Abstracts

dkfz

Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 22. bis 24. Oktober 1992

Tagungsort
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Kommunikationszentrum

Organisatoren

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

Abstracts

Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 22. bis 24. Oktober 1992

Tagungsort
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Kommunikationszentrum

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

ANALYSIS OF CYTOKINE PRODUCTION BY IMMUNOFLUORESCENCE

Mario Assenmacher, Jürgen Schmitz and Andreas Radbruch

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

Detection of intracellular proteins by immunofluorescence allows to evaluate frequency, light scatter- and surface-immunophenotype of protein-producing cells and correlate production of different proteins by individual cells. We established a method for simultaneous analysis of two cytokines and one surface marker by fluorescence microscopy and flow cytometry. We investigated expression of IL2, IL4, IL5 and IFNγ by mouse spleen cells activated in vitro with the superantigen staphylococcus aureus enterotoxin B (SEB) in the presence of different antigen presenting cells (APC). Kinetics of frequency of IL2 and IFNγ producing CD4+ and CD8+ T cells were determined. The maximum frequency for IL2, about 20% of CD4+ blasts was obtained early after 31h, whereas the frequency of IFNγ positive CD4+ blasts increases until 48h, up to 27%. After 42h of SEB stimulation, only a few CD4+ T cells express IL2 and IFNγ simultaneously. The main portion of cytokine producing cells expresses IL2 or IFNγ exclusively, either reflecting different kinetics or distinct subsets of CD4+ T cells.

DNA-Analytik mittels Flowzytometrie bei Ovarialtumoren

Auner H.,Schöll W.,Luschin G.,Adelwöhrer N.,Pürstner P.,
Gebh.-gynäkol.Univ.Klinik Graz,Vorstand:Prof.Dr.R.Winter
Auenbruggerplatz 14,A-8036 GRAZ

Verlauf und Therapierespons gynaekologischer Malignomerkrankungen stützen sich im wesentlichen auf die traditionellen Prognoseparameter,wie Stadium,Histologie und Lymphknotenbefall,um nur einige zu nennen.Patientenverlaufsbeobachtungen zeigen aber sehr oft,daß das individuelle Risiko einer Tumorerkrankung a priori durch die Prognoseparameter allein nicht exakt voraussagbar ist.
Ein Verfahren,das sich als assistierende Diagnostik zum histopathologischen Befund Einblick in die Klonalität eines Tumors sowie seiner DNA-Verhältnisse und Wachstumsfraktionen im Vergleich zu gesundem Gewebe gibt,ist die Durchflußzytometrie,durch deren Hilfe eine effizientere Diagnostik und vor allem Prognoseabschätzung möglich geworden ist .Parameter der Flußzytometrie,wie Aneuploidie,Klonalität,und Angaben über die Wachstumsfraktion eines Karzinoms sind mittlerweile von eminenter klinischer Relevanz für Prognose und Verlauf einer Krebserkrankung.
Unsere durchflußzytometrischen Untersuchungen vor allem an Ovarialkarzinomen unterschiedlichster Stadien zeigen,daß die Aneuploidie ein typisches Merkmal von Krebsgewebe darstellt und daß vor allem Tumoren mit höherem Stadien zunehmende Klonalität aufweisen,ein Indiz,das vielleicht mit ein Grund für die schlechtere Prognose fortgeschrittener Karzinome darstellt.
Im Gegensatz zu den typischen Karzinomen konnten wir gerade bei Low-malignant-potential-Tumoren,den Borderlinetumoren des Ovars,mit an und für sich sehr guter Prognose ebenfalls Polyklonalität und Aneuploidie finden,ein Hinweis dafür,daß es in dieser Gruppe von Tumoren Subgruppen gibt,die wahrscheinlich prognostisch ungünstig sind und einer den Ovarialkarzinomen äuqivalente Therapie und Nachsorge bedürfen.

Tumornekrosefaktor (TNF) induzierte Modifikation der Zellkinetik in menschlichen Tumorzellen

Baisch, H.

Institut für Biophysik und Strahlenbiologie, Universität Hamburg

Die direkte Wirkung von TNF auf Tumorzellen ist sehr unterschiedlich. Während einige Zellinien völlig resistent sind, zeigen andere eine Wachstumsreduktion und wieder andere Zytolyse. Für die klinische Anwendung von Zytokinen ist es von großer Bedeutung, die Sensibilität bzw. Resistenz von Tumorzellen zu bestimmen und die Art der Wirkung - zytostatisch oder zytotoxisch - zu erkennen.

Das Ziel unserer Untersuchungen ist es, die Art der zellkinetischen Veränderungen und die Bedingungen für zytostatische gegenüber zytotoxischen Wirkungen aufzuklären.

Wir haben die TNF-empfindlichen Zellinien MCF-7 und Me180 sowie die resistenten CAKI-1 und 5637 mit der Bromdeoxyuridin-Methode untersucht. Nach 24 h Einwirkung des TNF wurden die Zellen für 1h mit BrdU markiert, nach 1 - 7h fixiert, im FACScan analysiert und die S-Phasenzeit und alle Phasenanteile bestimmt.

Im Gegensatz zu der murinen Zellinie L929, wo die Zytolyse die Hauptrolle spielt, konnte der größte Teil des Effektes bei den MCF-7 und Me180 durch zellkinetische Veränderungen erklärt werden: eine geringe Verlangsamung der S-Phasezeit und eine starke Erniedrigung des S-Phase-Anteils. Diese Effekte werden bereits bei niedrigen TNF-Dosen (100 U/ml) beobachtet, hohe Dosen (5000 U/ml) brachten nur eine geringe Verstärkung des Effekts. Bemerkenswert ist, daß bei den 100 U/ml nur etwa 30% der TNF-Rezeptoren besetzt sind, die weitere Besetzung bis zur Sättigung offenbar keine großen Auswirkungen hat.

Uncertainty management in quantitative histopathology by inference networks

Peter H. Bartels, Deborah Thompson

The quantitative characterization of cyto- and histopathologic materials has traditionally been concerned with such cytometric, karyometric and histometric features for which a direct correspondence exists between diagnostic term and measured entity. Data analysis is based on numerical multivariate methods; error analysis and classification methodology utilize both parametric and non-parametric, numerical multivariate techniques.

For diagnostic clues referring to more comprehensive entities, such as a degree of differentiation or the grade of a lesion, quantitation has to involve interpretive transforms, i.e., sets of histometric and karyometric features which collectively, quantitatively characterize the visual diagnostic concept. The extension of quantitation in histopathology to conceptual terms makes it desirable, in addition to the creation of interpretive transforms, to develop three capabilities. First, an ability is needed to deal with the uncertainties introduced by the use of conceptual,linguistic terms in quantitative assessment, i.e. , an adaptation of fuzzy set methodology. Second, an ability is needed to combine a sequence of conceptual diagnostic clues such that the "certainty" of a final diagnostic conclusion can be stated in terms of a numeric, probabilistic measure. Finally, the development of descriptive classification techniques combined with an ability to assess the uncertainty of a classification procedure is needed.
Many of these same problems have been encountered in research aimed at expert system development, fuzzy set theory, and approximate reasoning strategies. Inference networks offer many of the required capabilities, in particular, Bayesian belief networks can be adapted as a highly effective solution.
Experience with Bayesian belief networks in quantitative histopathology, as descriptive classifiers, for the management of uncertainty in expert systems, as control modules in a machine vision system for histopathologic diagnosis, have shown such networks to be very useful . The practical applications have also shown that Bayesian belief networks possess, as classifiers, unusual numerical response and dynamic range . These characteristics allow their application to classification problems involving multiple diagnostic clues when most of these offer only weak confirming evidence, i.e., to classification tasks not readily manageable by statistical classification techniques.

This research has been suported by a grant from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Md., R 35 CA 538701-02 .

EPITOPES WITHIN THE Ig-LIKE DOMAIN OF THE CD4 MOLECULE ARE LOCALIZED ON A SUBSTANTIAL PROPORTION OF CD8+ LYMPHOCYTES IN HIV PATIENTS

Bauer R, Böhm I

Universitäts-Hautklinik und Poliklinik Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25, D-5300 Bonn 1

The increase of CD8+ lymphocytes and the consecutive decrease of CD4+ cells are the main characteristic immunological phenomenons in HIV1-infection. However, the pathomechanism for the augmented circulation of CD8+ subsets and their function in the immune pathogenesis of HIV-infection are still unsolved. Recent studies demonstrating that even CD8+ cells are targets for HIV1, may provide important clues to answer these questions.
In the present study we investigated epitopes within the Ig-like domain V1 of the CD4 molecule on CD8+ lymphocytes in 31 HIV1-seropositive patients and 37 healthy controls. CD8+ cells of HIV patients and controls were incubated at room temperature for 30 min with two different phycoerythrin-conjugated monoclonal antibodies directed against the Ig-like domain V1 of CD4 and analyzed flowcytometrically to determine their fluorescence intensity. The two anti-CD4-antibodies (SK3 and 13.B.8.2) differ in the CD4 binding site.
We were able to demonstrate a staining of CD8+ cells in HIV patients with the anti-CD4-antibody 13.B.8.2, while the cells of healthy controls did not react. The expression of CD4 epitopes on CD8+ subsets ranges from 10% to 80%. There was an increase of CD4 expression on CD8+ lymphocytes during the course of HIV-infection. 14% of circulating CD8+ cells in stage I of the disease and 35% in stage IV had CD4 epitopes. Another patient suffering of acute mononucleosis also expressed CD4 epitopes on CD8+ cells. Moreover, the anti-CD4-antibody SK3 was neither fixed to HIV nor to the cells of the controls.
The determination of epitopes of the CD4 V1 domain on usually CD4-negative CD8+ cells (possibly induced by infection with human herpes viruses) enlarges the spectrum of potential target cells for HIV1 and may be responsible for their HIV positivity in vivo.

Mikrokernanalyse in Maus-Erythrocyten mittels Slit-Scanning Durchflußzytometrie

Wolfgang Beisker, Jia Cao und Michael Nüsse

GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung,
Arbeitsgruppe Durchflußzytometrie
D-8042 Neuherberg

Zytogenetische Schäden, die durch Chemikalien im Knochenmark induziert werden, können bei der Maus durch die Bestimmung von Mikrokernen in Erythrocyten des peripheren Bluts nachgewiesen werden. Dabei wird die Rate der Mikrokerne in polychromatischen Erythrozyten bestimmt. Eine kürzlich entwickelte Färbetechnik von Grawe et al. (Cytometry 13,1992) erlaubt dabei, durch Anfärbung mit Thiazole Orange (TO) polychromatische (PCE) von normochromatischen (NCE) Erythrozyten zu unterscheiden und simultan durch Anfärbung mit HOECHST 33258 (HO) die Mikrokerne zu bestimmen.

Die Verwendung eines Slit-Scanning Durchflußzytometers mit zwei Lasern (MULTISCAN II) erlaubt die präzise morphologische Unterscheidung von PCE's mit und ohne Mikrokern. Die Pulsbreite eines Mikrokerns (HO-Signal) muß dabei in allen Fällen kleiner als die Pulsbreite des dazugehörigen Erythrozyten (TO-Signal) sein. Ferner können weitere Parameter der Pulsform (wie Skewness und Kurtosis) zur eindeutigen Identifizierung herangezogen werden. Durch die Bestimmung der Pulsfläche des TO-Signals können PCE's von NCE's unterschieden werden. Die hohe numerische Apertur des Systems von NA = 1.25 und die dadurch erreichte Ortsauflösung von $< 1 \mu m$ ermöglicht im Gegensatz zur konventionellen Durchflußzytometrie eine eindeutige Diskriminierung mittels 1-dimensionaler morphologischer Analysen.

In unserem Report werden ferner die Meßergebnisse der Slit-Scanning Messungen mit den Ergebnissen konventioneller Durchflußzytometer (siehe auch Cao et al., Durchflußzytometrische Analyse von Mikrokernen ... ,auf dieser Tagung) verglichen.

Hauptkomponentenanalyse - ein faktoranalytisches Modell zur Bestimmung von Erkennungsmustern in multivariaten morphologischen Gradierungssystemen

Biesterfeld S, Sun DQ

Institut für Pathologie der RWTH Aachen

Morphologische Gradierungssysteme können nur dann in der Prognostik maligner Tumoren sinnvoll angewandt werden, wenn sie zwischen verschiedenen Untersuchern genügend gut reproduzierbar sind. Mit den derzeit gebräuchlichen Gradierungen für das Mammakarzinom (Bloom und Richardson), das Urothelkarzinom (Mostofi) oder das Prostatakarzinom (Gleason), die jeweils aus mehreren Parametern aufgebaut sind, lassen sich Übereinstimmungen zwischen zwei Untersuchern von lediglich 60% bis 70% erzielen.
In dieser Studie wurde versucht, durch Faktoranalyse herauszufinden, inwieweit die geringe Reproduzierbarkeit von Korrelationen bei der Gradierung der Einzelparameter abhängt. Durch faktoranalytische Methoden, z.B. durch Hauptkomponentenanalyse, ist es möglich, die Dimensionen eines Datensatzes zu reduzieren und zu anschaulicheren, einfacheren Komponenten zu gelangen, durch die die im Datensatz aufgetretenen Varianzen am besten erklärt werden.
Als Modell haben wir die Jaffe-Gradierung für Riesenzelltumoren des Knochens (GCT), von drei Untersuchern auf 44 G1- und G2-Tumoren angewandt, ausgesucht, die aus fünf einzelnen Parametern zusammengesetzt ist. Die Berechnung der beiden ersten Hauptkomponenten pro Untersucher erlaubt es, die fünfdimensionalen Beziehungen zwischen den einzelnen Parametern jeweils in ein zweidimensionales System zu überführen und in einem kartesischen Koordinatensystem darzustellen.
Die entsprechenden Wertetabellen und Graphiken lassen erkennen, daß die drei Untersucher verschiedene Erkennungsmuster für die GCT-Gradierung anwenden. Parameter, die bei einem Untersucher eng korreliert sind, d.h. in der Regel gleich gradiert werden, können von einem anderen ganz anders, d.h. weitgehend unkorreliert, verwendet werden. Der Anteil an der Varianz, der durch die Hauptkomponentenanalyse berücksichtigt werden konnte, lag für die drei Untersucher zwischen 73.4% und 93.0%.
Die unterschiedlichen Erkennungsmuster deuten auf unzureichende Definitionen der einzelnen Parameter und machen die zu geringe interspezifische Reproduzierbarkeit morphologischer Gradierungen besser verständlich.

