTC-SK cell line. In subcloning according to cytometric results we succeeded in establishing two types of stable subclones: MTC-SK/A showing diploid DNA distribution, and MTC-SK/B exhibiting aneuploid DNA-content.

BROMODEOXYURIDINE HYPERSENSITIVITY IN CULTURED METASTATIC MELANOMA CELLS

M. Poot, U. Bogdahn*, F.Otto** and H.Hoehn
Department of Human Genetics, University of Würzburg and *Neurological Clinic, 8700 Würzburg; **Department of Experimental Cancer Research, Fachklinik Hornheide, 4400 Münster.

To obtain a model system for testing the efficacy of chemotherapy approaches we established cell cultures from two brain and three lymphnode melanoma metastases. Their growth potential is analysed by continuously exposing cell cultures to bromodeoxyuridine (BrdU) and analysing them with bivariate Hoechst/ethidium bromide flow cytometry. Melanoma cell cultures exhibit a striking sensitivity to BrdU: at 5 % oxygen 50 % growth inihibition is obtained at 360 ± 130 uM BrdU (range 130 - 520; n = 11) vs 650 ± 50 uM BrdU in diploid human fibroblasts and 570 ± 20 uM BrdU in human lymphoid cell lines. BrdU-dependent growth inhibition is clearly oxygen sensitive in melanoma cell cultures (200 ± 55 uM BrdU; range 65 - 420; n = 11), but not in human diploid fibroblasts (600 ± 30 uM BrdU). Melanoma cell cultures also show high rates of spontaneous micronucleus formation (7.0 to 15.6 %; n = 1000 nuclei per assay; 4 different lines assayed), which is only slightly increased when BrdU is added to the culture medium. BrdU is a clinical radiosensitizer, which enhances the sensitivity of cultured cells to bleomycin, cisplatin, chlorambucil and the superoxide generator paraquat. We recommend the testing of BrdU in chemotherapy protocols for metastatic melanoma.

Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft grant SFB 172/project A7 to MP.

IMPAIRED DNA TOPOISOMERASE II ACTIVITY IS NOT THE WERNER SYNDROME GENE DEFECT

Martin Poot, Holger Hoehn and George M. Martin*
Department of Human Genetics, University of Würzburg, Germany and Department of Pathology, University of Washington, Seattle, U.S.A.

Werner syndrome (WS) is an autosomal recessive disorder characterized by signs of accelerated aging: greying and loss of hair, arteriosclerosis, diabetes, osteoporosis, hypogonadism, neoplasia, premature cataract and atrophy and sub-cutaneous lesions of the skin (hypoplasia of subcutaneous fat, particularly in the lower extremities). Cultured fibroblasts from WS exhibit variegated translocation mosaicism and elevated spontaneous mutation rates. A defect in DNA topoisomerase II has been invoked to explain the WS phenotype. To test this hypothesis we employed a highly informative flow cytometric method for cell cycle kinetics; the method involves continuous labeling of lymphoid cell lines (LCL) from WS patients and healthy probands with bromodeoxyuridine and subsequent bivariate Hoechst/ethidium bromide flow cytometry. This method allows to analyse the minimal duration of the G1, S and G2 compartment of three succesive cell cycles together with the fraction of cells permanently arrested in each compartment. WS-derived lymphoid cells exhibit a prolonged S phase duration (8.7 ± 0.6 hrs. in 4 WS patients vs 6.1 ± 0.2 hrs in 5 healthy probands) and an elevated S phase arrest (5.4 ± 0.4 % of cells vs 1.3 ± 0.7 % in 5 healthy probands). In contrast, the DNA topoisomerase II inhibitor m-AMSA caused a prolonged S, G2 and G1 transit together with an elevated arrest of cells in the S and G2 phase. These data do not support a putative defect in DNA topoisomerase II as the prime cause of perturbed cell proliferation in WS cells.

Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft grant SFB 172/project A7 to MP.

Cytometric and Molecular Analysis of Rare Cells

Andreas Radbruch, Sigrid Irlenbusch, Christof Göttlinger

Institute for Genetics
University of Cologne
Weyertal 121

The analysis of rare cells still is a challenge for flow cytometry. In serial analysis it is time consuming and inaccurate because of population-overlap. Nevertheless, in investigations e.g. of the immune system, reactive cells are often rare but of interest. We describe usage of the magnetic cells sorter MACS and the fluorescence-activated cell sorter FACS for positive enrichment of rare cells for immunofluorescent and molecular analysis.

This general method is exemplified for the analysis of IgA1 B lymphocytes from peripheral blood. This subset of activated B cells has undergone immunoglobulin class switching, expressing now IgA1 instead of IgM on the cell surface, most cells presumably being memory B cells. We have analysed these cells for immunophenotype and for molecular rearrangements of the immunoglobulin genes. All of the cells had performed switch recombination, directed mostly to IgA1 on both chromosomes. This shows (a) that immunoglobulin class switching has an irreversible molecular basis, and (b) that switch recombination is directed to distinct immunoglobulin classes, presumably by external stimuli like cytokines. Both informations are of utmost importance for the development of therapeutic strategies against immunodysregulatory diseases, involving class switching, e.g. allergy.

Untersuchungen zum Einfluß von Pentoxifyllin auf die durch Zytokine induzierte Modulation von Oberflächenrezeptoren auf Granulozyten

Raeder, E., Elsner, J., Lohmann-Matthes, M.-L., und Emmendörffer, A.

Fraunhofer Institut Hannover, Abt. Immunbiologie, Nikolai-Fuchs-Str. 1, 3000 Hannover 61

Da von Pentoxifyllin (PTX) bekannt ist, daß es den Effekt von Tumor Nekrosis Faktor alpha auf Granulozyten supprimiert und z.B. zu einer Reduktion der Adhärenz von Granulozyten an Nylonfasern führt, untersuchten wir den Einfluß von PTX auf die Wirkung anderer bekannter Granulozyten aktivierender Zytokine. Da sowohl IFN-gamma als auch GM-CSF Granulozytenfunktionen beeinflussen, wurden Granulozyten mit diesen Zytokinen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von PTX inkubiert. Analysiert wurden die Fähigkeit, Sauerstoffradikale zu bilden, und die Modulation der Oberflächenrezeptoren. Folgende Resultate konnten wir beobachteten: 1.) PTX inhibierte die IFN-gamma bedingte Steigerung der FcγRI, ICAM-1, HLA-DR und CR3 Expression.
2.) PTX unterdrückte die GM-CSF induzierte Heraufregulation von CR3 und ICAM-1.
3.) PTX verhinderte die Downregulation von C5a (IFNγ und GM-CSF) und von CD 16 (GM-CSF).
4.) Die Produktion von Sauerstoffradikalen wurde ebenfalls konzentrationsabhängig supprimiert.
Diese Daten belegen einen immunomodulatorischen Effekt von PTX auf Granulozyten. Da PTX die Aktivierung von Granulozyten reduzieren kann, sollten weitere klinische Studien Anhaltspunkte über einen möglichen Einsatz im Rahmen entzündlicher Erkrankungen (z.B. Sepsis, Meningitis, GvH und RA) ergeben.

DNA-zytometrische Phänomene in der Langzeitzellkultur von Nierenzellkarzinomen

Nadja Reichl, Beate Schirp, M.Kropff, A.Böcking, L.Füzesi

Institut für Pathologie, Neues Klinikum der RWTH, 5100 Aachen

Ziel dieser Studie ist, DNA-zytometrisch erfassbare Phänomene in der Langzeitzellkultur von Nierenzellkarzinomen aufzuzeigen, die zu einem experimentellen Modell der Tumorprogression beitragen können.

Wir haben aus 10 Nephrektomiepräparaten sowohl die Tumorzellen, als auch die normalen Nierenzellen in der Langzeitzellkultur DNA-zytometrisch untersucht. Der DNA-Gehalt der Kerne aus der jeweiligen Passage wurde nach Feulgen-Färbung mit dem Miamed TV-Bildanalysesystem (Leitz, Wetzlar) gemessen.

Die DNA-zytometrische Analyse der Stammlinien ergab, daß bei den normalen Nierenzellen in der Langzeitzellkultur bis auf eine euploide Polyploidisierung keine Änderung an der DNA-Verteilung auftritt. Dagegen konnten wir bei den Tumorzellen eine deutliche Selektionstendenz der DNA-zytometrisch gemessenen Stammlinien in den unterschiedlichen Passagen beobachten. Die in vitro Kultivierung humaner Tumorzellen fürht weiterhin zu einer erhöhten Polyploidisierung mit Ausbildung einer zweiten Stammlinie. Bei denTumorzellen kann eine euploide von einer aneuploiden Polyploidisierung unterschieden werden. Da diese Phänomene auch in den klinisch fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen zu beobachten sind, eignet sich die Langzeitzellkultur zur in vitro Untersuchung der Tumorprogression bei Nierenzellkarzinomen.

KOOPERATION VON ZYTOKINEN, INTEGRINEN UND FORMYLPEPTIDEN BEI DER AKTIVIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

G. Rothe[1], C. Maucher[1], W. Kellermann[2], J. Briegel[2], B. Schaerer[2], G. Valet[1]

[1]Arbeitsgruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, W-8033 Martinsried,
☎ (089) 8578-2570, ✉ (089) 8578-3777
[2]Institut für Anästhesiologie der Universität, Klinikum Großhadern, W-8000 München 70

Die Freisetzung von reaktiven Oxidantien und Proteinasen durch Granulozyten führt zum Abbau von Bakterien, aber auch zur Schädigung körpereigenen Gewebes. Die selektive Aktivierung dieser Enzymsysteme nach Auswanderung an einen bakteriellen Fokus wird über drei Rezeptorklassen gesteuert: den Rezeptor für *N*-formylierte bakterielle Peptide wie *N*-formyl-Met-Leu-Phe (FMLP), Rezeptoren für von Makrophagen gebildete Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF-α) und Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF) und die Integrin-Rezeptoren für endotheliale Adhäsionsmoleküle oder Bestandteile der Extrazellulärmatrix mit der charakteristischen Erkennungssequenz Arg-Gly-Asp (RGD). Im Tiermodell hemmen neutralisierende Antikörper gegen TNF-α oder die β_2-Komponente der Leukozyten-Integrine (CD18) einerseits die antibakterielle Abwehr, andererseits verhindern sie das durch Granulozytenaktivierung induzierte Schocksyndrom. Ziel der jetzigen Untersuchungen war es, in einem durchflußzytometrischen *in vitro* Testsystem die Interaktion der drei Rezeptorgruppen näher zu charakterisieren.

Die H_2O_2-Produktion, die intrazelluläre Elastase-Aktivität, der intrazelluläre pH-Wert, das zytosolische freie Ca^{++} und die Vorwärts- und Seitlichtstreuung wurden an unseparierten Leukozyten unter einfacher oder kombinierter Stimulation mit FMLP (10^{-12} bis 10^{-6} M), TNF-α (10^{-11} bis 10^{-9} M), GM-CSF (10^{-11} bis 10^{-9} M), löslichem Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) (10^{-7} bis 10^{-4} M) oder auf Partikeln immobilisierten Extrazellulärmatrixproteinen gemessen.

Das bakterielle Peptid FMLP löste bei neutrophilen Granulozyten eine dosisabhängige Kaskade von Antworten aus: Bereits niedrige FMLP-Konzentrationen (10^{-10} M) induzierten transiente Erhöhungen der zytoplasmischen freien Ca^{++}-Konzentration und einen transienten Abfall der zellulären Seitlichtstreuung; bei mittleren FMLP-Konzentrationen (10^{-9} bis 10^{-8} M) kam es zu einer langanhaltenden und homogenen Alkalinisierung der Zellen und Zunahme der Vorwärtslichtstreuung, die Amilorid-hemmbar war und dadurch einer Aktivierung des Na^+/H^+-Antiports zugeordnet werden konnte. Erst höhere Konzentrationen von FMLP (10^{-7} M) induzierten in einer Alles-oder-nichts Reaktion einen oxidativen Burst in einer Subpopulation von Granulozyten, die mit zunehmender FMLP-Konzentration größer wurde.

Bereits niedrige TNF-α- oder GM-CSF-Konzentrationen (10^{-11} M) oder Aktivierung der Adhärenzrezeptoren induzierten eine Alkalinisierung der Granulozyten, ohne einen vorhergehenden Ca^{++}-Anstieg auszulösen. Höhere Mengen von TNF-α oder GM-CSF (10^{-10} bis 10^{-9} M) bewirkten eine deutliche Verstärkung des oxidativen Bursts auf nachfolgende FMLP-Stimulation. Bei Hemmung der Zytokin-induzierten Alkalinisierung durch den Na^+/H^+-Antiport-Inhibitor Amilorid (1 mM) trat keine verstärkte oxidative Antwort auf FMLP auf.

Die Ergebnisse der *in vitro* Modulation der Granulozyten durch Zytokine oder Adhäsionsrezeptoren weisen in Übereinstimmung mit dem bei septischem Organversagen *in vivo* beobachteten alkalischem intrazellulären pH neutrophiler Granulozyten darauf hin, daß die intrazelluläre Akkumulation von H^+ bei der NADPH Oxidase vermittelten Elektronenübertragung auf O_2 zu einer Selbstlimitierung der oxidativen Burstreaktion führt. Die Modulation des intrazellulären pH-Wertes stellt deshalb möglicherweise einen interessanten pharmakologischen Ansatz zur Beeinflussung der Granulozytenfunktion bei Sepsis dar.

Gefördert durch DFG SFB 207 der Universität München, Projekt G6.

Discrimination between two subsets of porcine CD8$^+$ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen

A. Saalmüller, E. Weiland, W. Hirt, and S. Maurer

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

The immune system of swine is unique in that the expression of CD4 and CD8 antigens defines four subpopulations of resting extrathymic T lymphocytes. Besides the CD4$^+$CD8$^-$ T-helper-lymphocytes and the CD4$^-$CD8$^+$ cytolytic T lymphocytes, CD4$^+$CD8$^+$ and CD4$^-$CD8$^-$ T-lymphocyte subpopulations can be detected. As an additional differentiation antigen of porcine T lymphocytes, the expression of the 65 kd CD5 antigen was studied.

In porcine thymus, nearly all thymocytes with the exception of a minor fraction of cells belonging to the CD4$^-$CD8$^-$ thymic precursors, express the CD5 antigen. Concerning the extrathymic T-lymphocyte compartment, CD5 shows an heterogeneous antigen distribution on the four CD4/CD8 defined subpopulations. All CD4$^+$ T lymphocytes, CD4$^+$CD8$^-$ as well as CD4$^+$CD8$^+$ cells express CD5 with high antigen density. The CD4$^-$CD8$^-$ γ/δ TcR subset is characterized by a lower CD5 expression and contains a minor fraction of CD5$^-$ T lymphocytes.

Remarkably is the separation of the CD4$^-$CD8$^+$ cytolytic T-lymphocyte subpopulation into two subsets: CD5$^-$CD8$^+$ and CD5$^+$CD8$^+$ T lymphocytes. Functional studies with the sorted subsets revealed, that the CD5$^-$CD8$^+$ subset is characterized by spontaneous cytolytic activity against tumor cells, whereas the CD5$^+$CD8$^+$ fraction contains the MHC-restricted cytolytic T lymphocytes. Thus the CD5 marker can be used to discriminate between these two CD4$^-$CD8$^+$ cytolytic T lymphocyte fractions.

Rapid and sensitive detection of virus infected cells using the FACS-Gal assay

A. Saalmüller and T.C. Mettenleiter

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

The FACS-Gal assay enables a rapid, sensitive and quantitative measurement of intracellular β-galactosidase (β-gal) activity in individual viable cells. The enzymatic activity of β-gal - encoded by the E. coli lacZ gene - can be determined by flow cytometry using fluoresceindigalactoside (FDG) as fluorogenic substrate. FDG is hydrolyzed by β-gal and retained intracellularily.

We describe here an application of the FACS-Gal assay for the detection of virus infected cells. The conventional detection of virus infected cells, based on virus-specific antisera or monoclonal antibodies (mAb) is often insufficient, particularily in the case of viable cells, where cell surface expression of viral proteins is necessary for the positive reaction.

The FACS-Gal assay based on the expression of the lacZ-reporter gene should overcome this disadvantage and should enable a very sensitive detection of virus synthesis.

To test the sensitivity of the FACS-Gal assay, MDBK (bovine kidney) cells were infected with a β-gal-pseudorabies virus mutant (β-gal-PRV) in vitro. PRV, the causative agent of Aujeszky's disease in swine belongs to the herpesvirus group of enveloped animal viruses. The FACS-Gal assay enabled in our experiments a very early detection of virus infected cells, with a clear separation between non infected and infected cells, whereas viral antigens recognized by a polyclonal anti-PRV-antiserum could be detected only in the late stages of infection. The FACS-Gal assay seems to be therefore a sensitive and efficient method for the detection of virus infected cells.

In combination with other fluorescence staining methods, e.g. mAb against leucocyte differentiation antigens, and multi-color flow cytometry analyses, this assay will be an important tool for phenotypic characterization of infected cells.