Bestimmung der Repräsentativität DNA-zytometrischer und morphometrischer Parameter durch Varianzanalyse

Biesterfeld S, Wohltmann D, Wolter D, Emmerich M, Striepecke E

Institut für Pathologie der RWTH Aachen

DNA-zytometrische und morphometrische Daten werden in aller Regel stetig erhoben. Jede spätere Klassifizierung, d.h. die Einteilung in bestimmte Gruppen, bedeutet einen Verlust an Information. Für die primäre mathematisch-statistische Bearbeitung kontinuierlich erhobener Daten bietet sich die Varianzanalyse an. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, die Lage eines Wertes bei einer weiteren Messung im Rahmen eines vorgegebenen Vertrauensbereiches einzuschätzen.
In dieser Arbeit wurden 77 Fälle von Glioblastoma multiforme an je zwei unterschiedlichen Stellen des Tumors untersucht. In 28 der 77 Fälle war die Untersuchung einer dritten Stelle möglich. Das Tumormaterial wurde einer Zellvereinzelung unterzogen; nach Herstellung zytologischer Ausstriche und anschliessender Feulgen-Färbung wurden mithilfe eines TV-Bildanalysesystems MIAMED-DNA (Leica, Wetzlar) pro Präparat 250 Meßzellen und 20 Eichzellen gemessen. An Parametern wurden der DNA-Malignitätsgrad, die DNA-Stammlinie, die durchschnittliche Ploidie, die Zahl von Zellen über 5c (5cEE) bzw. 9c (9cEE), die mittlere Kerngröße, der mittlere Kernumfang, der Formfaktor sowie der minimale und der maximale Feret Durchmesser erhoben.
Mithilfe einer Varianzanalyse mit dem Programmpaket SAS wurden 95%-Konfidenzintervalle ermittelt, die die zu erwartende Schwankungsbreite von Meßergebnissen an verschiedenen Stellen der Tumoren widerspiegeln. Um die Breite der Intervalle auch zwischen verschiedenen Parametern besser vergleichen zu können, wurde in einer zweiten Analyse eine Normierung der Werte vorgenommen, indem die Verteilung der Meßwerte auf eine Standardnormalverteilung zurückgeführt wurden. Die Unterschiede, die sich beim Vergleich von 77 Tumoren bei Messungen an zwei Stellen bzw. von 28 Tumoren bei Messungen an zwei und drei Stellen ergaben, lassen erkennen, daß nur in wenigen Fällen von Glioblastomen mehr als zwei Messungen erforderlich sein werden, um zu für den Gesamttumor repräsentativen DNA-zytometrischen oder morphometrischen Werten zu gelangen.
Darüber hinaus werden durch die Varianzanalyse Fehlerterme ermittelt, die helfen, den Anteil des untersucherbezogenen Meßfehlers am gesamten Meßfehler zu schätzen. Für die DNA-zytometrischen Parameter lag er zwischen 9% und 16%, für die morphometrischen Parameter zwischen 6% und 21% des Gesamtfehlers.

EXPRESSION OF AN ABNORMAL CD3/TCR COMPLEX ON PERIPHERAL BLOOD-LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH CUTANEOUS T-CELL-LYMPHOMA (CTCL)

Böhm I, Bauer R

Universitäts-Hautklinik und Poliklinik Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25, D-5300 Bonn 1

CTCL are a heterogeneous group of immunoproliferative disorders with common epidermotropism of CD4+ cell clones. Using monoclonal antibodies (mAb) for staining skin and/or blood cells a variety of subtypes with different prognosis and respond to therapeutic stategies has been discovered.
The aim of the present study was to elucidate these differences in the view of pathogenetic mechanisms. Therefore we analyzed PBMC of 11 patients with CTCL flowcytometrically on a FACScan (Becton-Dickinson) before starting therapy and afterwards. A panel of several mAb (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD20, CD23, CD25, CD29, CD45RA, CD45RO, CD58 and HLA-DR) obtained from Becton-Dickinson and Dianova was applied on whole blood samples to investigate the antigenic profile of these cells.
In 5/11 patients we could demonstrate two populations of T-cells, which were identified by the density of CD3/TCR. The atypical cells were mainly characterized by the expression of CD3+ low CD2+ CD4+ CD5+ CD7- CD19- CD25-. The expressivity of HLA-DR was weak or absent. In some cases $CD3+^{low}$ cells were partly CD4+CD8- and CD4-CD8+, coexisting of CD4+CD8+ has not been found.
In those patients with $CD3+^{low}$ subset densitiy of CD3 was elevated during therapy with retinoids using etretinate alone or in combination with photochemotherapy (PUVA). Simultanously clincal improvement could be observed. No disappearence of $CD3+^{low}$ cells and no benficial effect was seen in those patients receiving aggressive chemotherapeutic drugs. Although the pathogenesis of CTCL remains unclear there is evidence for a viral induction. Moreover, it has been shown that some viruses have the ability to modulate the CD3/TCR-expression. For example, human herpesvirus 6 (HHV-6) elicited CD3/TCR down-regulation. The finding of our research suggests the possible induction of CD3 expression by retinoids and/or PUVA. Moreover, therapeutic regimes should be dependened on the immunolgical phenotype of CTCL and should be accompanied by regular flowcytometric monitoring.

FLOW CYTOMETRIC AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH ANALYSIS OF BREAST CARCINOMAS WITH METASTASES

BA.Bonsing, H.Beerman, P.Devilee, N.Kuipers-Dijkshoorn, GJ.Fleuren, CJ.Cornelisse
Dept. Pathology, University Hospital Leiden, The Netherlands.

DNA ploidy status was analyzed by flow cytometry on frozen and paraffin-embedded tissue blocks taken from primary and metastatic tumor sites in 18 patients with advanced breast cancer. Presumably because of the extensive sampling, high percentages of DNA aneuploidy, DNA multiploidy, and DNA index heterogeneity were found in primary breast carcinomas as well as in lymph-node and distant metastases. DNA aneuploid tumor stemlines were frequently accompanied by DNA diploid tumor stemlines. Most of the DNA tumor stemlines found in the primary tumors recurred in lymph-node (58%) and distant metastases (59%), even after 17 years of distant relapse-free survival. Where single metastases did contain in almost all cases only one of the several primary DNA tumor stemlines, the lymph-node or distant metastases as a whole did reflect the DNA index heterogeneity of the primary tumors. DNA tumor stemlines found in distant metastases often differed from those in lymph-node metastases (61%), which indicates that lymphatic and hematogenous metastases can be generated independently. No DNA ploidy subclass occurred preferentially or was absent in either type of metastasis. This is indicative of similar metastatic capacities of both DNA aneuploid and DNA diploid tumor stemlines in advanced breast carcinomas.

Restriction fragment length analysis (RFLP) was used to provide an allelotype of multiple sampled primary breast carcinomas and lymph-node metastases of nine different patients. Also DNA ploidy status and X-chromosome inactivation patterns were studied. From this small group of patients it could be concluded that the primary tumors contained numerous allelic imbalances on different chromosome arms with no differences related to DNA diploidy or aneuploidy. No indication was found for intra-tumor heterogeneity in loss of heterozygosity in the primary tumors. Additionally, all allelic imbalances present in the primary tumor could also be detected in every single related lymph-node metastases. In concordance with this, the chromosome X-inactivation analysis showed dominance of a single clonal X-inactivation pattern in all primary tumors and lymph-node metastases, indicating the clonal origin of primary breast carcinomas and the allelic imbalances investigated.

ENRICHMENT OF FETAL ERYTHROBLASTS FROM MATERNAL BLOOD FOR ANALYSIS OF THE FETAL GENOME BY PCR

Jürgen Büsch, Jürgen Holtz, Ulrich Heifer and Andreas Radbruch*

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

Fetal erythroblasts occur in maternal blood at frequencies of appr. 10^{-5} among the nucleated cells. We have used combined MACS and FACS cell sorting to enrich these fetal cells for molecular analysis of the fetus' genome by polymerase-chain reaction. The cells were first enriched magnetically according to CD71 expression and then sorted by FACS according to $CD71^{+}$, $CD45^{-}$, PI^{-} and light scatter. In unsorted cells, not even with more than 10^{6} cells, we could detect fetal DQa sequences by PCR, but using approx. 10^{3} sorted cells, we could readily detect those fetal sequences. Thus, MACS/FACS sorting is a rapid and efficient method to enrich rare fetal cells to a frequency sufficient for their analysis by PCR.

Comparative List mode data analysis strategies using 1, 2, 3 and 4 color reagent combinations.

A V Burpee

Applied Cytometry Systems Ltd
Dinnington Business Centre
Outgang Lang, Dinnington,
Sheffield S31 7QY, ENGLAND
TEL: 44-909-566982 FAX: 44-909-561463

Keywords : Boolean gating, Boolean statistics, list mode data analysis.

The improved capabilities of modern flow cytometers has significantly increased the complexity of list mode data analysis. Providing a logical framework for list mode data analysis simplifies the analytical process and significantly reduces the time required to process individual samples.

Incorporating the results of list mode data analysis into an interrogatable database simplifies the preparation of longitudinal and population studies.

Several key issues will be discussed in relation to multi-parametric data analysis and result comparison.

Durchflußzytometrische Analyse von Mikrokernen in polychromatischen und normochromatischen Erythrozyten aus dem peripheren Blut von mit Chemikalien behandelten Mäusen

Jia Cao*, Wolfgang Beisker*, Ilse-Dore Adler+, Michael Nüsse*

*GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung,
Arbeitsgruppe Durchflußzytometrie
+GSF-Institut für Säugetiergenetik, D-8042 Neuherberg

Erythrozyten im peripheren Blut oder im Knochenmark von Mäusen, die nach Verlust des Zellkerns noch Mikrokerne aufweisen, werden als Indikator für zytogenetische Schäden angesehen, die durch Chemikalien im Knochenmark induziert wurden. Der Mikrokern-Assay im Knochenmark von behandelten Mäusen ist deswegen eine weithin anerkannte Methode, mögliche klastogene oder Aneuploidie-induzierende Wirkungen von Chemikalien nachzuweisen. Wegen der geringen Häufigkeit von Erythrozyten mit Mikrokernen sind aufwendige und u.U. mit erheblichen Fehlern behaftete mikroskopische Analysen notwendig. Nach Modifikation eines von Grawe et al. (Cytometry 13, 1992, im Druck) entwickelten neuen durchflußzytometrischen Verfahrens wurde die Mikrokern-Induktion durch Colchicine (COL) und Mitomycin C (MMC) in polychromatischen (PCE) und normochromatischen (NCE) Erythrozyten aus dem peripheren Blut von behandelten Mäusen untersucht. Thiazole Orange (TO) Färbung diente zur Unterscheidung von PCE und NCE, Mikrokerne in PCE und NCE wurden simultan mit HOECHST 33258 (HO) angefärbt. Forward Scatter, Side Scatter, TO- und HO-Fluoreszenz wurden simultan nach Anregung mit zwei Lasern gemessen. PCE und NCE mit Mikrokernen (MPCE und MNCE) konnten durch diese Messung eindeutig identifiziert und quantifiziert werden. Die Mikrokernhäufigkeit stimmte sehr gut mit mikroskopischen Messungen überein. Nach Behandlung von Mäusen mit COL (0.5 - 1.5 mg/kg) und MMC (0.5 - 2 mg/kg) wurde ein dosisabhängiger Anstieg nach 24 h mit nachfolgendem Abfall der Häufigkeit von MPCE beobachtet, während die Häufigkeit von MNCE konstant blieb.

CELL KINETICS OF ACUTE LEUKEMIA STUDIED WITH IN VIVO BROMODEOXYURIDINE, CELL CYCLE-RELATED ANTIGEN EXPRESSION AND MULTIPARAMETER FLOW CYTOMETRY

Danova M.[1] Giordano M.[1], Riccardi A.[1], Wang E.[3], Mazzini G [2].

[1]2nd Medical Clinic, [2]Centro Studio Istochimica CNR, Univ. and IRCCS S.Matteo - Pavia, ITALY, [3] Lady Davis Inst., McGill Univ.- Montreal, CANADA.

In vivo BUDR infusion coupled with bivariate (BUDR/DNA) FCM fournishes, beside the S-phase fraction, the time parameters of cell proliferation (i.e the tumor potential doubling time, Tpot) of the whole leukemic population. FCM bivariate analysis of two proliferation-associated antigens: PCNA (as a measure of the growth fraction,GF), and of STATIN (specific for cells that have gone out of cycle) make it possible to derive kinetic parameters only for cells actively engaged in cell proliferation.
Using both these approaches, we studied the pre-treatment proliferative activity of 60 pts with ANLL (subsequently treated with the same induction therapy) and of 15 pts with normal bone marrow (BM).
The overall proliferative activity of leukemia was lower than normal myelopoiesis (Tpot:17.7 vs 3.5 days) and there was a trend for an high proliferative activity to be a favorable prognostic factor for ANLL pts. Considering PCNA/STATIN expression, the proliferative activity of ANLL GF became closer to that of the normal BM (Tpot:9.7 vs 3.1 days). The kinetic differences of PCNA/STATIN positive cells between CR and non NR pts (Tpot:6.9 vs 12.5 days, $p<.02$) and between pts with different CR duration (Tpot:6.4 vs 11.4 days, $p<.02$) and survival (Tpot:5.8 vs 9, $p<.02$) became statistically highly significant. On multivariate analysis (including clinical and biological parameters) time parameters of ANLL GF reached an independent prognostic value. Our data reinforce the clinical value of pre-treatment proliferative activity in ANLL.
Supported by CNR, MURST, AIRC and IRCCS S.Matteo.

Changes in Viability and Surface Markers of Lymphocytes after Exposure to Ionizing Radiation

A. Dehos*, M. Simkó*, R. Kriehuber*, H. Czempiel**, C. Egblomassé*, S. Meier*

* Institute for Radiation Hygiene, Federal Office of Radiation Protection

** Department of Radiotherapy, Hospital of München-Schwabing

It is well known that ionizing radiation affects the immune system. Therefore it should be investigated whether immunological parameters could be used as biological indicators for radiation exposure.

One of the effects of ionizing radiation after in vivo exposure is a decrease in the number of lymphocytes whereby the various subpopulations are differently sensitive. It seems, however, that lymphocytes are more resistant to in vitro irradiation. Differences in the viability of the cells but also changes in the expression and presentation of surface antigens have to be taken into account by explaining these observations.