Simultane flow-cytometrische Messung von DNA und Ki-67-Fraktion bei malignen Non-Hodgkin-Lymphomen

Sauter G, Albrecht R, Feichter G, Gudat F

Institut für Pathologie der Universität Basel

Ki-67-Fraktion und flow-cytometrische DNA-Messungen sind bei malignen Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) klinisch relevant. Während die DNA-Flow Cytometrie die Bestimmung von S- und G2/M-Phasen-Fraktionen erlaubt, entspricht die Ki-67-Fraktion nahezu der Summe der Zellen in G1-, S- und G2M-Phase. Die simultane Messung von Ki-67 und DNA erlaubt ist methodisch heikel, würde aber die gesonderte Bestimmung von G1- und G0-Phasen-Fraktionen erlauben, wobei sich die G1-Phasen-Zellen als Ki-67 positive Zellen im G0/G1-Peak darstellen müssten.
Ziel unserer Untersuchung war es zu klären, wie variabel der Ki-67-Anteil der G0/G1-Phase bei NHL ist im Hinblick auf eine prognostische Bedeutung.

Einzelzellsuspensionen wurden durch mechanische Zellvereinzelung hergestellt. Zur Steigerung der Membranpermeabilität wurden die Zellfixation in 50% Alkohol bei - 20 Grad durchgeführt und danach bei 600 G zentrifugiert. Die DNA wurde mit Propidiumiodid markiert, das Ki-67-Antigen nach indirekter Immuninkubation mit FITC. Die Messungen erfolgten an einem FACScan (Software: CELL-FIT / PAINT-A-GATE).

Die bisher untersuchten Zellsuspensionen von 4 niedrig malignen NHL ergaben G1-Phasen-Anteile zwischen 1 und 18%. Die G1-Phasen-Werte der 5 hoch malignen NHL waren zwischen 5.3 und 38.9%. Bei 3 niedrig malignen NHL des gleichen histologischen Subtyps (Centroblastisch-Centrocytisch) fand sich eine Bandbreite des G1-Phasen-Anteils zwischen 5 und 19%.

Unsere präliminären Ergebnisse sprechen für eine eigenständige Bedeutung der G1-Phasen-Fraktion. Die kombinierte flow-cytometrische Messung von DNA und Ki-67-Antigen erlaubt bei malignen Lymphomen und möglicherweise auch bei anderen Tumoren zusätzliche Aussagen über das Tumorproliferationsverhalten.

DER REZEPTOR FÜR DEN UROKINASE-TYP PLASMINOGENAKTIVATOR (uPA) AUF TUMORZELLEN. QUANTIFIZIERUNG UND LOKALISATION MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS) UND KONFOKALER LASER SCAN MIKROSKOPIE (CLSM).

Manfred Schmitt, Nikolaus Chucholowski, Lothar Goretzki, Elisabeth Busch, Bettina Wagner*, Ulrich Weidle#, Fritz Jänicke und Henner Graeff.

Frauenklinik der TU München , *Leica, Heidelberg, und #Boehringer-Mannheim, Penzberg.

Der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) ist ein zentrales Molekül in der Kaskade limitierter Proteolyse, welche zur Anbindung von Plasmin auf die Tumorzelloberfläche führt. Solcher einer Tumorzelle wird die Fähigkeit zur Gewebeinvasion zugesprochen; zellgebundenes Plasmin aktiviert pro-Kollagenase IV, welches Kollagen IV, ein Bestandteil der Basalmembran, zerstört. Schlüsselenzym für die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin ist das Molekül Urokinase (uPA), welches an einen hochaffinen Rezeptor (uPA-R) bindet. uPA wird von der Tumorzelle gebildet (autokriner Mechanismus). Ein erhöhter Gehalt von uPA in Tumorzellen korreliert mit erhöhter Malignität von Tumoren. Beim Mammakarzinom ist der Gehalt von uPA ein prognostisch wichtiger Faktor für die Rezidivhäufigkeit und für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientin. Ob dem Rezeptor für uPA auf Tumorzellen eine prognostische Bedeutung zukommt ist ungeklärt.

Wir entwickelten sensitive Fluoreszenztechniken (FACS, CLSM), welche es erlauben, uPA-R auf Tumorzellen zu lokalisieren und zu quantifizieren (real-time analysis). Dazu wurde das Proenzym von uPA (pro-uPA) mit FITC markiert, über HPLC gereinigt und dann auf Tumorzellen gebunden. In Modellstudien wurde die promyeloide Tumorzellinie U937 eingesetzt. FITC-pro-uPA bindet mit hoher Affinität (10^9-10^{10}) und läßt sich vollständig durch einen Überschuß von pro-uPA verdrängen (FACScan). Kompetitve uPA-Peptide, mAB gegen die Rezeptorbindungsregion von uPA und löslicher rekombinanter uPA-R führten auch zu einer Blockierung der Anbindung von FITC-pro-uPA. Der uPA-R wurde durch konfokale Laser Scan Mikroskopie (CLSM) auf der Oberfläche von U937 Zellen lokalisiert. Es wurde eine nichthomogene Verteilung (patches) auf unstimulierten sowie auf stimulierten (PMA) U937-Zellen gefunden. Diese Ergebnisse korellieren mit elektronenmikroskopischen Befunden. Intrazellulärer uPA kann durch FACS in permeabilierten Zellen mittels gegen uPA gerichteten mAB detektiert werden. Dadurch ist es möglich, intrazellulären und rezeptorgebundenen uPA zu unterscheiden und mit DNA-Messungen (Ploidy, S-Phase) zu korrelieren.

Differentiation and activation of mononuclear phagocytes (MNP) in familial hypercholesterolemia (FH)

G. Schmitz, E. Kovacs, T. Brüning, H. Hohage

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 1, D-8400 Regensburg

The adherence of MNP to the injured endothelium and their migration to the subendothelial space is an early key event in the development of atherosclerosis. The MNP/endothelial interaction is mediated by adhesion molecules on MNP such as leukocyte functional antigens (LFA-1, LFA-3) and by intercellular adhesion molecules e.g. ICAM-1 expressed on the surface of endothelial cells. On the other hand, MNP are also able to bind to IgG absorbed onto the vessel wall via Fc receptors, which then activate the complement cascade. Moreover, several membrane associated complement components (C3b receptor, membrane cofactor protein- MCP, decay accelerating factor DAF, membrane attack complex inhibitor- MAC-I) are expressed on the surface of monocytes and modulate complement activation.
We have investigated the expression of adhesion molecules (LFA-1=CD11, LFA-3=CD58) Fc III receptor (CD16) and membrane associated complement components (C3b receptor=CD35, MCP=CD46, DAF=CD55, MAC-1=CD59) on circulating monocytes obtained from freshly diagnosed untreated FH patients (cholesterol levels>300 mg/dl, LDL-receptor activity<60%). The differentiation and activation state of the MNP was investigated by the expression of CD14 resembling the lipopolysaccaride (LPS) receptor and HLA-DR, a class II major histocompatibility antigen, which are both induced by oxidized LDL treatment. The expression of the various surface markers were examined with fluorescence labeled monoclonal antibodies detected by a FACScan flow cytometer. A normal expression of LFA-1 and LFA-3 was observed in FH patients, but interestingly they had a significantly lower expression of Fc III receptor, C3b receptor, DAF, MAC-I, LPS receptor and HLA-DR on MNP. The decreased expression of CD14/CD16 and HLA-DR may indicate a left shift of the circulating monocyte population to more immature monocytes, while the more mature pre-macrophage like CD14/CD16 positive MNP may have left the circulation in FH patients. The reduced expression of CD55 and CD59 refers to the decreased capability of circulating MNP in FH for inhibiting the membrane associated complement activation. It is suggested that in FH more mature monocytes leave the circulation at the place of arterial injuries and differentiate into lipid ingesting macrophages in the subendothelial space. The higher flux of monocytes into the vessel wall may contribute to the enhanced risk for atherosclerosis in FH patients.

Quantitative DNA-Bestimmung an Nährzellkernen von Chrysomya

Michael Schöttke

Zoologisches Institut, Universität Kiel

Die Ovarien der Schmeißfliege Chrysomya rufifacies (Calliphoridae) sind wie bei allen Dipteren polytroph-meroistisch organisiert. Im Normalfall beginnt die Oogenese mit vier aufeinanderfolgenden Mitosen, so daß aus einer Stammzelle 16 Zellen (Cystocyten) entstehen, die sich zu einer Oocyte und 15 Nährzellen differenzieren. Die Nährzellen vervielfältigen anschließend durch Endoreplikationen ihren DNA-Gehalt; dadurch können sie ihre Funktion als Nährstofflieferanten für die wachsende Eizelle schneller erfüllen. In bisher zwei Ausnahmefällen wurde im selben Tier neben normalen Follikeln jeweils ein Follikel mit einer Oocyte und 31 Nährzellen gefunden. Die Cystocyten haben hier eine zusätzliche Differentialmitose durchlaufen, aus der die Überzahl an Nährzellen resultiert.

Mit einem Mikrophotometer wurden die feulgengefärbten Präparate ausgewertet. Auf diese Weise wurde geprüft, ob die Follikel mit 31 Nährzellkernen insgesamt mehr DNA enthalten als solche mit nur 15 Kernen.

Die Gesamt-DNA-Gehalte der Nährfächer (Summe der Nährzellen) stimmen in beiden Follikeltypen gut überein. Die einzelnen Nährzellkerne lassen sich nach ihren DNA-Gehalten in verschiedene Klassen einteilen, die jeweils durch eine Replikationsrunde voneinander getrennt sind. Der Vergleich der Klassen zeigt, daß die Kerne der anormalen Follikel in der Regel eine Replikationsrunde gegenüber den entsprechenden Kernen der normalen Follikel zurückliegen. Das Ergebnis fordert einen Mechanismus zur Kontrolle der nukleären Gesamt-DNA innerhalb des Ei-Nährzell-Verbandes.

Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob diese Regulation auch gegen Ende der Oogenese noch wirksam ist, oder ob die 31 Nährzellkerne die fehlende Replikationsrunde aufholen und das so entstehende Ei eine höhere Nährstoffmenge erhält.

Durchflußzytometrische Analyse des Proliferationsverhalten von Melanomzellen in vitro.

Armin Schuster, Martin Poot und Holger Hoehn.

Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, 8700 Würzburg.

Der Einfluß von in der Klinik noch nicht eingeführten Wachstumshemmern auf das Proliferationsverhalten von humanen Melanomzellen wurde an etablierten Zellinien von sekundären humanen Melanomtumoren untersucht. Die Zellen wurden 72h mit Bromodeoxiuridin (BrdU) inkubiert und mit der Methode der bivariaten Ethidiumbromid/Hoechst-Durchflußzytometrie analysiert. Dieses zellkinetische Verfahren erlaubt es, die G1-, S-, und G2-Phasen dreier aufeinanderfolgender Zellzyklen aufzulösen. Optimales Wachstum der Melanomzellen erfolgte in DMEM/F12-Medium; bei Inkubation in RPMI-1640-, MEM-, (Minimum Essential Medium) und DMEM-Medium, (Dulbecco's Modified Medium), zeigten die Melanomzellen hingegen bereits ohne zusätzliche Behandlung einen verzögerten Austritt aus der G0/G1-Phase und einen G2-Arrest. Im Einklang mit Kable et al, (Cancer Research 49, 2327-2331), zeigten die Melanomzellen eine Überempfindlichkeit gegenüber der Testsubstanz DL-Buthionin-Sulfoximin (BSO). Für BSO betrug die ID_{50} 15 μM im Falle der Melanomzellen, während für diploide, humane Fibroblasten eine ID_{50} von 50 μM gemessen wurde. Der zellkinetische Mechanismus der wachstumshemmenden BSO-Wirkung auf Melanomzellen beruht auf einer G2-Phasenverlängerung, (6.8h mit BSO/4.3h Kontrolle ohne BSO), und auf einer Verlängerung der G1'-Phase, (19.5h mit BSO/11.0h Kontrolle ohne BSO).

DETERMINATION OF RETICULOCYTES BY DUAL-COLOUR MULTIPARAMETER FLOW-CYTOMETRY WITH ANTI-GLYCOPHORIN-A- AND WITH ANTI-TRANSFERRIN-RECEPTOR- (CD71)-MONOCLONAL ANTIBODIES

Stefan SERKE, Dieter HUHN

Universitätsklinikum Rudolf Virchow-Charlottenburg, Abtlg.Innere Medizin und Poliklinik, hämatologisches Zentrallabor

Multiparameter flow cytometry allows for the identification and quantitation of even smallest cell-subsets. Normoblasts, the immediate progenitors of reticulocytes, display high levels of the transferrin-receptor. We have studied the feasibility of enumerating reticulocytes by dual colour staining with anti-glycophorin-A-PE, and with anti-CD 71-FITC on a Facscan flow-cytometer. Correlations of about . 9 have been calculated comparing the newly developed method to a) standard procedure: microscopy (brilliant cressyl blue, and b) flow-cytometry: thiazole-orange/Retic-Count. Due to differential expression of CD 71-antigen, various subsets of reticulocytes can be identified.

Data from 100 normal subjects, from 150 diagnostical samples, and time-courses of samples from patients with a variety of anemias are presented.

DURCHFLUßZYTOMETRISCHE DIAGNOSTIK VON FANCONI ANAMIE

Helga Seyschab, Detlev Schindler, Richard Friedl, Traute Schroeder-Kurth* und Holger Hoehn

Institut für Humangenetik, U Würzburg, F.R.G.
* Institut für Anthropologie und Humangenetik, U Heidelberg, F.R.G.

Die Fanconi Anämie (FA), autosomal rezessiv vererbt, gehört zu den klassischen Chromosomenbruchsyndromen. Bei FA-Patienten kommt es häufig zu Panzytopenie, einem vollständigen Versagen der Knochenmarksstammzellen. Charakteristisch ist die erhöhte Chromosomenbrüchigkeit, sowohl spontan als auch induziert mit DEB oder MMC. Im zellkinetischen Bild kann mittels der Durchflußzytometrie eine charakteristische Erhöhung der G2-Phasen analysiert werden.

In einer gemeinsamen Studie wurden 57 Patienten mit der Fragestellung Fanconi Anämie parallel durchflußzytometrisch und zytogenetisch untersucht. Hierfür wurden isolierte Blutlymphozyten nach PHA-Stimulation in der Gegenwart von BrdU kultiviert und nach 72h mittels der zweidimensionalen BrdU/Hoechst Ethidiumbromid Durchflußzytometrie analysiert. Als diagnostische Parameter diente die Ratio aus der Summe der G2-Phasen und der Wachstumfraktion (growth fraction, Fraktion aller proliferierender Zellen ohne G0-G1 Fraktion) ΣG2/GF.

Es konnten 17 Patienten mit FA sowohl zytogenetisch als auch durchflußzytometrisch diagnostiziert werden. Deren ΣG2/GF Ratio (0.418 ± 0.051) war signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen (0.168 ± 0.033). 15 Patienten zeigten ein unauffälliges zellkinetisches Bild. 19 Patienten mit Aplastischer Amämie wiesen eine unauffällige ΣG2/GF Ratio auf (0.131 ± 0.046), unterschieden sich jedoch von den unauffälligen Patienten und den Kontrollen durch eine erhöhte nichtproliferierende G0-G1 Fraktion (56.3 ± 18.6 gegenüber 20.0 ± 9.1). Bei den Patienten mit FA zeigte sich eine breite Variation der nichtproliferierenden G0-G1 Fraktion. Dieser Parameter kann mit dem klinischen Status der Patienten korreliert werden.

Die durchflußzytometrische Diagnostik der Fanconi Anämie ist gegenüber der konventionellen Chromosomendiagnostik schnell und reproduzierbar. Darüberhinaus können Patienten mit Aplastischer Anämie anderer Genese erkannt werden. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, daß nach erfolgter Knochenmarkstransplantation der Verlauf der Krankheit schnell und einfach verfolgt werden kann.

Alkylphosphocholines: a New Group of Antineoplastic Agents with Growth Stimulation Effects in the Lower Dose Range

Stephan B. SOBOTTKA & Martin R. BERGER

Institute of Toxicology and Chemotherapy, German Cancer Research Center, 6900 Heidelberg, FRG

Alkylphosphocholines (APC) are a new class of membrane-directed antineoplastic agents with remarkable antitumor activity in vitro and in vivo. Hexadecylphosphocholine (HPC), as the best known representative of this group, has shown exceptionally high antineoplastic activity against methylnitrosourea(MNU)-induced, autochtonous mammary carcinomas and first clinical trials confirm that HPC is effective against human malignancies, too.

Investigating the structure-activity relationship of twelve different compounds out of the APC group on a human and MNU-induced rat cell panel by the MTT tetrazolium salt colorimetric assay and direct cell counting, we surprisingly observed dose related growth stimulation effects in the lower dose range of certain compounds. Following continuous drug exposure of two MNU-induced rat tumor cell clones to d^9-cis-oleylphospho-(N,N-dimethyl-N-ethyl)-ethanolamin for 72 hrs for example, the present dose-related effects could be demonstrated: (^{a}, drug concentration; ^{b}, growth in percent of control): *A) 1/C2 clone:* 4,1 µmol/l^a, 103,8%^{b}; 6,4 µmol/l, 115,6%; 10,24 µmol/l, 115,5%; 16 µmol/l, 119,3%; 25,6 µmol/l, 95,9%; 40 µmol/l, 67,5%; 64 µmol/l, 24,7%; 100 µmol/l, 2,2%; 160 µmol/l, 0,2%; *B) 1/C32 clone:* 4,1 µmol/l, 114,9%; 6,4 µmol/l, 126,6%; 10,24 µmol/l, 134,3%; 16 µmol/l, 139,2%; 25,6 µmol/l, 134,3%; 40 µmol/l, 93,15%; 64 µmol/l, 32,9%; 100 µmol/l, 2.2%; 160 µmol/l, 0,5%. These data exemplarily show that the tumor cell proliferation could be accelerated by APC-derivatives over a wide range of concentration before antiproliferative effects occured. Treatment with HECNU (alkylating agent) and vinblastine (mitosis inhibitor) on the other hand did not show any increase in cell proliferation.