Mononuclear cells isolated from peripheral blood of healthy persons are irradiated in vitro and incubated for several days. Subpopulations of lymphocytes and the viability of cells are then determined by flow cytometry using monoclonal antibodies and DNA-dyes (usually propidium iodide). Unirradiated mononuclear cells from the same person are used as control.
Subpopulations of lymphocytes in radiotherapy cases are determined by the same method. Patients are divided into groups according to location and size of the irradiated field.

Whereas dead cells are never observed in peripheral blood even of radiotherapy patients, the number of dead cells increases dependent on dose and time in lymphocyte cultures. Moreover the distribution of the subpopulations is different within dead and living cells and after in vitro and in vivo irradiation. Therefore dose-effect relationships after in vitro and in vivo irradiation are difficult to compare.

WERTIGKEIT DER PLOIDIEBESTIMMUNG VON BIOPSIE-TUPFPRÄPARATEN BEI UROTHELTUMOREN MITTELS IMAGE ANALYSE

M. Eisenmenger, A. Föger, R. Simak, M. Marberger, H. Wiener

Einleitung:

Die Ploidiebestimmung mittels Durchflußzytometrie von Operationspräparaten nach transurethraler Resektion, Zystektomie und Nephroureterektomie wegen urothelialer Tumore ist eine anerkannte Methode (1). In Fällen der Entnahme von Biospien aus der Schleimhaut erfordert die Erstellung der histopathologischen Diagnose häufig die konventionelle Aufarbeitung des gesamten gewonnenen Materials. Eine DNA-Evaluierung mittels Durchflußzytometrie ist somit wegen Materialmangels nicht möglich. Eine mittels Image Analysis System durchgeführt DNA-Bestimmung an Tupfpräparaten bietet sich als alternative Methode an, und Dokumentation ihrer Wertigkeit war Ziel der durchgeführten Studie.

Methodik:

Bei 25 Patienten mit Verdacht auf urothelialen Tumor wurden von entnommenen Biopsien Tupfpräparate angefertigt. Die sprayfixierten Präparate wurden nach der Feulgen-Schiff Methode gefärbt. Die DNA-Bestimmung an mindestens 200 Zellen erfolgte selektiv mit dem Bildanalyse System VIDAS (Zeiss-Kontron, BRD).

Bei ausreichender Materialmenge wurde auch eine durchflußzytometrische Untersuchung durchgeführt (PI-Färbung, FACS-Scan, Becton Dickinson).

In allen Fällen wurde die erstellte Ploidieanalyse mit dem histopathologischen Tumor-Staging und -Grading korreliert.

Resultate und Konklusion:

Die erzielten Resultate erlauben den Schluß, daß die Ploidiebestimmung von Biopsie-Tupfpräparaten aus der Blasenschleimhaut eine wertvolle Ergänzung zur konventionellen histopathologischen Diagnose darstellt, ohne diese - bei umsichtiger Handhabung - zu beeinträchtigen. Bei Vergleichen von DNA-Histogrammen, simultan mittels Image Analyse und Durchflußzytometrie erstellt, wurde eine Übereinstimmung von etwa 90% gefunden. Die Ergebnisse sind in Analogie zu bereits publizierten Vergleichsdaten an Blasenspülflüssigkeiten (2). Somit stellt die Bestimmung des DNA-Verteilungsmuster mit Hilfe der Image Analyse eine wichtige und einfach durchzuführende Entscheidungshilfe für den klinisch tätigen Arzt dar.

Referenzen:

(1) Gustafson H, Tribukait B. Characterization of bladder carcinomas by flow DNA analysis. Eur. Urol. 11: 410-417, 1985

(2) Koss LG, Wersto RP, Simmons DA, Deitsch D, Herz F, Freed SZ. Compararison of flow cytometry, image cytophotometry, and cytology in patients with a past history of urothelial tumors. Cancer 64: 916-924, 1989

Reproduzierbarkeit bei interaktiver Tumorzellkern-vermessung an histologischen Routineschnittpräparaten von Mammakarzinomen

Engels K, Strohmeier R, Ackermann H[1], Schnürch H-G

Universitäts-Frauenklinik und [1]Institut für Biomathematik
Universität Frankfurt/M.

Die begrenzte Reproduzierbarkeit mikroskopischer Beurteilungssysteme (Grading) für Tumore war Anlaß, die Reproduzierbarkeit morphometrischer Messungen zu überprüfen.

HE-gefärbte histologische Schnittpräparate aus der Routinehistologie von 50 Mammakarzinomen wurden von 2 Untersuchern je zweimal vermessen. Die Messungen wurden an einem IBAS1-Morphometriegerät der Firma Kontron mit dem Kontron-Meßprogramm Version 5.42 bei 3660facher Gesamtvergrößerung durchgeführt. Die intra- und die interpersonelle Reproduzierbarkeit der Mittelwerte und der Standardabweichungen der Kernfläche, des Kernumfanges, des maximalen Kerndurchmessers, zweier Formfaktoren, der Nukleolenfläche, der Nukleus-Nukleolus-Relation und der Zell- und Mitosendichte wurde ermittelt. Die Beschreibung der Reproduzierbarkeit erfolgte durch Äquivalenzintervalle, wobei eine Abweichung von weniger als +/-10% bzw. +/-20% als Äquivalenz beschrieben wurde. Zusätzlich wurde für den Mittelwert der Kernfläche und für die Mitosendichte eine metrische Dreierklassierung zur Darstellung der Ergebnisse verwendet.

Die zwei Formfaktoren und der maximale Kerndurchmesser zeigten die höchste Reproduzierbarkeit, die Zell- und Mitosendichte die niedrigste. Die intra- gegenüber der interpersonellen Reproduzierbarkeit war höher bei der Kernfläche, der Nukleolenfläche und der Nukleus-Nukleolus-Relation. Die Reproduzierbarkeit der Klassierung war für die Kernfläche (80-86%) höher als für die Mitosendichte (58-78%).

Durch computerunterstützte Morphometrie kann die Reproduzierbarkeit histologischer Feindiagnostik nur geringfügig gegenüber dem konventionellen Grading gesteigert werden.

EIN 4-PARAMETER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHES DATENSYSTEM AUF EINER PC-EINSTECKKARTE

Ch. Farrenkopf, V. Kachel
Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried

Personal Computer werden heute auch für die Datenaufnahme und Meßwertverarbeitung von Durchflußzytometern verwendet. Durchflußzytometer liefern ihre Daten in Form von Impulsen, deren Erfassung und digitale Verarbeitung mehr Aufwand erfordert als nur die Aufnahme konstanter Gleichspannungen.

Es wird eine Einsteckkarte für IBM-AT kompatible PCs beschrieben, die alle notwendigen Elemente für die durchflußzytometrische Impulsverarbeitung von 4 Meßparametern enthält. Zur Optimierung der Digitalisierungsgeschwindigkeit werden parallele 12-Bit Analog-Digital-Wandler verwendet mit einer Gesamtwandelzeit von 4,25 µs für 4 Parameter. Jeder Parameter verfügt über eine softwarekontrollierte Triggerschaltung mit Peakdetektor. Die digitalisierten 12 Bit Werte, die mit weiteren 4 Bits zur Parameteridentifikation versehen werden können, werden zunächst in einem FIFO Speicher, der bis zu 512 Werte aufnehmen kann, zwischengespeichert. Über DMA (Direct Memory Access) werden die Meßwerte dann von dort in den Arbeitsspeicher des PC übertragen. Durch die schnelle parallele Wandlung mit FIFO-Zwischenspeicherung der Meßwerte lassen sich auch noch im Abstand von ca. 10µs aufeinanderfolgende Zellen ohne Verlust erfassen.

Wenn eine Datenaufnahme von mehr als 4 Parametern notwendig ist, kann jeweils eine Mutterkarte für 4 Parameter mit einer Tochterkarte für 4 weitere Parameter kombiniert werden.
Für kinetische Messungen kann ein in Zeitschritten von 1/10 Sekunden programmierbarer Timer auf einen der Parameterkanäle gelegt werden.

Die Karte wird mit der LIST-PC Software betrieben (1).

(1) Kachel V., Messerschmidt R., Hummel P.: Eight Parameter PC-AT Based Flow Cytometric Data System. Cytometry 11:805-812,1990

SUBGRUPPENANALYSE VON CD34+ PRÄ-B-ZELLEN BEI PATIENTEN MIT MONOKLONALEN GAMMOPATHIEN UND NORMALSPENDERN.

Frühauf S, Haas R, Hunstein W

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Abt. V, Heidelberg

Es ist bekannt, daß beim Plasmozytom (MM) neoplastische prä-B-Zellen in Knochenmark (KM) und peripherem Blut (PB) das CD10 Antigen tragen. Andererseits wird in präklinischen Studien bereits die Anreicherung CD34-positiver lymphohämatopoetischer Vorläuferzellen zur Tumorzelldepletion des autologen Knochenmarktransplantats beim MM eingesetzt. Ziel dieser Untersuchung war es zu klären, ob sich bei Patienten mit monoklonalen Gammopathien eine Vergrößerung der CD34+ prä-B-Zell Population findet.

Es wurden KM und PB von 14 Patienten mit Plasmozytom, 1 benigne monoklonale Gammopathie und von 5 Normalspendern untersucht. Für die Zwei- und Dreifarben-Durchflußzytometrie wurden die direkt markierten Antikörper HPCA2 (CD34), J5 (CD10), Leu12 (CD19) und Leu17 (CD38) verwendet. Zur CD34-Subgruppenanalyse erfolgte die Aufnahme der Zellen mittels entsprechender Gates.

Nach Ammonium-Chlorid-Lyse betrug der Anteil der CD34+ Vorläuferzellen im Knochenmark 0.45% ± 0.09% (MM, Mittelwert ± Standardfehler, n=11), bzw. 0.78% ± 0.05% (n=5) bei den Normalspendern. Dies war mehr als zehnmal so viel wie im peripheren Blut. Bei MM lag der Anteil CD38+ Plasmazellen im KM bei 9% ± 11%, bei Normalspendern < 0.5%.
Eine Expansion des CD34+ prä-B-Zell Kompartments bei MM wurde weder im KM noch in PB beobachtet. Allerdings fiel auf, daß nur ein geringer Anteil früher B-Vorläuferzellen im PB zirkulierte: KM (MM) CD34+/CD19+ 21% ± 13% (n=14) der CD34+ Zellen versus PB (MM) CD34+/CD19+ 5% ± 4% (n=13). Ähnliche Werte ergaben sich für die CD34+/CD10+ Subgruppe. Bei der Drei-Farben Immunfluoreszenz zeigte sich, daß im KM fast alle CD34+/CD19+ Zellen das CD10-Antigen koexprimieren. Im KM nahm die CD19 Expression bei CD34+/CD10+ Zellen von negativen Werten ausgehend kontinuierlich zu. Im Gegensatz dazu trugen peripher zirkulierende prä-B-Zellen vorwiegend den CD34+/CD10+/CD19- Phänotyp.

Obwohl das frühe B-Zell-Kompartment bei MM anteilsmäßig unauffällig war, läßt sich durchflußzytometrisch nicht unterscheiden, ob es sich dabei ausschließlich um normale lymphohämatopoetische Vorläuferzellen handelt. Periphere Blutstammzellen enthalten einen geringeren Anteil CD34+ prä-B-Zellen als im KM und bieten sich damit als Stammzellquelle für die autologe Transplantation beim MM an.

Isolation of fetal cells from maternal blood by a combination of density gradient centrifugation and magnetic cell sorting

H.S.P. Garritsen[1], D. Gänshirt-Ahlert[2], A. Dohr[2], E. Helmer[2], C. Walde[2] and W. Holzgreve[2]
Departments of Hematology (1) and Obstetrics and Gynecology (2), University of Münster, FRG

The occurence of fetal nucleated cells within maternal circulation has raised hopes for a noninvasive method of prenatal diagnosis. By application of the polymerase chain reaction, this goal appears to be accessible. Attempts to amplify Y-specific sequences form the deoxyribonucleic acid of pregnant women have shown that the number of fetal cells in maternal circulation is extremely small, ranging within the lowest detection limit even of the polymerase chain reaction. The risk of contamination is most prevalent at the highest level of sensitivity and often leads to false-positive results. This risk of contamination caused several authors to evaluate methods for enrichment of fetal leukocytes, nucleated red blood cells or trophoblast cells before polymerase chain reaction analysis.
We evaluated a combination of triple density gradient centrifugation and magnetic activated cell sorting (MACS) to enrich for fetal nucleated red blood cells. Using fluorescence in situ hybridization (FISH) we were able to detect 12-14% cells with three signals inpregnancies with trisomie 18 at different gestational ages as opposed to 2-4% in controls. There was no overlap in the frequency of positive cells between the normal pregnancies and those of trisomic fetuses. In adult male and nonpregnant female controls no nucleated erythrocytes were detected. Because our new approach was successful not only retro-, but also prospectively, this cheap and easy to perform method is suitable now for further large-scale clinical evaluation

Mehrfachgebärende?

Alle schwangeren Frauen positive für fetal cells?

Welche Marker?

Combined analysis of prognostic parameters in neuroblastoma

M. Gehring[1], D. Haag[2], K. Goerttler[2] and M. Schwab[1]

[1]German Cancer Research Center, Department of Cytogenetics, Heidelberg, FRG
[2]University of Heidelberg, Institute of Comparative and Experimental Pathology, Heidelberg, FRG

Neuroblastoma, a neural crest-derived tumor, is the most common solid tumor in children. The frequency is about 1:10000. Most often the tumor appears at the age of approximately two years. The causes of the tumor development are not known yet, but three different molcular changes were found: "double minutes" (DMs), homogeneously staining chromosomal regions (HSRs) and deletions of the chromosome 1p region.
The tumor stage and the patients age at diganosis are the most reliable clinical parameters to predict the patients outcome. In our study we analyzed neuroblastoma tissues by DNA flow cytometry for their total DNA content and by Southern blotting for their N-*myc* gene copy number. We investigated the relationship of each of these two parameters to the prognostic parameters of age and stage.
Our study revealed that aneuploid DNA content or low N-*myc* gene copy nuber is significantly associated with the favourable prognostic parameters of low age and Evans' stage I, II, IVs. In contrast diploid or tetraploid DNA content of high N-*myc* gene copy number is significantly associated with the unfavourable prognostic paramters of higher age and Evans' stage IV.

Eigenschaften eines Piezo - Sorters

Göhde,W.*, Schmidt,E.-M.** und Tatchen,I.*
* Institut für Strahlenbiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität, Hittorfstr. 17, 4400 Münster
**Partec GmbH, Hüfferstr. 73-79, 4400 Münster

Zwei Zellsortierverfahren haben dadurch eine gewisse Verbreitung gefunden, daß sie in kommerziell erhältlichen Flowcytometern eingesetzt werden. Für die ältere Methode ("Tröpfchen"- Sorter) liegen zahlreiche Beschreibungen, Erfahrungen und Ergebnisse vor. Für das neuere Sortierverfahren ("Piezo-Sorter") können wir jetzt über etwa 6 Jahre eigene Erfahrung beim Sortieren unterschiedlicher Partikel berichten.

Für die Entwicklung des Piezo-Sorters gab es eine Reihe von Vorgaben:

1. Der Sorter sollte geschlossen sein, um steril und ohne Gefährdung des Bedienungspersonals durch pathogene Keime und cancerogene Fluorochrome arbeiten zu können.
2. Der Sorter sollte sowohl kleinere als auch größere Partikel sortieren können.
3. Der Sorter sollte den Partikeln keinen mechanischen Stress zufügen, damit auch fragile Partikel sortierbar sind.
4. Der Sortiervorgang sollte vollständig Rechner-kontrolliert sein. Er sollte möglichst alle Partikel im Sortierfenster aussortieren (z.B. "Löcher" im Zellzyklus).

Das Erreichen dieser Ziele wird durch Abbildungen belegt. Partikel von Chromosomengröße bis zu Langerhansschen Inseln lassen sich sortieren. Fragile Pflanzenprotoplasten und Protoplasten-hybride werden nicht geschädigt. Jede Form von Sortierfenstern, auch konkave Formen und 1-Kanal breite Fenster, können benutzt werden.

Die Sortiergeschwindigkeit beträgt: input-Rate bis zu 20.000 Partikel pro Sekunde, output in Abhängigkeit von der gewünschten Reinheit der Sortierfraktion bis zu 400 pro Sekunde. Die Reinheit der Sortierfraktion kann abhängig von der Geschwindigkeit über 95% betragen.

Es erweist sich als Vorteil des Piezo-Sorters, daß Meßstelle und Ablenkungsstelle nur 50 µm voneinander entfernt sind. Der Ablenkungsvorgang kann daher visuell oder mit einer TV-Kamera direkt beobachtet werden, eine zeitraubende Einstellung der "delay-time" entfällt. Das Sortierprinzip führt zu einer Verdünnung der sortierten Partikel, da ständig Lösung (1ml pro min.) in den Sortierkanal fließt.

In-situ Nick Translation zum Nachweis von Apoptose in Durchflußzytometrie und auf Gewebeschnitten

R. Gold [1], G. Rothe [2], M. Schmied [3], H. Zischler [1], G. Valet [2], H. Wekerle [1], H. Lassmann [3]

Max-Planck-Institut für Psychiatrie [1], Martinsried
Max-Planck-Institut für Biochemie [2], Martinsried
Institut für experimentelle Neuropathologie [3], Universität Wien

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein Phänomen das für Immunologie, Entwicklungsbiologie und Tumorbiologie gleichsam interessant ist. Unabhängig vom Zelltyp läuft die Apoptose aber nach ähnlichem biochemischen und morphologischen Muster ab, in dessen Mittelpunkt jeweils die DNA-Fragmentation durch Endonucleasen steht. Bisher erfolgte der Nachweis von Apoptose auf Einzelzellebene anhand **indirekter Kriterien**, nämlich dem morphologischen Nachweis von Chromatinkondensation oder anhand verminderter Fluoreszenz von DNA-Farbstoffen. Wir stellen eine Methode vor, die an den molekularen Grundlagen der Apoptose ansetzt und die entstehenden DNA-Strangbrüche durch in-situ Nick Translation mit Fluorescein-12-dUTP oder Digoxigenin-11-dUTP markiert. Dadurch ist eine **spezifische Analyse** von Apoptose auf zellulärer Ebene, sowohl durchflußzytometrisch als auch auf Gewebeschnitten, möglich.

Zur Etablierung des Assays benutzten wir ein gut charakterisiertes in-vitro Modell : durch Röntgenbestrahlung wurde bei frisch präparierten Rattenthymozyten innerhalb von 8 Stunden Apoptose induziert. Nach Fixation mit 4 % Paraformaldehyd und Permeabilisierung mit 0.025 % NP-40 wurden die Zellen über Nacht bei 37°C mit DNA-Polymerase I und Fluorescein-12-dUTP inkubiert. Der spezifische nukleäre Einbau von Fluorescein-12-dUTP ließ sich durch konfokale Laserscanmikroskopie und Energietransfer-Studien auf Propidiumiodid gefärbte DNA nachweisen. Die durchflußzytometrische Auswertung von Thymozytenapoptose nach verschiedenen Strahlendosen (100 - 2000 rad) sowie ihre Hemmung durch Cycloheximid, einem Proteinsynthese-Inhibitor, stimmten mit Literaturdaten überein. Weiterhin fand sich eine Korrelation der FACS-Daten mit der morphologischen Beurteilung von DNA-Kondensation und dem gelelektrophoretischen Nachweis von DNA-Fragmentation .

Die Methode konnte auch auf heterogene Zellsysteme und auf Gewebeschnitte übertragen werden. Während Phycoerythrin-Cy5 Konjugate zur indirekten Markierung von Oberflächen- oder zytoplasmatischen Antigenen in in-vitro Systemen benutzt wurden, verwandten wir auf Gewebeschnitten Digoxigenin-11-dUTP und Alkalische Phosphatase/PAP zur Doppelmarkierung mit permanenten Farbstoffen.

Zusätzlich setzten wir bei in-vitro Systemen eine Photomarkierungstechnik mit Ethidummonoazidbromid (EMA) ein um Zellen, die vor der Fixation bereits tot waren, zu markieren. EMA bindet kovalent an die DNA toter Zellen und ist deshalb auch nach Fixation und Permeabilisierung der Zellen noch nachweisbar. So kann spezifisch zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden: bei letzterer kann in späten Stadien des Zelltods ebenfalls unspezifische DNA-Fragmentation auftreten.

In-situ Nick Translation benutzt molekulare Grundlagen um Apoptose auf zellulärer Ebene spezifisch nachzuweisen. Sie stellt eine schnelles und verläßliches System für den Nachweis und die Untersuchung pathogenetischer Mechanismen der Apoptose in verschiedenen Forschungsbereichen dar.

CA^{++}-ANTAGONISTS NIFEDIPINE AND NITRENDIPINE ARREST SMOOTH MUSCLE CELLS IN G_0/G_1-PHASE

J. Hankowitz, G. Schmitz

Institute for Clinical Chemistry, University of Regensburg, Regensburg, F.R.G.

Various animal studies, and most recently human studies, show that treatment with calcium antagonists slows the progression of atherosclerosis at the stage of early lesions. However, the precise mechanism by which calcium antagonists modulate the cells involved in the atherosclerotic process remains unclear. A hallmark of atherosclerosis is the migration of smooth muscle cells (SMC) into the intima, where they transform into a synthetic phenotype. Therefore, we analyzed the effects of calcium antagonists on cell cycle distribution in SMC by a flow cytometric method. A cell culture model was established, in which SMC are synchronized as a subconfluent monolayer in a resting state (G_0/G_1-phase). Subsequently, these cells were shifted into a proliferating synthetic phenotype by addition of a defined amount of serum in the presence or absence of the drugs. Nifedipine and nitrendipine delay the transition of SMC into a synthetic phenotype, whereas the enantiomers of nimodipine and the calcium channel agonist BayK 864 exert no significant changes. In contrast, in endothelial cells, which do not possess voltage operated calcium channels, these drugs have no significant influence on cell cycle distribution.

In summary, we conclude that flow cytometric cell cycle analysis is an appropriate tool to simulate pathological events of the vessel wall in vitro.

FLOW CYTOMETRIC DNA-ANALYSIS IN PRIMARY BREAST CANCER: S-PHASE FRACTION AND PLOIDY AS PROGNOSTIC FACTORS AND THEIR CORRELATION TO TUMOR-CELL ASSOCIATED PROTEASES.

N. Harbeck, E. Schüren, N. Yamamoto, L. Pache, M. Schmitt, F. Jänicke, P. Dettmar*, H. Höfler* and H. Graeff.

Frauenklinik und *Pathologisches Institut der Technischen Universität, München.

The clinical impact of flow cytometric DNA analysis depends very much on the qualtity and reproducibility of the technique used for sample processing. In our laboratory we have developed and applied an improved technique for extraction of pure nuclei from formalin-fixed, paraffin-embedded sections based on Hedley`s method (1983).

Paraffin sections of 153 primary breast cancer patients were then evaluated by flow cytometry for ploidy and S-phase fraction (SPF). Thirty-nine tumors (25%) were diploid, 114 tumors aneuploid. S-phase was only determined in diploid tumors, and an optimal cutoff of 7 % was found using the CART method. Thus, of the 35 (90%) diploid tumors for which S-phase determination was possible, 24 (69%) had a low and 11 (31%) had a high SPF. No correlation was found between ploidy status or SPF and established prognostic factors, except for an inverse correlation between estrogen receptor status and SPF in diploid tumors. No significant impact of ploidy on relapse-free or overall survival could be seen. However, S-phase fraction (SPF) in diploid tumors was a statistically significant prognostic factor for relapse-free survival ($p = 0.02$): patients with low SPF in their tumors had a significantly longer relapse-free survival than those with high SPF.

Tumor-cell associated proteases like urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 are new and strong markers for invasion and metastasis. They have a significant prognostic impact on relapse-free as well as overall survival in primary breast cancer. No correlation between u-PA and established prognostic factors was found. However, there was a significant positive correlation between PAI-1 and S-phase fraction ($p < 0.05$) as well as an inverse correlation between PAI-1 and hormone receptor status. Thus, PAI-1 might be a marker not only for metastasis but also for proliferation.

MEHRPARAMETRIGES "OPTISCHES SORTIEREN" DURCH BILDAUFNAHME AUS DEM DURCHFLUSS

R. Hüller, E. Glossner, J.Weingärtner, V.Kachel
Max-Planck-Institut fär Biochemie, D-8033 Martinsried

Sortieren von Zellen und Organismen aus dem Durchfluß ist ein relativ aufwendiges Verfahren. Es wird heute oft benutzt, um Zellen und Organismen, die durch bestimmte, meßbare Eigenschaften charakterisiert sind, auch morphologisch oder taxonomisch einzuordnen. Die sortierten Objekte müssen zunächst im Sortiergefäß wiedergefunden werden und dann für die Mikroskopie präpariert werden.

Dieses "Analytische Sortieren" kann durch die meßwertgesteuerte Bildaufnahme aus dem Durchfluß vereinfacht werden. Meßobjekte, die durch bestimmte Meßwerte charaketerisiert sind, werden sofort aus dem fließenden Strom heraus mit ausreichender Auflösung abgebildet.

Für den Einsatz in der Meeresforschung entstand ein sog. Macro Flow Planktometer, das Planktonorganismen von 0,1 bis ca. 2 mm Länge nach Volumen und Fluoreszenz analysieren kann. Als Option kann dieses Gerät mit einem Bildaufnahmesystem ausgerüstet werden, dessen Funktion vom analytischen Teil kontrolliert wird.

Das Bildsystem wird kurz beschrieben. Mit Artemien als Modelloranismen werden praktische Anwendungen der selektiven Bildtriggerung demonstriert. Es wird gezeigt, wie durch ein- und mehrparametrige Entscheidungsfenster gezielt Videobilder von Organismengruppen gewonnen werden können, aus denen deren morphologische Eigenart und zahlreiche körperliche Details erkannt werden können.

Mehrfluoreszenzfarbstoffanalyse zum Nachweis unterschiedlicher Mikroorganismenspezies

Hutter, Karl-Josef

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 280, 6900 Heidelberg 1

In der mikrobiellen Analytik werden sehr selten durchflußzytometrische Untersuchungsmethoden eingesetzt. Gründe hierfür sind u.a. die geringen DNS-Gehalte der Mikroorganismen, ihre mannigfaltigen Wachstumsformen und ihre Neigung zur Bildung großer Zellkollektive.

Durch die Produktion neuer Fluoreszenzfarbstoffe und verbesserten Fluorochromkonjugaten ist nun die Möglichkeit gegeben unterschiedliche Mikroorganismenspezies mit vier Fluorochromen zu markieren und simultan mit der Wellenlänge 488 nm anzuregen und durchflußzytometrisch nachzuweisen. Mit der Fluoreszenzfarbstoff-Kombination bestehend aus FITC, CY5, TRITC und PE können so einige vergesellschaftete Mikroorganismen wie Bakterien, Kokken und Hefen durch spektrale Trennung unterschieden werden.

Proliferationsstudien an Leukämiezellinien nach Stimulation mit verschiedenen Differenzierungs- und Wachtumsfaktoren

R.Jäger, A.Scriba, J.Heymanns, K.H.Pflüger

Klinikum der Philipps-Universität, Zentrum für Innere Medizin, Abt. Hämatologie/Onkologie/Immunologie, Baldingerstaße, 3550 Marburg

Akute myeloische Leukämiezellen (AML) zeigen eine hohe Proliferationskapazität und können in vitro unter bestimmten Stimulationsbedingungen mehr oder weniger zu reifen Endzellen differenzieren.
Das Studium der Proliferationsvorgänge erfordert sehr zeit- und materialaufwendige Analysen mit großen Kulturansätzen.
Durch die Flowzytometrie ergibt sich die Möglichkeit, diese Prozesse schnell und quantitativ zu erfassen.
Bromdesoxy Uridin (BrdU) ist ein halogeniertes Basenanalog, welches für Thymidin während der Replikation der Zelle in die DNA eingebaut wird. Mit einem monoklonalen FITC-konjugiertenanti-BrdU Antikörper lassen sich die in der S-Phase befindlichen Zellen durchflußzytometrisch bestimmen.
Durch eine simultane DNA Färbung mit Propidium Iodid kann man über den DNA Gehalt die Ruhephasen (G1/G2) des Zellzyklus bestimmen.
Mit dieser Methodik lassen sich Proliferation und Zellzyklusanalysen gut darstellen.
Wir haben einen BrdU Assay speziell für akute myeloische Leukämiezellinien mit hoher Reproduzierbarkeit etabliert. Die Zellinien LG3 (AML)in RPMI1640+SIT, GK37 (AML)in RPMI1640+9%FCS, KG1 (AML) in RPMI1640+9%FCS, HL60 (AML) in RPMI1640+9%FCS dienten als Untersuchungsmaterial.
Vorversuche zeigten, daß die LG3 und KG1 Zellen sich in einer 5- tägigen Hungerkinetik in RPMI ohne Selen, Insulin, Transferrin (SIT) bzw.FCS sehr schlecht synchronisieren liessen.
Nach 5 Tagen befanden sich noch über 55%Zellen in der Synthesephase und 38% in der G1-Phase.
Bei GK37 und HL60 dagegen fand man nach 5 Tagen nur etwa 15-18% BrdU positive Zellen und ca. 70% Zellen in der G1-Phase.
Wir haben mit folgenden Substanzen stimuliert: Retinsäure, TPA, Vit.D3, DMSO, GM-CSF, IGF-1 + -2 mit Bindungsprotein, verschiedene Interleukine und Pharmaka.
Die Ergebnisse zeigen, daß sich mit diesem Testverfahren auch feinste Unterschiede im Wachstumsverhalten nach einer Stimulation bestimmen lassen.