This observation indicates that the mechanism of action of APC can probably not be reduced to a simple cytotoxicity reaction and that certain APC derivatives possess growth mediator functions. For this reason a receptor-mediated mechanism should be taken in consideration.

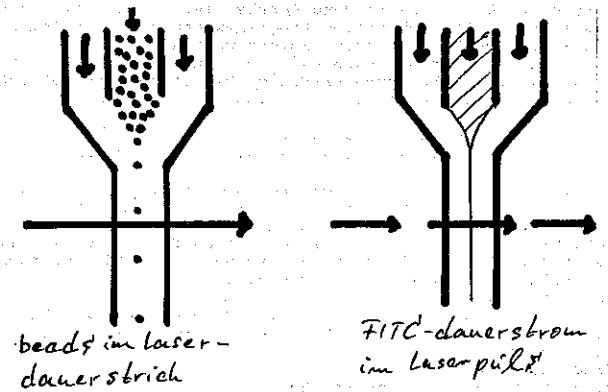
Flußzytometrische Kalibrierung von Standard Beads

Michael Stöhr und Stefan Meuer

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Angewandte Immunologie, AG Zytometrie, Im Neuenheimer Feld 280, W-6900 Heidelberg, FRG

Standard Beads werden spektralfluorometrisch ausgemessen. Die Angabe der repräsentierten FITC-Äquivalente kann mit Recht bezweifelt werden. Ein relativer Vergleich der Fluß-Messungen mit den Produktangaben verschiedener Hersteller unterstreicht diese Zweifel.

Es wird eine Flußmethode vorgestellt, die eine direkte Bestimmung der FITC-Äquivalente pro Bead erlaubt. Die untere Graphik erläutert das Verfahren.



Bei bekannter Molarität der FITC-Lösung als Proben-Dauerstrom und dem Volumen des Laserfokus ist die Anzahl fluoreszierender FITC- Moleküle berechenbar.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Größenordnung der Produktangaben stimmt, jedoch Anweichungen von bis zu 50% vorkommen.

Jede neue Charge von Standard Beads kann mit diesem Verfahren leicht kalibriert werden.

Ein komplettes C-Programm für die 4-Parameter Flußzytometrie mit Personal Computer

Michael Stöhr und Gerry Futterman

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg,
Angewandte Immunologie, AG Zytometrie, Im Neuenheimer Feld 280,
W-6900 Heidelberg, FRG

Basierend auf einem PC mit 80386 Intel Prozessor, monochrom und EGA-Grafik Bildschirm, TD2828 ADC-Board von Data Translation (HP-Plotter ist optional) wurde eine Funktionsbibliotek und ein Anwenderprogramm in C für die Aquisition, Speicherung, Analyse und graphischen Dokumentation flußzytometrischer Daten entwickelt. Die PC-Konfiguration ist an jedes Flußzytometer anschließbar. Realisiert sind Kopplungen mit FACS (B-D), EPICS (Coulter), Cytofluorograph-Systems (ORTHO) und ICP 11 (Phywe).
Die Funktionsbibliothek besteht aus Programm-Modulen, die von der Benutzerebene als C-Funktion aufgerufen und aktiviert werden können.
Eine Standardoberfläche in Menu-Betrieb ist schon erstellt und ist im Routine-Einsatz. Zukünftige Programmwünsche können vom C-kundigen Anwendern selbst nachprogrammiert werden.
Die notwendige Programmierung und Austestung erfolgt dann sinnvollerweise auf der C-Interpreter-Ebene. Die schnellere Betriebsversion läßt sich danach mit einem C-Kompiler erstellen.

Folgende Funktionen sind realisiert:

1. Mono-Parameter FCM wahlweise 64, 128, 256, 512 Kanäle:
   Akquisition:
   mit Echtzeit-Display, automatischem oder beliebigem Zellzahl-Skaling, zero-offset (zur Linearisierung der Analyse), conversion gain (1,2,5,10 Volt); interaktive Abfrage der Ereigniszahl pro Kanal oder total, interaktives Start-Stop-Toggling bei laufender Messung, Abbruch der Messung von Hand oder nach vorgewählter Ereigniszahl bzw. Meßzeit.
   Speicherung:
   Meßdaten und beliebig langer (bis 50 Zeichen) Text (Mini Text-Editor) identifiziert mit Name und Extension auf vorwählbares Verzeichnis.
   Wiederaufruf:
   Daten und Text wie abgespeichert
   Datenverarbeitung:
   Lin-Log-Darstellung, gewichtete Glättung (nur geringfügige Peak-Degradierung), Ereigniszählung in frei wählbaren Intervallen ohne und mit Hintergrundabzug (exponentiell oder polygonal) für die Immunstatistik, Zell-Zyklus-Analyse, DNA-Index-Bestimmung, Summation und Subtraktion von Spektren, Ausplotten der Daten (einzeln oder eine Serie Messungen) via Printer (Kopie des Graphik-Bildschirmes) oder Plotter (frei wählbare Formate).
2. Dual-Parameter FCM (64 x 64):
   Akquisition:
   wahlweise 2 von 4 Eingängen mit allen Merkmalen der Mono-FCM, farbige Kontour-Darstellung frei vorgewählter Kontour-Levels und Farbgebung der Kontour-Zwischenräume, X- und Y-Kollapse werden gleichzeitig dargestellt (mit getrenntem Skaling wie oben).
   Speicherung und Wiederaufruf:
   wie oben.
   Datenverarbeitung:
   Lin-Log-Darstellung, Count offset, gewichtete Glättung, Kontour- oder 3-D-Darstellung (beliebige Perspektive mit oder ohne lower und upper cuttoff), Summation oder Subtraktion, Analyse der Einzelkollapse, Fadenkreuz oder beliebige Rechtecke unter Mouse-Kontrolle, Ereigniszählung darin für die Immunstatistik, Bildschirmauszug per Printer oder Plotten (frei wählbare Formate).
3. Quad-Parameter FCM:
   LIST-MODE im Hintergrund der Mono- oder Dual-Parameter FCM.
   OFF-LINE-Verarbeitung:
   Mono- oder Dual-Analysen nach Retrieval der LIST-MODE-Daten ohne oder mit Gate-Bedingungen der Rest-Parameter.

Simultane BrdU/DNA Flußzytometrie: Vergleich von FITC/PI, RED613/DAPI und AMCA/PI

Michael Stöhr, Sabine Metzger, Monika Frank, Jörg Hemmer und Klaus Goerttler

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Angewandte Immunologie, AG Zytometrie, Im Neuenheimer Feld 280,
W-6900 Heidelberg, FRG

Zur optimalen Anwendung der verschiedenen Kombinationen von Fluoreszenz farbstoffen zur simultanen BrdU/DNA Analyse (visuell im Mikroskop oder im Durchfluß) ist die teilweise Denaturierung der doppelsträngigen DNA zur Bindung von anti-BrdU der bei weitem empfindlichste Schritt. Er ist für jede dieser Farbstoff-Kombinationen individuell vorzunehmen.
Die geläufige FITC/PI-Reaktion hat den Nachteil der extremen Farbüberlappung und des hohen Fluoreszenzhintergrundes (Raman-Streuung und Autofluoreszenz).
Die RED613/DAPI-Variante zeigt mikroskopisch die brillantesten Bilder, ist aber flußzytometrisch weniger geeignet, da sich die DNA-Denaturierung (präferenzielle AT-Aufschmelzung) besonders negativ auf die DAPI-Färbung (AT-Präferenz) auswirkt (schlechter CV).
Als beste Kombination erweist sich die Kombination von Aminocoumarin (AMCA) für den BdrU-Nachweis und PI als DNA-Fluorochrom.
Letztere Farbstoffgruppe ist auch für Untersuchungen an Chromosomen brauchbar.

The role of an altered lipid metabolism for the altered lymphocyte function in the elderly.

Stulnig, Th.*, Huber, L.A.*, Böck, G.*, Schönitzer, D**., Wick, G.*.

*Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Innsbruck, Fritz-Pregl-Str. 3/4, A - 6020 Innsbruck, Austria. Tel: 0043-507-2269, Fax: 0043-507-2507.

**Zentralinstitut für Bluttransfusion und Immunologische Abteilung, Universitätsklinik Innsbruck.

During the last years we were engaged in studying the process of *normal aging of the human immune system*. To be sure to investigate *healthy* aging itself and not changes related to underlying disease we applied the so-called SENIEUR-protocol designed by a working party of EURAGE (Concerted Action Programme on Aging of the European Community).