Detektion intrazellulärer Cytokine

Jung T, Schauer U, Rieger C

Universitäts-Kinderklinik im St. Josef Hospital, Ruhruniversität Bochum

Cytokine können von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden, was die Notwendigkeit einer Bestimmungsmethode zur funktionellen Charakterisierung einzelner Zellen in einem heterogenen Verband deutlich macht. Cytokinmessungen auf Einzel-Zell-Niveau sind daher sowohl für die immunologische Forschung als auch für die klinisch immunologische Diagnostik als Funktionsparameter von immunkompetenten Zellen von Interesse.

Wir beschreiben hier die Etablierung eines durchflußzytometrischen Assays zur Bestimmung von Cytokin produzierenden Zellen in humanen mononukleären Zellen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz. Angelehnt an eine bereits existierende Methode für die Fluoreszenz-Mikroskopie (1) wurden die Zellen nach Aktivierung mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit 0.1% Saponin permeabilisiert. Diese schonende Behandlung ermöglichte zusätzlich die Phenotypisierung mit Oberflächenmarkern. Das Signal/Rausch Verhältnis wurde durch den Einsatz des Proteintransport-Hemmers Monensin erhöht, was die Messung von IL-4 und IL-5 produzierenden Zellen erst ermöglichte (1-4%).

Der Einsatz Isotyp unterschiedlicher monoklonaler Antikörper gegen Cytokine und Isotyp spezifischer Zweit-Antikörper machte die simultane Detektion von bis zu drei Cytokinen mit einem FACScan möglich. Alternativ konnten zwei Cytokine mit einem Oberflächenmarker oder ein Cytokin mit zwei Oberflächenmarkern bestimmt werden. Die Bestimmung intrazellulärer Cytokine von 9 T-Zell Klonen hinsichtlich der Produktion von IFN-gamma, IL-2 und IL-4 zeigte in 25 von 27 Messungen eine Übereinstimmung mit den Cytokinbestimmungen der Zellüberstände.

Die beschriebene Methode ist schnell und semiquantitativ. Sie erlaubt die Interaktion von Zellen des Immunsystems nach Aktivierung zu studieren. Ferner lassen sich klonierte Zellen auf ihr Cytokinmuster untersuchen. Für das klinisch immunologische Labor ergeben sich möglicherweise Indikationen bei der Charakterisierung von immundefizienten Patienten, sowie beim Monitoring einer immunsuppressiven Therapie.

1. Sander et al. 1991. Immunol Rev 119:65

Sorting of rare cells : Positive Selection of CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells in Human Peripheral Blood by Magnetic Cell Separation

Kimitaka Kato and Andreas Radbruch
Institute for Genetics, University of Cologne, 5000 Cologne 41, Germany

Isolation of rare cell on the basis of a molecule they express, by fluorescence-activated cell sorting (FACS) has some problems: the difficulty to discriminate between rare cells and cells of the major population, due to "population overlap", the necessity for long time sorting, etc. The combination of enrichment of rare cells by fast High-Gradient Magnetic cell separation (MACS), followed by further purification by FACS, using several parameters for optimal discrimination, can yield enrichment rates of upto 10^6-fold in one experiment. $CD34^+$ cells present at 0.21±0.066 % in PB were enriched to a frequency of 40 ~ 60 % by MACS. A nearly homogeneous population of $CD34^+$ cells (>95 % upto 99.5 %) was achieved by a combination of MACS and FACS. The enrichment rates were 532-fold by MACS, and 30218-fold by MACS and FACS. Of the initial $CD34^+$ cells, 50 ~ 70 % were recovered after MACS. Using the enriched $CD34^+$ cell population, further phenotypic characterisation was performed with second monoclonal antibodies. Furthermore, phenotypic analysis of the CD34-enriched cell population enabled the detection of a small CD34 high positive subpopulation in PB-$CD34^+$ cells constituting 1 ~ 3 % of all $CD34^+$ cells. The evaluation of in vitro growth characteristics of $CD34^+$ cells showed that PB-$CD34^+$ cells possess the ability for normal hematopoietic colony growth. The availability of large quantities of pure PB-$CD34^+$ cells relevant for stem cell transplantation and offers the possibility for easy genetic manipulation of the hematopoietic system.

? % 0,2 % (CD34)+ gating ?

A CONSTANT FLUX SYSTEM USING THE "MAGNETIC CELL SEPARATOR" (MACS) FOR HIGHLY EFFICIENT CELL DEPLETION

H.-D. Kleine, D. Scheinichen, E. Lux, G. Döring, H. Poliwoda, and M. Freund.

Immunomagnetic separation techniques are useful to deplete cytokine producing cells from samples for clonogenic assays or other functional assays depending on proliferation. The depletion is not as effective as sorting with a flow cytometer, but faster by several times. One method is the "Magnetic Cell Separator" (MACS) utilizing a biotin-avidin-system bound to a polysaccharide coated superparamagnetic nucleus (size 50-150 nm). A alternative method for high efficient T-cell depletion using the "Magnetic Cell Separator" is described. T-lymphocytes were depleted from peripheral blood samples of 37 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). The flow speed in the MACS column was adjusted by a syringe-driver allowing a constant flow speed of about 100 μl/minute. The mean content of T-cells after depletion was 0.17 % (SD ± 0.27 %). The effectiveness of depletion was calculated to a mean 93.7 %. There was no correlation between the proportion of CD3-positive cells before and after depletion.

Abt. Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Konstanty-Gutschow-Straße 8, W-3000 Hannover 61, FRG

VORLÄUFIGE REFERENZWERTE FÜR ACHT LYMPHOZYTENSUBPOPULATIONEN IM LIQUOR CEREBROSPINALIS

Kleine, TO*, Hackler, R*, Albrecht, J**

* Med. Zentrum für Nervenheilkunde (Funktionsbereich Neurochemie) der Universität Marburg
**Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Die flow-cytometrische Analyse der Lymphozyten im Liquor cerebrospinalis kann mit den Methoden für Blutproben nicht durchgeführt werden, da im Liquor bei einem Referenzbereich von 0-5 M Leukozyten/l die Zellzahlen einzelner Lymphozytensubpopulationen 1000 bis 30.000 mal niedriger sind. Deshalb haben wir für FACScan mit der Research Software (Becton Dickinson) ein Verfahren entwickelt, um Lymphozytensubpopulationen in zellarmen Liquorproben zu analysieren:

Die Leukozyten in Liquorproben mit <10 M/l wurden mittels Zentrifugation (200 x g, 15 min 4^0C) angereichert und 50 µl des in Liquor resuspendierten Zellsediments mit 5 µl monoklonalen Antikörperreagenzien (Anti-Leu-4, Simultest IMK Plus; Becton Dickinson) und 10 µl LDS-751 Arbeitslösung 30 min über Eis inkubiert. Der Ansatz wurde mit 250 µl PBS (4^0C) gemischt und vollständig analysiert.

Im Lumballiquor von 24 Kontroll-Patienten (24-77 Jahre alt) wurden folgende Lymphozytensubpopulationen (Zellen pro ml) gemessen (Median, 5.-95. Perzentil):

T-Lymphozyten ($CD3^+$)	818 (311 - 2385)
aktivierte T-Zellen ($CD3^+$ $HLA\text{-}DR^+$)	83 (18 - 254)
Helfer-/Inducer-T-Zellen ($CD4^+$)	600 (206 - 1623)
Suppressor/zytotoxische T-Zellen ($CD3^+8^+$)	153 (83 - 333)
$CD3^+16^+56^+$ T-Zellen	21 (9 - 52)
$CD8^+4^+$ T-Zellen	32 (8 - 63)
NK-Zellen ($CD16^+56^+3^-$)	37 (13 - 87)
B-Lymphozyten ($CD19^+$)	9 (0 - 28)

Ein Vergleich mit den Lymphozytensubpopulationen im venösen Blut macht einen Blut-Hirn-Schrankeneffekt für Suppressor/zytotoxische T-Zellen $CD3^+8^+$, $CD3^+16^+56^+$ T-Zellen (nicht-MHC-restringierte zytotoxische Zellen), NK-Zellen und B-Lymphozyten wahrscheinlich. Dagegen ist eine erleichterte Passage von aktivierten T-Lymphozyten und Helfer/Inducer T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke anzunehmen.

Es wurde ein prozentuales $CD4^+/CD8^+$-Verhältnis von 2,5 berechnet; nach Abzug des $CD4^+8^+$-Anteils vom $CD8^+$-Wert stieg das $CD4^+/CD3^+8^+$-Verhältnis auf 3,4 an.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Referenzwerte für Lymphozytenpopulationen im Liquor von den verwendeten monoklonalen Antikörpern stark abhängig sind, was eine Standardisierung der Methoden dringend erforderlich macht.

Mehrparameter-Durchflußzytophotometrie zur Phänotypisierung und DNA-Bestimmung von urothelialen Neoplasien *in vitro* und *in vivo*.

Knüchel R[1], Nicolai H[2], Bach E[2], Hofstädter F[1]. *

1 Institut für Pathologie der Universität Regensburg
2 Abteilung Urologie des St.Josef Krkh. Regensburg

Bei der Durchflußzytophotometrie urothelialer Neoplasien wird eine Selektion der Urothelzellpopulation zur genaueren Bestimmung des DNA Index angestrebt. Während Antizytokeratinantikörper durch Markierung eines Gewebstypes (Epithel) zur Selektion eingesetzt werden, ermöglicht eine Reihe Urothel-assoziierter Glycoproteine (UAG, Fradet 1986) eine weitere phänotypische Klassifizierung, da diese Marker als z.T. mit Proliferations- und z.T mit Differenzierungseigenschaften der Urothelzellen assoziiert, beschrieben werden.

Ziel der vorliegenden Studie war es, nach Etablierung der Färbung das Verteilungsmuster von 4 Antikörpern gegen UAG (URO1,-5,-9,-10, Signet) an Harnblasentumorzellinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades zu untersuchen und diese Daten mit Zellsuspensionen aus Harnblasenspülungen und vereinzelten papillären Urotheltumoren zu vergleichen.

Zellsuspensionen wurden entweder als frische Zellen oder nach Kryopräservierung in einem Sucrose und DMSO haltigen Puffer mit einer indirekten Immunfluoreszenztechnik gefärbt und nach Propidiumiodidfärbung an einem FACSCAN (Becton Dickinson) unter Einsatz von 2 Pulsprozessoren zur späteren Doublettendiskriminierung gemessen. (Software: CELL-FIT).

An Zellinien (HU609, RT4, HT1376, J82, MGH-U1) zeigt sich, daß die Antigene, die mit Proliferation und aggressiverem Wachstum assoziiert gefunden werden (URO1, -10) auch bei hochdifferenzierten Tumoren gefunden werden, umgekehrt jedoch Antigene, die Differenzierung von Urothel anzeigen, (URO5, -9) bei wenig differenzierten Zellinien nicht vorkommen. Der als Panurothelmarker beschriebene Antikörper Uro5 ist in einem Teil der Zellinien negativ.

Durch diese Daten erhalten wir einen interessanten Hinweis auf eine partielle Änderung des Zellphänotyps *in vitro*.
Zudem hat uns die Etablierung der Methode an Zellinien gezeigt, daß reproduzierbar der UAG-Gehalt und die DNA-Verteilung dargestellt werden können. Die Untersuchung weiterer *in vivo* Tumoren wird durchgeführt, um die Bedeutung der UAG-Expression für die Prognose der urothelialen Neoplasien bewerten zu können.

* Die Arbeit erfolgte mit Unterstützung der DFG: Projekt Knüchel/Urothelkarzinom 253.

ROLE OF MONONUCLEAR PHAGOCYTE SUBPOPULATIONS AS MARKERS OF ATHEROGENICITY IN HYPERCHOLESTEROLEMIC PATIENTS

E. Kovacs, G. Rothe, G. Schmitz
Institute for Clinical Chemistry, University of Regensburg, Regensburg, F.R.G.

Atherogenesis is associated with enhanced adhesion of circulating monocytes to the injured endothelium and their migration into the subendothelial space where they transform into lipid loaded foam cells and activated macrophages leading to inflammatory tissue destruction. Atherogenic lipoproteins are supposed to induce many of the changes within the vessel wall. The goal of our study was to investigate whether an altered activation and differentiation of the circulating monocytes might be also pathogenetically related to the changes in the vessel wall in atherosclerosis. We studied LDL-receptor expression (C7A monoclonal antibody), and the expression of activation and differentiation markers (CD14, CD16, CD4, CD64, HLA-DR), membrane bound complement regulatory proteins (CD11b, CD18, CD25, CD35, CD46, CD55, CD59) and adhesion molecules (CD11a, CD48, CD58) on monocytes from freshly drawn blood of patients with hypercholesterolemia with flow cytometry. Patients were divided into two groups according to the presence (CHD^+) or lack of (CHD^-) coronary heart disease. A significant decrease of differentiation and activation markers, and membrane bound complement components was detectable on monocytes from CHD^+ patients suggesting either a downregulation of surface receptors or the selective depletion of mature monocytes. This hypothesis was further supported by the reduction of the $CD14^+/CD16^+$ subpopulation in CHD^+ patients. To mimic the effects of lipoproteins on circulating monocytes, mononuclear phagocytes from healthy controls were cultured for 1-7 days in the presence of LDL, its modified forms (acLDL, oxLDL), HDL_2 and HDL_3. LDL and its modified forms induced an up to 2.4-fold higher expression of the complement regulatory proteins and adhesion molecules during the culture of monocytes from controls but an increase of the $CD14^+/CD16^+$ subpopulation in the case of HDL subfractions. The early activation of cultured monocytes was also reflected by an increased oxidative burst response, alkaline intracellular pH through activation of the Na^+/H^+-antiport, and decreased lysosomal cathepsin B content. In prolonged culture of 7 days, monocytes showed a retarded expression of HLA-DR, CD14 and CD4 in the presence of the LDL derived fractions, but normal reactivity with the HDL subfractions. Our results suggest that the acute activating effect of LDL and its modified forms might lead to the reduced differentiation of monocytes due to the depletion of their energetic capacity also reflected by the reduced marker expression on the surface of circulating monocytes from CHD^+ hypercholesterolemic patients.

Aussagekraft flowzytometrischer DNA-Analysen von OP-Präparaten und Feinnadelbiopsien der Prostata

Th. Liedl, H. Cullmann, B. Liedl
Urologische Universitätsklinik der Ludwig-Maximilians-Universität
Klinikum Großhadern, Marchioninistraße 15, 8000 München 70

Die Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts bei Organtumoren hat in den letzten Jahren wegen der erkennbaren prognostischen Relevanz und den vertretbaren Präparationsaufwand den Nachweis einer klinischen Einsatzmöglichkeit erbracht. In unserer Studie sollte geprüft werden, ob und für welche Fragestellung dies auch für Prostatatumoren gilt. Zwischen 10/87 und 1/92 wurden bei 83 Operationspräparaten von Tumorpatienten mit radikaler Prostatektomie und bei über 90 Feinnadelbiopsien von Patienten mit klinisch suspektem Prostatabefund flowzytometrische DNA-Analysen vorgenommen.

Die optimale Präparationsmethode ist von Ausgangsmaterial und Fragestellung abhängig: Für Tumorblöcke aus Operationsgewebe - prognostische Information - ist dies die Einparameter-DNA-Messung einer durch Detergens und Enzym gewonnenen Kernsuspension. Bei Feinnadelbiopsien - diagnostische Aussage - hat sich eher die DNA/Cytokeratin-Doppelmarkierung intakter Zellen zur Ausgrenzung störender Subpopulationen bewährt.

Mehrere Problemstellen sind zu überwinden: Prostatagewebe enthält oft große bindegewebige Anteile, was über eine höhere Debriskurve die Proliferationsauswertung erschweren kann. Des weiteren kann - wie für histologische und zytologische Untersuchungen von Prostatabiopsiegewebe - durch die bekannte Multifokalität dieser Tumorerkrankung ein Sample-Error entstehen, der die Entnahme von mehrereren Proben aus verschiedenen Organarealen notwendig macht. In Übereinstimmung mit bereits vorliegender Literatur scheint aber aufgrund einer spezifischen Tumorbiologie der Prostatatumoren der Anteil aneuploider Karzinome sehr klein zu sein.

Unsere Ergebnisse zeigen ebenfalls einen Anteil aneuploider Karzinome von nur 7%. Die Tumoren erscheinen in über 70% der Fälle mit euploidem Grundmuster und einer erhöhten Proliferationsrate. Die Aneuploidierate sowie die Proliferationsrate wächst mit größerem Tumorstadium und zunehmender Entdifferenzierung.

Zwar wäre die Selektion und gesonderte Behandlung der Gruppe der aggressiven aneuploiden Karzinome wünschenswert. Bedingt durch die für eine Screeningmethode noch zu geringe Sensitivität kann aber zur Zeit nicht an einen klinischen Routineeinsatz gedacht werden. Es ist geplant, durch die Kombination der DNA-Analyse mit dem zellulären PSA-Besatz im Rahmen einer flowzytometrischen Doppelmarkierung die Erkennungsrate weiter zu steigern.

Methodik und Wertigkeit flowzytometrischer DNA-Analysen im Rahmen der Spermatogenesebeurteilung

Th. Liedl[1], W. Vahlensieck[1], M. Idzikowski[1], P. Fabricius[2]
[1] Urologische Universitätsklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
[2] Urologische Abteilung des Krankenhauses Moabit, Berlin

An mehr als 20 Hodenbiopsien und Orchiektomie-Präparaten wurden durchflußzytometrische Messungen des zellulären DNA-Gehalts durchgeführt. Nach alkoholischer Fixierung, mechanischer Zerkleinerung, Filterung durch ein 70um-Netz und dem enzymatischen Abbau der RNA wurden die Proben mit Propidiumjodid gefärbt.

Aufgrund ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts konnten die verschiedenen Zellpopulationen eindeutig identifiziert werden. Die haploiden runden und elongierten Spermatiden werden deutlich von den diploiden Sertoli- und Leydigzellen sowie den primären Spermatozyten und Spermatogonien mit diploidem bzw. tetraploidem DNA-Gehalt getrennt.

Im Vergleich der verschiedenen Arten der Materialgewinnung ergibt die Hodenbiopsie durch skrotale Inzision die besten Ergebnisse. Mittels Feinnadelaspiration oder Stanzbiopsie gewonnenes Gewebe zeigt dagegen einen unverhältnismäßig hohen Anteil von haploiden Zellen und Debris, sodaß hier keine sichere Spermiogenesebeurteilung möglich wäre.

In Übereinstimmung mit bereits vorliegender Literatur wurde ein Anteil von mindestens 40% haploiden Zellen als Normalwert der Spermiogenese gefunden. Der Prozentsatz der haploiden Zellen korreliert mit den Ejakulatparametern. Gegenüber den histologischen Parametern ist durch die flowzytometrische DNA-Messung aber eine standisierte Beurteilung möglich. Interessante Aspekte bietet darüber hinaus die Untersuchung von Leistenhoden- sowie aneuploidem Keimzelltumorgewebe, in dem die Spermiogenese fast vollständig unterdrückt wird.

Die flowzytometrische DNA-Analyse von Hodenbiopsien ist eine schnelle und einfache Methode, um die Spermatogenese quantitativ zu erfassen. Sie bietet eine Möglichkeit, in Verbindung mit den histologischen Parametern die Therapiechancen der männlichen Infertilität besser abzuschätzen und wird deshalb in definierten Indikationsbereichen als additives Diagnoseverfahren angewandt.

Durchflußzytometrie und Zellsortierung lebender Zellen anhand spezifischer sezernierter Moleküle

Rudi Manz, Stefan Miltenyi*, and Andreas Radbruch
Institut für Genetik der Universität zu Köln und *Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Die durchflußzytometrische Analyse und Sortierung einzelner lebender Zellen nach von ihnen sezernierten Molekülen war bisher nicht oder nur sehr aufwendig möglich. Wir haben ein einfaches Verfahren entwickelt, um sezernierte Moleküle der Durchflußzytometrie sowie der magnetischen Zellsortierung zugänglich zu machen. In die Membran lebender Zellen werden gegen das sezernierte Produkt gerichtete "Fangantikörper" inseriert, die die sezernierten Moleküle nach der Sekretion einfangen und an die Zelloberfläche binden. Dort können die sezernierten Moleküle wie Oberflächenmoleküle spezifisch fluoreszent und magnetisch angefärbt werden. In einem Testsystem aus sezernierenden und nicht sezernierenden Hybridomzellen konnten wir so die sezernierenden Zellen spezifisch anfärben, analysieren und sortieren. Für die biomedizinische Grundlagenforschung und die Biotechnologie bietet die neue Technik ganz neue Perspektiven, denn die Vorteile der Durchflußzytometrie und die äußerst effizienten modernen Zellsortierungsmethoden lassen sich jetzt auch auf sezernierte Zellprodukte anwenden.

Flowzytometrische Quantifizierung von Opsonophagozytose und Abtötung von S.aureus und C.albicans durch periphere Blutleukozyten

E.Martin und S.Bhakdi
Institut für Medizinische Mikrobiologie; Hochhaus am Augustusplatz; W 6500 Mainz

Eine flowzytometrische Methode für die Analyse von Opsonophagozytose und Abtötung von S.aureus und C.albicans durch periphere Blutleukozyten wurde von uns entwickelt. Mit einer grün fluoreszierenden Vitalfärbung markierte Staphylokokken oder Candida werden mit zellreichem Plasma, gewonnen aus Vollblut nach Dextransedimentation der Erythrozyten, inkubiert. Aufgrund selektiver Markierung der Granulozyten und Monozyten mit einem orange fluoreszierenden monoklonalen Antikörper (Anti-CD13) kann der Anteil der Phagozyten, die mit Mikroorganismen assoziieren, im Sinne einer Doppelfluoreszenz (orange-grün) ermittelt werden. Parallel kann das Verschwinden extrazellulärer Mikroorganismenim Sinne einer Abnahme der Anzahl grün fluoreszierender Partikel verfolgt werden. Die Abtötung der Bakterien oder Hefen zeichnet sich durch Verlust deren Grünfluoreszenz aus. Nach Detergenzlyse der Blutzellen wird die Anzahl grün fluoreszierender Partikel flowzytometrisch bestimmt, wobei die Reduktion der Anzahl der Abtötungsrate entspricht.
Diese Methode erlaubt eine schnelle Untersuchung der Phagozytenfunktion im Routinelabor ebenso, wie sie zur Lösung von grundlegenden Fragen der Phagozytose und Abtötung von Mikroorganismen herangezogen werden kann.

Lit.: Martin et Bhakdi; 1991; J. Clin. Microbiol. 29: 2013-23. Martin et Bhakdi; 1992; J. Clin. Microbiol. in press.

Flow and Image Cytometry in Biomedical Research

Brian H. Mayall, Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, CA 94143.

Cytometry is enumeration and quantification of individual cells and sub-cellular components. It enables populations of cells to be analyzed for the distribution of properties across the population, cellular sub-populations to be identified, and rarely occurring cells to be detected. It brings objectivity to disciplines that had been primarily descriptive; it has defined new clinical standards for hematology and immunology laboratories, it is proving a quantitative adjunct in pathology, and it now is one of the most powerful techniques for cell biomedical research.

Success in cytometry requires careful attention to sample preparation, staining reagents, instrumentation, data display, analysis, and validation of results. All must be matched appropriately to the problem being addressed. These principles are illustrated by projects from our laboratory.

The glycophorin A assay uses flow cytometry to detect and quantify extremely rare mutational events in the blood of individuals exposed to radiation and chemical mutagens. This assay is being applied to survivors from Hiroshima and Nagasaki, and to the worker populations exposed in the Chernobyl disaster. Rare event detection also is being used to identify hemapoietic stems cells and metastatic tumor cells in bone marrow aspirates, and fetal cells circulating in maternal blood early in pregnancy.

The new technique of competitive genomic hybridization depends on advances in *in situ* hybridization and image cytometry. Human tumor DNA and normal human tumor DNA are differentially labeled, mixed stoichiometrically, and hybridized to normal human metaphase cells. The bound tumor and normal DNAs are detected with green and red fluorescence respectively. Chromosomal regions deleted in the tumor appear relatively red, while amplified regions are green. Quantitative fluorescence microscopy and image analysis permit accurate mapping of such colored regions and quantify relative sequence copy number.

Each application required multiple developments before cytometry could be applied routinely. These included sample preparation, staining reagents, instrumentation, data display, analysis, and validation of results. Such a co-ordinated approach is a prerequisite for advances in cytometry and its applications.

Supported by grants from USPHS, USDOE, Imagenetics, and UC/PAC.

Bildanalytische und flow-cytometrische Mehrparameteranalysen am Mammakarzinom

Menze R, Rüschoff J, Knüchel R, Hofstädter F

Institut für Pathologie der Universität Regensburg

Das biologische Verhalten von Tumoren ist wesentlich durch den Differenzierungs- und Proliferationsgrad einer Neoplasie determiniert. Eine möglichst objektive und damit reproduzierbare Bestimmung dieser Tumorparameter wird zunehmend auch in der Routinediagnostik des Pathologen angestrebt.
Ziel unserer Untersuchung war es, eine Technik zu entwickeln, die sich problemlos in den diagnostischen Alltag integrieren läßt und gleichzeitig die Untersuchung mehrerer Parameter an einem Tumor ermöglicht. Dabei wurden parallel digitale Bildanalyse (ICM) und Flow-Zytometrie (FCM) durchgeführt.
An 35 untersuchten Mammakarzinomen wurden nach Tumorbestätigung im Schnellschnitt Imprintpräparate, Kryoschnitte und Einzelzellsuspensionen aus dem gleichen Tumorareal angefertigt. Die Zellvereinzelung erfolgte mechanisch mit Skalpell und vergleichend durch Zerstoßen in Stickstoff. Die Bestimmung des relativen DNA Gehaltes erfolgte bildanalytisch und flow-zytometrisch. Im Sinne einer Mehrparameteranalyse wurden zusätzlich die Nukleolus organisierenden Regionen (AgNOR) in der Bildzytometrie und die Zytokeratinexpression sowie die Ki67-Fraktion flow-zytometrisch bestimmt.
Die Methode der Zellvereinzelung in Stickstoff ergab gegenüber der mechanischen Technik eine höhere Zellausbeute; anhand der Zytokeratinexpression in der FCM zeigte sich eine geringere Zytoplasmaschädigung, jedoch eine ausgeprägtere Kernvakuolisierung und eine geringgradige Reduktion der Ki67-Fraktion.
Bei deutlich aneuploiden Tumoren ohne interne diploide Tumorzellpopulation zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen ICM- und FCM-DNA-Gehalt. Bei zusätzlichem höherem Anteil diploider Tumorzellen ergab sich in der ICM ein diploider DNA-Index, jedoch mit hoher 5cExceeding Rate, im Unterschied zum hyperdiploiden DNA-Index in der FCM.

Flow Cytometric Analysis of Adenocarcinoma of the Oesophagus

Nakamura,T., Nekarda,H., Becker,K.*, Schüler,M., Bollschweiler,E., Hölscher,A.H., and Siewert,J.R.

Chirurgische Klinik, *Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar, TU München

We investigated DNA content of adenocarcinoma of the oesophagus(n=56) and carcinoma of the gastroesophageal junction(n=14) to estimate it´s significance as a prognostic factor. These seventy patients were operated between 7/1982 and 7/1990 without preoperative chemotherapy. Fourty-five cases(64%) had a specialized columnar epithelium (Barrett´s metaplasia) of the lower oesophagus.
Flow cytometric analysis was performed from paraffin-embedded material using modified Hedley´s method.In the central sections of the primary tumor, aneuploidy was identified in 60 cases(86%) and euploidy in 10 cases (14%). There was no difference of ploidy pattern between the tumors with or without Barrett´s epithelium. A significant correlation was detected between the ploidy pattern and the frequency of lymphnode metastasis(pN) ($p<0.01$). No correlation was found between the ploidy patterns and the depth of tumor invasion(pT) or the frequency of organ metastasis(pM). The estimated 5-year survival rate of aneuploid patients was 25%, for euploid it was 50%. The survival rate of euploid patients was better than of aneuploid ones ($p=0.05$).
20/25 metastatic lymphnodes(80%) had the same DNA index (DI) compared to the primary tumor (DI > +-0.1).
In Barrett´s oesophageal mucosa,the first results show that normal mucosa was euploid whereas Barrett´s metaplastic mucosa with severe dysplasia was almost aneuploid. Furthermore, 10/14 T1 cases (71%) were aneuploid.