Our interest was focussed on investigations of the immunregulatory function of lipoproteins in the elderly. Low density lipoprotein (LDL) is the main lipoprotein in human plasma delivering cholesterol to peripheral cells by a high affinity receptor, which normally is downregulated by high serum LDL-levels to prevent cholesterol overloading of the cell. However, in flow cytometric studies, the uptake of red-fluorescent 3,3'-dioctadecyl-indocarbocyanine(DiI)-labeled LDL by lymphocytes was paradoxically enhanced in the elderly subjects, in spite of elevated LDL serum levels. In fact, lymphocytes from old donors had elevated molar cholesterol-phospholipid(C/Pl)-ratios in biochemical lipid analyses. Cholesterol, and especially its molar ratio to phospholipids, essentially influences membrane fluidity, i.e. a high cholesterol content makes membranes more rigid. We have established a method for determination of membrane fluidity on single cells by flow-cytometric measurement of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) fluorescence anisotropy. These mearurements revealed a significant decrease in membrane fluidity in the elderly. This decline was significantly correlated not only with a higher C/Pl-ratio, but also with a reduced responsiveness to T-cell mitogenic stimulation.

Thus immune responsiveness is strongly dependent on the lipid homeostasis of the cells of the immune system, and it therefore seems possible to enhance the immune function in the elderly by modulating the lipid metabolism by diet and/or drugs.

This work was supported by grants from the Austrian Reseach Council (project no. 7341) and the Austrian Ministry of Science and Research.

Analysis of interactions between neural members of the immunoglobulin superfamily

A. Tárnok & Rathjen, F.G.

ZMNH, Center for Molecular Neurobiology, University Hospital Eppendorf, Martinistr. 52; D-2000 Hamburg 20

In the past few years three chick neural cell surface glycoproteins belonging to the immunoglobulin superfamily which are involved in axon-axon interactions, namely F11, neurofascin (NF) and G4, have been identified (Rathjen et al., JCB, 104, 343; Rathjen et al., Cell 51, 841). Fab fragments of polyclonal antibodies to these molecules cause de-bundeling of axons and reduction of neurite length if grown on other axons. Furthermore, purified F11 or G4 if immobilized on culture dishes directly stimulate outgrowth of axons.

In the present study the interactions between these three and other cell adhesion proteins (e.g. restrictin, N-CAM) were investigated. One of each protein was covalently linked to red or blue fluorescent beads (Covasphere, Duke Scientific, CA; 0.5 μm in diameter). The aggregation behaviour of conjugated Covaspheres was tested by incubation of two types of spheres conjugated with different proteins and subsequent measurement on a flow-cytometer (EPICS 751, Coulter Electronics). The percentage of self- and hetero-aggregated beads was determined. Significant self-aggregation was observed with beads linked with G4 and N-CAM but not with F11 and NF. In the mean 10-12 (G4) and 3-4 (N-CAM) beads were aggregated (up to 1.05 with NF or F11). Hetero-aggregation was found among others in the combination G4/F11. These results indicate that the investigated surface glycoproteins might act by homophilic as well as by heterophilic binding in the process of neurite outgrowth.

Sortierung Neurotransmitterrezeptor exprimierender Transfektanten auf der Basis ligandeninduzierter Ca^{2+}_i-Freisetzung

Tárnok, A.[1] & Meyerhof, W.

Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, und [1] ZMNH, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Martinistr. 52, 2000 Hamburg 20

Ein Verfahren zur Anreicherung transfizierter Zellen mit funktionsfähigen Neurotransmitterrezeptoren wurde entwickelt. Die Methode basiert auf der Messung der durch Rezeptoren regulierten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}_i]$) am Durchflußzytometer. NIH/3T3-Mausfibroblasten wurde mit gesamtgenomischer DNA aus GH3 Hypophysentumorzellen der Ratte und einem Neomyzinresistenz tragenden Plasmid kotransfiziert. Rezeptor exprimierende Transfektanten wurden durch Sortierung Neomycin resistenter Zellen, die auf Ligandenzufuhr mit erhöhtem $[Ca^{2+}_i]$ antworteten, angereichert. NIH/3T3-Zellen wurden mit dem Ca^{2+}-Indikator Indo1 geladen. Stimulation erfolgte durch Zuführung eines Ligandengemisches bestehend aus 8-10 Neurotransmittern über eine T-Verbindung, die die Einstellung der Inkubationszeit im Bereich von 10-50 sec. erlaubte. Alle Zellen mit erhöhtem $[Ca^{2+}]$ wurden steril sortiert gezüchtet und erneut sortiert. Sortierung nicht-transfizierter NIH/3T3-Zellen ergab, daß der Bradykininrezeptor endogen vorhanden ist. Weiterhin wurde endogen $[Ca^{2+}_i]$-Zunahme nach Gabe von Serotonin jedoch nicht von Bombesin festgestellt. Weitere endogene Aktivität war nicht feststellbar.
Unsortierte Transfektanten reagierten zu weniger als 0,01 % auf das Ligandengemisch. Nach dem ersten Sortierungsschritt waren bereits bis zu 3 % positiver Zellen vorhanden. Im Anschluß an einen weiteren Sort wurden die Zellen kloniert. 6 von 42 der resultierenden Klone sprachen deutlich auf das Gemisch an. Es wurde festgestellt, daß die Klone selektiv auf nur einen Neurotransmitter (Substance-P, Oxytocin oder (sehr schwach) Leu-Enkephalin) mit Ca^{2+}-Freisetzung reagierten.

CYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AN SCHILDDRÜSENZELLKERNEN IN VERSCHIEDENEN THYREOPATHIEN.

C. TASCA

Lehrstuhl für Pathologie der Medizinischen Fakultät,
Bukarest, Rumänien

In der vorliegenden Studie untersuchten wir, welche Zusammenhänge zwischen cytologischem Bild und cytophotometrischen Daten bei Schilddrüsenkrankheiten bestehen. Als Untersuchungsmaterial dienten 98 Fälle, darunter diffuse Kolloidstrumen mit knotiger Hyperplasie (euthyreote Struma), Struma Basedow, Chronische Thyreoiditis, follikuläre, papilläre, medulläre und undifferenzierte Karzinome. Das Alter der Patienten (8 Männer und 90 Frauen), lag zwischen 18 und 75 Jahren. Abstrichpräparate (vom Feinnadelpunktat) von den oben genannten Thyreopathien wurden mit Feulgen und Gallocyanin-Chromalaunfärbungsmethoden angefärbt und cytophotometrisch untersucht. Die zytophotometrische Zellanalyse erfolgte mit einem Zeiss Cytophotometer, mit dessen Hilfe mittlere Extinktionen und Kernflächen ermittelt werden können. Eine Zunahme der mittleren Werte des Zellkernvolumens von $314\mu^3$ bei Kolloidstrumen, bis $2300\mu^3$ in undifferenzierten Karzinomen wurde beobachtet. Der DNS- und NS-Gehalt blieb konstant im diploiden Bereich bei den gutartigen Schilddrüsenhyperplasien ($7x10^{-12}$g) mit einer geringfügigen Verschiebung in den hyperdiploiden Bereich in der Struma Basedow ($10x10^{-12}$g). In bösartigen Tumoren ist der DNS-Gehalt erhöht, besonders im undifferenzierten Karzinom ($19x10^{-12}$g). Parallel mit der Zellentdifferenzierung nimmt die DNS- und NS-Konzentration allmählich ab (1% im undifferenzierten Karzinom). Mit zunehmender Malignitätsstufe wurde auch eine zunehmende Aneuploidie gefunden, deren markantesteter Ausdruck im undifferenzierten Karzinom beobachtet wurde. Abweichungen der Häufigkeitsverteilung der DNS- und NS-Mengen dürfen als Maßstab der gesteigerten DNS- und NS-Synthese interpretiert werden. Allerdings ist das Vorkommen von aneuploiden DNS-Werten und die Zunahme der Zellkernvolumina nicht obligatorisch für bösartige Tumoren, und eine regelmäßige DNS-Verteilung schließt (besonders in Schilddrüsenmalignomen) ein Karzinom-Wachstum nicht aus. Die DNS-Ploidie in Schilddrüsentumoren besitzt prognostische Bedeutung nur in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern.

DNS-Cytometrie bei inflammatorischen Mamma-Carcinomen

Mona Tawfik; Kaese, K.; Börner, P.* u. Krause, P.H.