These results suggest that flow cytometric analysis is useful to asses the prognosis of patients with adenocarcinoma of the esophagus and can help to estimate malignancy in Barrett´s oesophagus.

Interne Qualitätskontrolle in der Durchflußzytometrie

Dr.med. C. Thomas Nebe, Zentrallabor des IKC, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg, Theodor-Kutzer Ufer, W-6800 Mannheim 1

Die interne Qualitätskontrolle ist eine unabdingbare Vorraussetzung für die klinische Bewertung und Akzeptanz durchflußzytomertischer Ergebnisse, sowie für die erfolgreiche Überprüfung durch eine externe Qualitätskontrolle (z.B. das Bestehen von Ringversuchen).

Ihre Notwendigkeit wird u.a. aus der neuen AIDS-Definition aufgrund eines durchflußzytometrischen Analysenergebnisses ersichtlich: Danach ist eine Zahl von weniger als 400 Helferzellen pro Mikroliter Blut (und nicht mehr das klinische Bild) für die Diagnose ausschlaggebend! Weiterhin mehren sich die Hinweise, daß die Dichte von Zelloberflächenmolekülen und funktionelle zelluläre Parameter eine diagnostische bzw. prognostische Aussagekraft haben, was eine reproduzierbare Messung der Fluoreszenzintensität pro Zelle erfordert. Bei vielen interessanten, jedoch zumeist seltenen Erkrankungen des Immunsystems wären Multizenterstudien wünschenswert, sie sind jedoch derzeit nicht durchführbar.

Die Anleitungen der Gerätehersteller, die existierenden Verfahrensweisen in den Laboratorien (d.h. Kenntnisse auf diesem Gebiet), sowie die kommerziell verfügbaren Reagenzien sind unzureichend. Daher verwundert es nicht, daß vergangene Ringversuche auf nationaler und internationaler Ebene zu unbefriedigenden Ergebnissen führten.

Dies hat mehrere Ursachen, die am Beispiel der Immunphänotypisierung sichtbar werden: mangelhafte Ausbildung des Personals, nicht standardisierte Methoden und Reagenzien, Irreführung durch die Industrie (nicht validierte Methoden) und ungenügende Stabilität des Analyts (Vollblut).

Wie in der klinischen Chemie bekannt und in der einschlägigen Literatur nachzulesen, beginnt die Präanalytik mit der Vorbereitung des Patienten (körperliche und psychische Belastung, Tagesrythmus u.a.), Antikoagulanz (Na- oder K-EDTA, Heparin, ACD), Probentransport (Dauer, Temperatur...), Zellaufarbeitung (Dichtegradient, Lyse, Fixierung), Reagenzienauswahl und -kombination, Reagenzienqualität (Haltbarkeit, F/P-Ratio, Epitopspezifität), Messung (Justage, Kompensation), Auswertung (Streulicht-Gating und Fluoreszenz-Regionen), Berechnungen (z.B. Abzug von Nicht-Lymphozyten), Bewertung (z.B. Zuordnung von Antikörperkombination und Zelltyp) und endet bei der Postanalytik mit der Befundübermittlung. Die genannten Faktoren stellen lediglich eine Auswahl von Einfluß- und Störgrößen dar, zeigen jedoch bereits, daß fluoreszierende Mikrokügelchen nur einen kleinen Teil der Faktoren erfassen können. Auch Surrogatmaterialien (z.B. fixierte oder lyophilisierte Leukozyten) reichen noch nicht aus, um z.B. die Erythrozytenlyse oder Inhomogenität der Blutprobe zu kontrollieren.

Es werden jetzt auch in Deutschland Vorbereitungen für eine Standardisierung und externe Qualitätskontrolle (s. Vortrag von Rücker, Bonn) unternommen, nachdem dies in den USA und anderen Ländern praktiziert wird.

Die Möglichkeiten und Probleme der vorangehenden internen Qualitätskontrolle (Kalibration, interne Standards, Positiv- und Negativkontrollen, Levey-Jennings-Plot, Normalproben, Validierung, Präzision, Richtigkeit, Linearität, Plausibilitätskontrolle, Referenzwertverfahren u.a.m.) werden im Vortrag diskutiert.

Praktikabilität flow-cytometrischer Messung von DNA und immunhistologischer Bestimmung der Ki-67 assoziierten Proliferationsfraktion an Biopsien des Gastrointestinaltraktes

Nekarda H, *Becker, K,Techen, G, Dittler, J,Roder, J.R., Fink, U, Siewert, J.R.

Chirurgische Klinik,*Institut für Pathologie,Klinikum rechts der Isar, TU München

Bei fortgeschrittenen, primär nicht residualtumorfrei resezierbaren, gastrointestinalen Tumoren wird in ca. 40 % ein "downstaging" mit einer neoadiuvanten (Radio)-Chemotherapie erreicht. Um die individuelle Ansprechrate hinsichtlich der Proliferationsfraktion und der DNA-Stabilität abzuschätzen, muß bioptisch Tumorgewebe gewonnen werden.
Wir haben bei 51 solcher Patienten mit einem fortgeschrittenem Karzinom des Oesophagus n=21 (41%), des Magens n=24 (47%) und Rektums n=6 (12%) flow-cytometrisch den DNA-Status, die S-Phase und immunhistologisch (APAAP-Methode) die Ki-67 assoziierte Proliferationfraktion in Biopsien (Vorgabe: n=5) bestimmt. Von den schockgefroren Biopsien wurden 15 Kryostatschnitte (5μm) zur Routine- und Immunhistologie abgenommen. Aus dem Restgewebe wurde eine Kernsuspension nach Vindeloev hergestellt und im FACScan gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Multicycle. Der CV-Wert lag bei 5.7+-2.4 %.
Die Anzahl der verwertbaren aquirierten Biopsien lag im Median bei 2.5 (2-3). Bei 2 Fällen (6%) fand sich kein Tumor. 27 Fälle (53%) hatten fraglich ausreichend Tumor für das Vorgehen. Bei 21(41%) war ein ausreichender Tumoranteil und Biopsieanzahl vorhanden. Für die Flow-Messsung war in 47 (92%) Fällen noch genügend Material nach der Immunhistologie übrig. Eine valide Messauswertung war in 43/47(92%) möglich, wobei die Anzahl der Biopsien mit 3 (2-3.5) im Gegensatz zu den nicht auswertbaren mit 1.5 (1-2) deutlich höher lagen. Eine Auswertung der Ki-67 Färbung war in 40/49 Fällen (82%) möglich. Der Median lag bei 20 % (10-40), der der S-Phase bei 16 % (9-23). 19/43 Karzinome (45%) waren euploid, 23/43(55%) aneuploid. In der aneuploiden Gruppe war der Anteil des Tumors mit 40 % (20-50) und die Anzahl der Biopsien mit 3 (2-3) deutlich größer als bei den euploiden mit 20 % Tumoranteil und 2 1/2 (2-3) Biopsien.
Generell ist die Bestimmung von Prognosefaktoren in dieser Form möglich. Eine valide Auswertung kann bei dem Vorliegen von mindestens 3 Biopsien mit einem 30 % Karzinomanteil erwartet werden.

Immundiagnostik von Zellen der bronchoalveolären Lavage (BAL) bei interstitiellen Lungenerkrankungen.

Renner, H.; Unger, U.; Christ, R.
Fachkrankenhaus für Lungenheilkunde und Thoraxchirurgie, Karower Str. 11, O-1115 Berlin-Buch

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) hat als nichtinvasive Methode unser Wissen um die Pathogenese der interstitiellen Lungenerkrankungen erheblich erweitert.

Die Darstellung der Lymphozytensubpopulationen mittels monoklonaler Antikörper erlauben den Nachweis krankheitsspezifischer Konstellationen, wie z. B. die Erhöhung der CD4/CD8-Ratio bei Sarkoidose und das Überwiegen der CD8-positiven T-Lymphozyten bei der exogen allergischen Alveolitis. Der Nachweis von Aktivierungsantigenen auf Zellen der BAL gibt darüber hinaus einen Hinweis auf die Dauer der Aktivierung während der Entzündungsreaktion.

Bei 80 Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen werden die Möglichkeiten, die die Durchflußzytometrie bei der Ermittlung des zellulären Immunstatus der BAL eröffnet, erläutert. Die Messungen der bronchoalveolären Lavagen mit hohem Lymphozytenanteil (z. B. bei aktiver Sarkoidose mit ca. 50 - 60 % oder bei exogen allergischer Alveolitis mit ca. 60 - 70 % Lymphozyten) können im FACScan der Firma Becton Dickinson mit der "Simulset Software" problemlos durchgeführt werden. Bei geringem Lymphozytenanteil kann entweder mit der "Consort 30 -" oder "FACScan Research Software" gearbeitet werden. Wenn das Setzen eines "Leuco Gates" unmöglich ist, stört die Eigenfluoreszenz der Makrophagen die Messungen der T- und B-Lymphozyten und der CD4- und CD8-Subpopulationen nicht. Schwierigkeiten bereitet dann allerdings die Erfassung der HLA DR+ - aktivierten Lymphozyten. Die Möglichkeit, doppelmarkierte Zellen und große Zellzahlen pro Messung zu erfassen, machen die Durchflußzytometrie zur Methode der Wahl bei der Bearbeitung des Immunstatus von bronchoalveolären Lavagen.

ABNORMAL INTERACTION OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES WITH LIPOPROTEINS IN TANGIER DISEASE

G. Rothe, E. Kovacs, G. Schmitz
Institute for Clinical Chemistry, University of Regensburg, Regensburg, F.R.G.

Tangier disease is a rare autosomal recessive disorder characterized by the absence of normal high density lipid lipoproteins (HDL) in plasma and cholesteryl ester deposition in the spleen and reticuloendothelial system (RES). Previous studies suggested that an impaired cellular metabolism of HDL is the cause of plasma HDL deficiency. The mechanism of the selective cholesteryl ester deposition and macrophage accumulation in the RES but not in the vessel wall such as in atherosclerosis is, however, far less clear. Therefore the goal of the present study was the flow cytometric characterization of peripheral blood monocyte function and differentiation in blood samples from Tangier patients. Tangier monocytes freshly drawn from peripheral blood did not differ from normal monocytes in their oxidative burst response to phorbol myristate acetate, Na^+/H^+-antiport dependent alkalinization upon TNF-α exposure, or lysosomal cysteine proteinase activity. They, however, showed a significant reduction of the differentiation and activation markers CD14, HLA-DR, and CD25 when compared to normal monocytes. When monocytes isolated by monocytapheresis and countercentrifugal elutriation were cultured for 1 day in the presence of lipoproteins, Tangier monocytes in addition showed only a low activation by HDL_3 and an impaired response to TNF-α suggesting an abnormal signal transduction in these cells. High level expression of the adhesion molecules CD11b, CD44, CD48, and CD58 and the membrane bound complement regulatory proteins CD11b, CD18, CD46 and CD59 was induced following 7 day maturation of Tangier monocytes into a macrophage-like morphology in the presence of HDL_2, HDL_3, or oxidized LDL. These results suggest that splenomegaly and macrophage accumulation in the RES of Tangier patients are associated with a defect in cellular signal transduction in response to HDL interaction. This may be both related to the primary genetic defect in the intracellular processing of HDL and to the selective depletion of mature monocytes. A further characterization of monocyte function in Tangier patients should be helpful for understanding the role of mononuclear phagocytes in atherogenesis.

Immunspezifische Magnet- und Fluoreszenzmarkierung mit Liposomen

Alexander Scheffold, Andreas Radbruch und Stefan Miltenyi*
Institut für Genetik der Universität zu Köln und *Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Limitierend für die Auflösung und Empfindlichkeit bei konventioneller Immunfluoreszenz ist die geringe Zahl von Fluorochrommolekülen pro spezifischem Antikörper. Außerdem können nur Moleküle zur Markierung eingesetzt werden, die sich an Antikörper konjugieren lassen. Liposomen können mit großen Mengen beliebiger Moleküle gefüllt werden. Dadurch läßt sich sowohl das Spektrum verwendbarer Markierungsmoleküle erweitern, als auch die Intensität der Markierung, d.h. schwache Färbungen sollten wesentlich verstärkt werden. Zusätzlich zu dem Fluoreszenzfarbstoff können die Liposomen mit kolloidalen Magnetpartikeln beladen werden. Dadurch kann zusätzlich zur fluoreszenten Markierung eine magnetische erzielt werden. Wir haben mit spezifischen Antikörpern gekoppelte Liposomen hergestellt, die mit Carboxyfluoreszein und magnetischen Partikeln gefüllt sind. Wir konnten mit solchen Liposomen Leukozyten des Blutes spezifisch anfärben, wobei die Auflösung und Empfindlichkeit der Färbung 50 – 100fach höher war als bei einer konventionellen Vergleichsfärbung. Die markierten Zellen konnten außerdem mit dem magnetischen Hochgradiententrennsystem MACS quantitativ abgetrennt werden.

→ sind alle Liposome positiv?
Stabilität der Liposomen?
Unspez Binding?

Flow cytofluorometric analysis of the urokinase receptor (uPA-R) on tumor cells by fluorescent uPA-ligand or monoclonal antibody #3936

M. Schmitt, N. Chucholowski, P. Rettenberger, E. Schüren, N. Moniwa, L. Goretzki, O. Wilhelm, U. Weidle+, F. and H.Graeff

Frauenklinik der Technischen Universität München and +Boehringer-Mannheim, Division of Molecular Oncology, Penzberg, FRG

Cellular antigens, including receptors, can easily be detected and quantified by flow cytofluorometry or confocal laser scan microscopy on the cell surface by reaction with fluorescent antibodies or ligands. Various types of receptors have been probed on normal or tumor cells applying receptor-directed fluorescent ligands or antibodies: Receptors for hormones, growth factors, cytokines, proteases, complement and immunoglobulins; receptors which mediate adherence to proteins of the extracellular matrix, to antigens or lectins; receptors which promote chemotaxis. The receptors for the serine proteases uPA (urokinase-type plasminogen activator) and plasmin are supposed to be involved in tumor stroma degradation, tumor spread and metastasis. Both proteases are important factors in tumor cell invasion and metastasis. Detailed flow cytofluorometric protocols have been developed recently which allow rapid and quantitative real-time analysis of binding of fluoresceinated uPA (FITC-pro-uPA or FITC-HMW-uPA) to cell surface receptors (uPA-R) on tumor cells and normal cells. Binding of pro-uPA is visualized by confocal laser scan microscopy, a technique which is superior over conventional fluorescence microscopy and is an alternative to electron microscopic approaches. This technique is complemented by laser-based flow cytofluorometry which has been used to verify inhibition of binding of FITC-pro-uPA to uPA-R on tumor cells by competitive unlabeled uPA, uPA-peptides, monoclonal antibodies to uPA, and soluble recombinant uPA-R, respectively.