Institut für Pathologie sowie Frauenklinik* Krankenhaus
Berlin-Neukölln, Rudower Str. 48, 1000 Berlin 47
Fax 6004 3277

Beim Mamma-Ca. sind Tumorgröße (pT), Lymphknotenstatus (pN), histologische Typisierung und Graduierung (G) sowie der Rezeptor-Status (ER- u. PR-ICA) für den Verlauf entscheidende Merkmale. Daneben hat der DNS-Gehalt der Tumorzellkerne prognostische Relevanz, d.h. Tumoren niedriger Malignität sind euploid und solche hoher Malignität aneuploid.
Inflammatorische Mamma-Ca., die oft eine dermale Lymphangiose entwickeln, haben eine extrem schlechte Prognose. Uns interessierte der DNS-Status der Tumorzellen dieses Malignoms (a) vor Behandlung, (b) nach Chemotherapie sowie (c) in den Lymphknoten-Metastasen. Untersucht wurden Gewebeproben und Mastektomie-Präparate von insgesamt 48 Patientinnen der Jahre 1981-90. Als Kontrollen dienten Mastektomie-Präparate von 65 Mamma-Carcinomen mit axillären Makro-Metastasen.
Repräsentative Paraffinschnitte (4 µ) wurden entparaffiniert, nachfixiert (10 % Formalin) und nach FEULGEN gefärbt (Säurehydrolyse 5N HCl bei + 22 ° C für 60 min.) DNS-Histogramme der Tumorzellkerne wurden durch PC-gestützte mikroskopische Bildanalyse erstellt (AHRENS-System ACAS).
Die DNS-Histogramme wurden einmal nach AUER et al. (1980) klassifiziert mit den Gruppen I u.II (diploid) bzw. III u.IV (aneuploid). Daneben wurden die Daten der mikroskopischen DNS-Cytometrie mit einem neuentwickelten Programm analysiert unter besonderer Berücksichtigung des "DNA-ploidy-establishing peak" PEP, der "scatter-fraction 1" SF-1, dem G2/M Gipfel, der "scatter-fraction 2" SF-2 und dem "PEP-exceeding value" PEP-EV (FALKMER et al. 1991).
Insgesamt fand sich bei den inflammat. Mamma-Ca. ein hoher Anteil aneuploider Tumoren. Eine Subtypisierung, bezogen auf DNS-Status oder Überlebenszeit ist bislang nicht erkennbar.

Literatur: FALKMER, U. et al. Cytometry (1991) - in press

Durchflußzytophotometrische Untersuchungen an Schweinespermien

Ulrich, W.[1]; Ulrich, I.[1]; Fritz, B.[1] und Klunker, E.[2]

[1] Institut für Genetik, Universität Hohenheim, 7000 Stuttgart-70
[2] Tierarzt; Pattendorf, 8303 Rottenburg/Laaber

Die häufig auftretende Unfruchtbarkeit von Ebern ist ein ernsthaftes Problem in der Tierzucht. Mikroskopische Untersuchungen der Samen von neu erworbenen Jungebern ergeben oft keine genaue Auskunft über die Fertilität dieser Tiere.

Spermien von 3 Ebern eines privaten Schweinezüchters, von denen ein Tier eindeutig als infertil eingestuft werden kann, standen für durchflußzytophotometrische DNS-Untersuchungen zur Verfügung.

Die Analysen der Spermien ergaben generell, daß das Material des Tieres mit schlechterer Zeugungsfähigkeit größere Anteile an Debris und schlechtere Auflösung der Histogramme aufwiesen. Samen der 3 Tiere wurde über einen Zeitraum von mehreren Wochen untersucht.

Dekondensation der Spermien durch enzymatische Behandlung und Färbung mit DAPI ergab einen Unterschied von ca. 4,3 % im DNS-Gehalt der X- und Y-Chromosomen tragenden Spermatozoen, wobei das zu erwartende prozentuale Geschlechtsverhältnis von 50:50 der weiblichen und männlichen Spermien nachweisbar war.

Färbung der Spermien mit DAPI ohne eine enzymatische Vorbehandlung ergab Unterschiede in den DNS-Histogrammen der beiden fertilen Ebern und des infertilen Tieres. Beim befruchtungsunfähigeren Eber war deutlich ein zweigipfeliges Verteilungsmuster zu erkennen, was durch die unterschiedliche Färbbarkeit der länglichen (reifen) Spermatozoen und der runden (unreifen) Spermatiden zurückzuführen ist.

Diese ersten Befunde zeigen, daß die DNS-Durchflußzytophotometrie durchaus als ein zusätzlicher Indikator des Nachweises der Fertilität bzw. Infertilität bei Jungebern in der Schweinezucht herangezogen werden könnte.

LANTHANIDENCHELATE ALS ZEITVERZÖGERTE FLUORESZENZMARKER FÜR DIE ZYTOMETRISCHE IN-SITU HYBRIDISIERUNG VON NUKLEINSÄUREPROBEN

G.Valet, M.Collasius, A.Oser
Arb.Gruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, 8033 Martinsried bei München

Die in-situ Hybridisierung an zelluläre DNS oder RNS wird meist als Zweischrittreaktion mit Biotin-, Digoxigenin-, Acetaminofluoren- oder Quecksilber- markierten Nukleinsäureproben durchgeführt. Nach der Hybridisierung werden die primären Marker mit fluoreszentem Avidin oder Antikörpern sichtbar gemacht. Unspezifische Nebenreaktionen und die Autofluoreszenz der Zellen bedingen, daß die durchflußzytometrische Anwendung dieser Methodik in den meisten Fällen für die Hybridisierung in Eukaryontenzellen nicht empfindlich genug ist.

Ziel der eigenen Untersuchungen ist es, die hybridisierenden Nukleinsäuresonden mit zeitverzögert fluoreszierenden Lanthanidenchelaten zu markieren. Auf diese Weise können in-situ Hybridisierungen methodisch vereinfacht, unspezifische Nebenreaktion vermindert und der Einfluß der schnellabklingenden zellulären Autofluoreszenz auf die Meßergebnisse eliminiert werden.

Bisher wurden drei neue Verfahren der Nukleinsäuremarkierung mit Europium- oder Terbium-Chelaten der Diäthylen-Triamino-Pentaessigsäure (DTPA) entwickelt. Doppelsträngige Anteile der Nukleinsäureproben werden zunächst mit Psoralen unter UV-Einstrahlung kovalent quervernetzt. An die Psoralenreste können dann entweder direkt oder über Polylysinreste Eu^{3+}-DTPA oder zeitverzögert fluoreszierende Tb^{3+}-DTPA-Salicylat-Moleküle zur Markierung von Oligonukleotiden oder rekombinanten Nukleinsäuren angehängt werden. Neuerdings ist auch die Synthese eines direktfluoreszierenden Uridinnukleotids (Tb^{3+} DTPA-2-Aminobenzyl-5-(amidoallyl)-dUTP) gelungen, welches enzymatisch in Nukleinsäureproben eingebaut wird. Auf diese Weise können direkt fluoreszente Nukleinsäuresonden durch terminale Transferase, Polymerasekettenreaktion oder durch knick-translation erzeugt werden.

Die Fluoreszenz der Lanthanidenchelate wird zwischen 250-320nm angeregt und führt zu einer Emission zwischen 550-650nm. Die Lichtausbeute bei der zeitverzögerten Fluoreszenz ist zwar deutlich geringer (ca.1-5%) als bei der schnellabklingenden Fluoreszeinfluoreszenz dafür ist aber auch der Fluoreszenzhintergrund erheblich niedriger, was in einem hohen Signal zu Rauschverhältnis resultiert. Die spektralen Eigenschaften von zeitverzögerten Fluoreszenzmarkern erfordern ein Quarzobjektiv zur Fluoreszenzanregung sowie eine intensive Lichtquelle zum Erreichen gesättigter Fluoreszenz. Weiterhin sind eine Fluoreszenzbeobachtung hinter dem Fluoreszenzanregungspunkt, eine möglichst komplette Sammlung des Fluoreszenzlichtes sowie eine empfindliche Fotoröhre erforderlich.

Obwohl bisher noch kein Durchflußzytometer zur Bestimmung der zeitverzögerten Fluoreszenz verfügbar ist, erscheinen die konstruktiven Anforderungen lösbar. Neben der Markierung von Nukleinsäureproben können in ähnlicher Weise auch Proteinmoleküle markiert werden.

Die Modifikation der als Lichtsammler wirkenden Aromaten in den Chelatverbindungen sollte über unterschiedliche Fluoreszenzanregung und Emission, auch simultane Mehrparametermessung ermöglichen. Auf diese Weise erscheint es z.B. möglich, die Genkopienzahl, die spezifische m-RNA und die Genproduktspiegel simultan in Einzelzellen zu bestimmen. Dies ist besonders im Hinblick auf intrazelluläre Regulationsvorgänge z.B. bei der Onkogenexpression in Krebszellen von Bedeutung.

DNA -Ploidie, Proliferationsaktivität und Genetische Variabilität beim menschlichen Mammacarcinom (T1-T2); eine durchflußcytometrische Studie.

Weiß, H., Nitschke, U., Frege, J., Streller, B. Brasching, H.P., Granetzny, A.

Zentralinstitut für Krebsforschung
Robert-Rössle-Institut
Lindenberger Weg 80
O-1115 Berlin

Durchflußcytometrische DNS/Protein Messungen wurden an fixierten, Sulforhodamin 101/DAPI gefärbten Zellen ausgeführt (PAS II). Untersucht wurden 29 lobuläre und 85 ductale Mammacarcinome. Ausgewertet wurde hinsichtlich DNA-Ploidie und Proliferationsaktivität; der 3D-Plot diente zur Erkennung von Subpopulationen (SP) innerhalb einer Zellinie, die durch korrelierende DNS-Protein Werte gekennzeichnet sind und als Maß der genetischen Variabilität angesehen werden. Fälle mit $\geq$ 2 SP (Subset 1) werden Fällen mit $\leq$ 3 SP (Subset 2) gegenübergestellt.
Ergebnisse: DNA diploide Carcinome (N = 46) unterscheiden sich von DNA aneuploiden Carcinomen (N = 68) bezüglich S % (5 vs. 14; $p < 0.01$). Innerhalb der DNA diploiden Carcinome unterscheiden sich lobuläre, LN- Carcinome (N = 10) von ductalen, LN- Carcinomen (N = 23) hinsichtlich G_2M % (9 vs. 12) und Proteingehalt (97 U vs. 100 U) ($p< 0.05$);Subset 1 (N = 16) von Subset 2 (N = 16) hinsichtlich G_2M % (9 vs. 13) ($p < 0.001$). Mit Hilfe der Varianzanalyse wurde der Einfluß von histologischem Typ, Lymphknotenstatus und SP-Zusammensetzung auf G_2M % geprüft und die SP-Zusammensetzung als bestimmender Faktor gefunden ($p < 0.01$).
Innerhalb der DNA aneuploiden Carcinome steigt der Proteingehalt der Zelle in Abhängigkeit des Kern-DNS-Gehaltes an ($y = 39.6 + 43.3 \cdot x$; $r = 0.91$). Carcinome mit DI-Werten 1.6 - 1.9 und 2.1 weisen eine höhere Streuung im Proteingehalt auf, als Carcinome mit DI = 1.4 und 2.0 ($p < 0.05$). Lobuläre, LN- Carcinome (N = 9) tendieren gegenüber ductalen, LN- Carcinomen(N = 26) zu höherem G_2M % (8 vs. 12), ductale,LN- Carcinome unterscheiden sich von ductalen, LN+ Carcinomen (N = 27) im $CV_{G1/0}$ (3.6 vs. 4.0) ($p < 0.05$). Lobuläre Carcinome, sowie LN- Carcinome (N = 25) gehören vorzugsweise Subset 1 an (13/2; 15/10), ductale Carcinome, sowie LN+ Carcinome (N = 27) Subset 2 (23/29; 8/19) ($p< 0.005$; $p< 0.03$). Subset 1(LN-) ist gegenüber Subset 2(LN-) durch niedrigere $CV_{G1/0}$-Werte (3.0 vs. 4.7) ($p < 0.01$) und G_2M % (9 vs. 18) ($p < 0.01$) gekennzeichnet.
Durch Varianzanalyse, die die Variablen histologischer Typ, Lymphknotenstatus und SP-Zusammensetzung testete, wurde die Zahl der SP (Subset 1 oder 2) als bestimmender Factor für G_2M % gefunden, ebenso wurde die SP-Zusammensetzung gegenüber dem Ploidiegrad als bestimmend erkannt ($p < 0.001$).
Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen Proliferationsaktivität und genetischer Variabilität hin und erklärt die schon bekannte Bedeutung des $CV_{G1/0}$-Wertes bei Carcinomen.

KINETOCHORE IMMUNOSTAINIG OF CHROMOSOMES IN SUSPENSION FOR DETECTION OF CHROMOSOMAL ABNORMALITIES USING SLIT SCANNING FLOW CYTOMETRY

Eva Maria Weller, Wolfgang Beisker, Stefan Müller, Michael Nüsse

GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung, 8042 Neuherberg, FRG

Slit scanning flow cytometry allows the simultaneous measurement of the morphology (centromeric indices) and the DNA content of single chromosomes. Radiation induced dicentric chromosomes can be discriminated from normal chromosomes by their pulse shape. Normal metacentric chromosomes show one dip in their fluorescence profile whereas dicentric chromosomes show two dips caused by two centromers observed in these aberrant chromosomes.

As an additional selection parameter for the detection of dicentric chromosomes by slit scanning flow cytometry a technique was developed to label the centromeric region of suspended Chinese hamster chromosomes with CREST antibodies. Chromosomes were isolated from a suspension of mitotic cells by swelling in a Tris-buffered hypotonic solution containing $MgSO_4$, NaCl and RNase and by disrupting the plasmamembrane to release the chromosomes. Following fixation in ethanol the isolated chromosomes were incubated with CREST antibodies. Kinetochores were visualized as double spots by immunostaining with FITC-conjugated anti-human antibodies. To avoid clumping or loss of the chromosomes during this procedure the washing steps were performed by underlaying the samples with a sucrose solution. After counterstaining the chromosomal DNA with Hoechst 33258 the chromosomes showed a well preserved morphology and provided highly resolved flow karyotypes. This procedure may have an useful application in identifying chromosome aberrations by bivariate slit scanning flow cytometry.

STIMULATION WITH STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS INDUCES PROGRAMMED CELL DEATH (APOPTOSIS) IN HUMAN T CELLS.

Sebastian Wesselborg, Ottmar Janssen, and Dieter Kabelitz

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

Monoclonal Antibodies (mAb) directed against the T cell receptor (TCR)/CD3 complex activate resting T cells to proliferate and to secrete IL-2. However, the very same stimuli induce programmed cell death (termed apoptosis) in thymocytes and certain transformed T cell lines. In addition, we could demonstrate that mAb against the TCR/CD3 complex induce growth inhibition by means of apoptosis in normal human $TCR\alpha\beta^+$ and $TCR\gamma\delta^+$ clone cells in the *presence* of IL-2. In the *absence* of exogenous IL-2 the same anti-TCR/CD3 mAb stimulate $\alpha\beta^+$ and $\gamma\delta^+$ T cdoell clones to proliferate and to secrete IL-2.

In order to mimic a more physiological stimulus, $TCR\alpha\beta^+$ clone cells were exposed to a variety of staphylococcal enterotoxins (SE). SE activate T cells by crosslinking certain V_β epitopes of the TCR with constant regions of the HLA class II antigen. Beside, SE are discussed to induce anergy in preactivated mature T cells. Here again, stimulation with SE resulted in proliferation and IL-2 secretion in the *absence* of IL-2. In the *presence* of exogenous IL-2 SE induced growth inhibition. The mechanism of growth arrest is apoptosis, which is characterized by cleavage of genomic DNA to fragments of approximately 200 bp and multiples.

Taken together, our data indicate that clonal deletion (by means of apoptosis) is in addition to anergy one of the basic mechanisms in the regulation of the immune response (eg induction of tolerance). The influence of other cytokines (eg IFNγ) and immunosuppressive agents such as CsA and FK 506 on the induction or prevention of apoptosis is under further investigation.

Microphotometry of differentially endoreplicated nuclei in Drosophila nasutoides

Helmut Zacharias

Zoologisches Institut der Universität, Biologiezentrum,
D-2300 Kiel 1

Drosophila nasutoides possesses four chromosome pairs which are XX+3AA and XY+3AA in the female and the male, respectively. Chromosome 4 contains more than 60% of the genomic DNA and is drastically subject to selective endoreplication. The polytene element 4 drops below 2% in salivary gland nuclei during the course of maximum 11 endocycles (1). The huge amount of non-polytenizing DNA concentrated to a singular chromosome makes the system feasible to analyse the effect of differential endocycles. The time point of the so-called underreplication has been determined in Feulgen stained tissues by microphotometry (Table 1). The larval brain has been investigated recently. A comparative study of mean optical density and projected area in metaphases and interphase nuclei has shown that heterochromatin is much denser in the interphase than in the metaphase (2).

Table 1. Differential endocycles in six tissues of D. nasutoides

Tissue	C E L L N U C L E I							Maximum Endo-cycle
	N	2C	4C	Mode of full	Endoreplication s#1	s#2	s#3	
LSALGL	162	1	-	1	5	144	11	11
Anlage	35	5	15	1	2	11	1	4
ASALGL	35	-	-	1	1	28	5	4
LMALTU	56	-	-	-	27	29	-	6
LHINDG	51	-	-	14	27	8	2	8
LSDUCT	30	11	-	-	19	-	-	2
Sum	369	17	15	17	81	220	19	-

LSALGL larval salivary gland; ASALGL adult salivary gland; Anlage of the latter; LMALTU larval Malpighian tubes, LHINDG larval hind gut; LSDUCT salivary duct from a 2mm larva. s#i silenced during endocycle #i.

References:

(1) Zacharias H, 1986. Roux's Arch Dev Biol 195: 378-388.
(2) Zacharias H, 1990. Chromosoma 99: 24-35.