In general, quantitative assessment of the interaction of cell surface receptors with their ligands is based on measurements using radiolabeled probes. Radiolabel techniques allow to determine the affinity constant of the reaction and the number of binding sites of suspended or adherent cells. The fate of the receptor-ligand complex can also be tracked by subcellular localization of the radiolabeled ligand by either analytical ultracentrifugation or by electron microscopy and autoradiography. The investigation of the dynamics of the receptor-ligand interaction on living single cells at real-time, however, is not feasible by these techniques. This may be achieved by the use of fluorescent ligands or antibodies. We describe quantitative flow cytofluorometric and confocal laser scan techniques, applying the urokinase ligands FITC-pro-uPA or FITC-HMW-uPA and also a monoclonal antibody to the uPA-R which allow to determine uPA-R antigen on the surface or inside of a variety of normal blood cells and of tumor cells.

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF FRESH HUMAN TUMOR TISSUE: A NEW SEPARATION SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF SINGLE TUMOR CELLS AND APPLICATION TO ANALYIS OF TUMOR-ASSSOCIATED PROTEASES.

E. Schüren, N. Yamamoto, N. Harbeck, M. Schmitt, F. Jänicke, H. Höfler* und H. Graeff.

Frauenklinik und *Pathologisches Institut der Technischen Universität München.

The flow cytometric evaluation of single tumor cells from fresh tumor biopsies is complicated by the heterogeneity of the tumor tissue and its surrounding stroma. We have developed a technique for separating native tumor tissue into single cell suspensions without destroying surface antigens or receptors. There are no specific antibodies against tumor cells; even antibodies against tumor cell associated mucins or cytokeratins show unspecific staining with benign tissue. We therefore developed a technique for isolating tumor cells by "negative selection" through a magnetic separation system. The following monoclonal antibodies are used for labelling of all "unwanted" cells: anti CD33 (against granulocytes + monocytes), anti CD3 (against T-cells), anti CD45R (against T-/B-cells), anti CD68 (against macrophages), anti 5B5 (against fibroblasts).

First the tissue is mechanically processed into single cell suspensions at a rate of approximately 10^7 cells / g tumor tissue. The cells are then washed in RPMI 1640. For labelling with the first antibody, 1 % BSA is added to the buffer. Incubation with the first antibody is done at 4 °C for only 15 min in order to prevent unspecific staining of tumor cells. After another washing, the cells are labelled with anti-isotype magnetic microbeads (MACS, Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach). Magnetic separation is then performed by introducing the cells into a column filled with a steel-wool matrix that is surrounded by a magnetic field. For "negative selection" it is important to run the sample at low flow speed in order to optimize depletion of the tumor cells. Subsequent labelling with anti-mouse IgG FITC serves as a quality control.

This method enables fast and simple separation of single tumor cells from fresh tumor tissue, ascitic fluid or pleural effusion. These separated tumor cells can then be analyzed by flow cytometry or confocal laser scan microscopy for proteases like the urokinase-type plasminogen activator (u-PA), its inhibitor PAI-1, cathepsin B + D or the u-PA receptor. Using detergents or fixatives, simultaneous flow cytometric determination of S-phase and ploidy also becomes possible.

Differenzierungsstudien an humanen Leukämiezellinien nach Stimulation mit Differenzierungs - und Wachstumsfaktoren.

A.Scriba, R.Jäger, J.Heymanns, K.H.Pflüger

Klinikum der Philipps-Universität, Zentrum für Innere Medizin, Abt. Hämatolgie/Onkologie/Immunologie, Baldingerstraße, 3550 Marburg

Akute myeloische Leukämiezellinien (AML) zeigen eine hohe Proliferationskapazität und können in vitro unter bestimmten Stimulationsbedingungen mehr oder weniger zu reifen Endzellen differenzieren.
Das Studium der Differenzierungsvorgänge erfordert sehr zeit- und materialaufwendige Analysen mit großen Kulturansätzen.Durch die Flowzytometrie ergibt sich die Möglichkeit diese Prozesse schnell und quantitativ zu erfassen.
Die von uns durchgeführten Studien wurden an der im SIT- Medium (Selen- Insulin- Transferrin) wachsenden LG3 (AML) sowie der im 9% FCS wachsenden GK37 Zellinie (AML) durchgeführt. Als Referenzzellinie dienten HL60 (AML) und KG1 (AML).Nach der Phänotypisierung der Zellen in Normalkultur (RPMI 1640 + SIT bzw FCS) bzw. in Hungerkultur (RPMI 1640 + Streptomycin/Penicillin) wurden die Zellen mit Differenzierungsfaktoren wie TPA und Retinsäure inkubiert. Um eine mögliche Differenzierung detektieren zu können wurde ein Panel von Oberflächen- Antigenen untersucht (CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD71, HLA-DR, Glycophorin A, IGF-1-R) sowie die Fähigkeit der Zellen zur Phagozytose und zum oxidativen Burst.
Die Stimulation mit TPA führte bei HL60 und GK37 zu profunden Veränderungen sowohl morphologisch als auch immunphänotypisch und hinsichtlich funktioneller Tests. KG1 und LG3 zeigten nur eine schwache Resonanz auf die TPA-Stimulation. Retinsäure führte, wie TPA zu einer starken Veränderung des Immunphänotyps bei GK37, jedoch nur zu einer schwachen Veränderung bei LG3. Die Wirkung weiterer Stimulantien, wie z.B Vit.D3, Interferon und die Wirkung von Stoffen die in den Eisenmetabolismus der Zelle eingreifen wie anti- Transferrinrezeptor Antikörper, Desferal, und Fe2+ freies Medium werden derzeit untersucht.

Dehydrogenase-Aktivitäten in primären gastrointestinalen Tumor-Zellinien

Erhard Severin, Che-Jen Huang

Institut für Strahlenbiologie der Universität Münster,
Hittorfstr.17, D-4400 Münster und
Department of Surgery, Kaohsiung Medical College, Kaohsiung, Taiwan, Republic of China

Es wurde eine Methode ausgearbeitet, um die Aktivität mehrerer Dehydrogenasen mit dem Flow-Zytometer zu messen. Folgende Schlüsselenzyme des intermediären Stoffwechsels wurden für diese Untersuchung ausgewählt:

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Pentosephosphat-Shunt, DNA-Synthese),
Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (Lipid-Stoffwechsel),
Lactat-Dehydrogenase (Glycolyse),
Glutamat-Dehydrogenase (Aminosäure-Abbau),
Isocitrat-Dehydrogenase und
Succinat-Dehydrogenase (Energie-Stoffwechsel, Zitronensäure-Zyklus).

Bei den Zellinien handelte es sich um zehn Oesophagus-Karzinome, zwei Pankreastumoren und einen Magenkrebs, die länger als ein Jahr in vitro gezüchtet worden waren. Die Zellen wurden mit dem jeweils erforderlichen Substrat und dem Tetrazoliumsalz CTC inkubiert und die Menge des (durch zelluläre Reduktion entstehenden) fluoreszierenden Formazans in Korrelation mit der DNA der Einzelzelle zwei-parametrisch gemessen.

Für jede Tumorlinie wurden mit Hilfe der bereits publizierten Kalibriermethode (Cytometry 13: 322-326, 1992) die Dehydrogenase-Aktivitäten in biochemischen Einheiten für Einzelzellen in der G_1/G_0-Phase errechnet und mit den Werten normaler Fibroblasten verglichen.

Methodische Variablen der TV-bildanalytischen Quantifizierung immunhistochemischer Reaktionen am Beispiel des Proliferationsmarkers PCNA bei Meningiomen

Striepecke, E., Auer, H., Raupach, H., Koch, A., Böcking, A.

Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät an der RWTH Aachen

Die bisher übliche semiquantitative Auswertung immunhistochemischer Reaktionen mit dem "Immunreaktiven Score" ist subjektiv, mangelhaft reproduzierbar und unzureichend repräsentativ. Als Alternative bietet sich eine TV-bildanalytische Quantifizierung des immunhistochemischen Reaktionsausfalls an. Damit kann der Anteil Reaktionsprodukt (RP)-positiver Zellen oder Kerne bzw. deren Flächen am Gesamtkompartiment objektiv bestimmt werden. Weiterhin läßt sich auch die Menge an RP pro Zelle/Zellkern abschätzen.

Wir analysierten zunächst ca. zwei Dutzend methodische Variablen, welche das Meßsystem beeinflussen können und die konstant gehalten werden müssen, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Unsere Ergebnisse beruhen auf der Quantifizierung des Nachweises von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) mittels monoklonalen Antikörper (DAKO) und indirekter Immunperoxidase-Technik an Paraffinschnitten von 50 Meningiomen und 20 Prostatakarzinomen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Methylgrün.

Mit dem TV-Bildanalysesystem MIAMED (Leica, Wetzlar) wurden die Zellkerne im Rotlicht bei 650nm und das RP (Diaminobenzidine) im Grünlicht bei 500nm detektiert und gemessen.

Pro Präparat wurden nach Zufallskriterien 100 Tumor-haltige Gesichtsfelder mit einem 25x Objektiv ausgewertet. Die Meßergebnisse wurden in einem Histogramm: Prozent RP-positive Fläche vs Häufigkeit aufgetragen. Es wurden minimale, maximale, mediane, mittlere und modale Proliferationsfraktion ermittelt und Streuungsmaße wie der Variationskoeffizient und die Schiefe angegeben.

Die Tumoren erwiesen sich als überaus inhomogen hinsichtlich ihrer Proliferationsverteilung im Tumor. Als Minimum zu messender Gesichtsfelder (25x) zum Erhalt repräsentativer Meßergebnisse ermittelten wir n=60. Außerdem untersuchten wir den Einfluß verschiedener Schwellwertsetzungen für Zellkerndetektion (Grauwert im Rotlicht) und RP-Positivität (Grauwert im Grünlicht) auf das Meßergebnis.

Das Verfahren erweist sich als zeitaufwendig und schwer standardisierbar, liefert aber bei Einhaltung einer standardisierten Methodik reproduzierbare und repräsentative Ergebnisse.

Erprobung eines vollautomatischen Bildanalysesystems in einem zytologischen Routinelabor

Strohmeier R[1], Naujoks H[1], van Driel-Kulker AMJ[2], Ploem JS[2]

[1]Universitäts-Frauenklinik Frankfurt/M.
[2]University of Leiden, Holland

Ein automatisches Zellanalyse-System (Autoplan-MIAC, Leika, Wetzlar) zur Früherkennung gynäkologischer Präkanzerosen wurde in einem klinischen Routinelabor getestet.
1500 gynäkologische Abstriche wurden als Einzelzellsuspension präpariert und als Monolayer auf je 2 Objektträger zentrifugiert. Einer für die Maschinenanalyse (Feulgen-Färbung) und einer für die visuelle Referenz-Diagnose (PAP-Färbung). Die Festlegung der Referenzdiagnose erfolgte nach der visuellen Diagnose von 4 unabhängigen Untersuchern (siehe Naujoks et al. 1990).
Die Screening-Resultate des Bildanalyse-Systems wurden auf 2 unterschiedlichen Ebenen ausgewertet. Die erste basiert auf der Anzahl und dem Verhältnis auffälliger "Objekte" und beruht allein auf der "Automatischen Maschinen-Klassifikation" (AMK). Bei der "Interaktiven Maschinen-Klassifikation" (IMK) wurden die gespeicherten und auf einem Monitor abrufbaren auffälligen Objekte visuell begutachtet.
Die AMK-Resultate zeigten eine Falsch-positiv-Rate von 16,5 %, wenn die Grenze zwischen positiv und negativ so gesetzt wurde, daß alle 117 als positiv diagnostizierten Präparate von der Maschine auch als positiv eingestuft wurden. Hierdurch wurden 87,4 % der CIN I und 96,9 % der CIN II Fälle auch positiv bewertet. Die IMK-Resultate zeigten eine Falsch-positiv-Rate von 2,5 %, während 86,3 % der CIN I, 96,9 % der CIN II und alle CIN III + Carcinoma positiv klassifiziert wurden.

Charakterisierung von Zellklonen mit fuktionell intakten Neurotransmitterrezeptoren, die über ligandeninduzierte Erhöhung des zytosolischen-freien Kalciums sortiert wurden

Attila Tárnok

ZMNH, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg, Universätskrankenhaus Eppendorf, Martinistr. 52, 2000 Hamburg 20

Vor kurzem haben wir ein Verfahren vorgestellt mit deren Hilfe Zellen mit intakten Neurotransmitter-Rezeptoren sortiert werden können (Tárnok & Meyerhof, *Cell Prolif.* **24**, 1991). Die Methode ermöglicht *rare-event sorting* bei Mischkulturen und transfizierten Zellen. Bei dem Verfahren wurden transfizierte und untransfizierte NIH/3T3 Mausfibroblasten mit dem Kalciumindikator Indo1 geladen. Anschließend wurden am Zellsorter diejenigen Zellen aus dem Gesamtzellpool sortiert, die auf die Zugabe von Neurotransmittern mit der Erhöhung des zytosolischen freien Kalciums reagierten. Die Anreicherung wurde über zwei Sort-Zyklen wiederholt, die resultierende Mischpopulation kloniert und die erhaltenen Zellklone weiter charakterisiert.

Es wurden folgende Parameter untersucht: Substratspezifität, Bindungseigenschaften und Reaktionskinetiken. Diese Untersuchungen wurden am Durchflußzytometer durchgeführt. Neben Indo1 als Marker für Kalcium wurde des weiteren die Änderung des Membranpoptentials mit Hilfe des potentialsensitiven Oxonol Derivats DiBAC4(3) festgestellt. Die Analysen ergaben, daß Serotonin, Oxytocin bzw. Substance-P responsive Zellklone isoliert wurden, wobei nur aus den transfizierten Kulturen Oxytocin und Substance-P reaktive Zellen isoliert werden konnten. Maximale Erhöhung des zytosolischen Kalciums wurde bei etwa 10 µM (Serotonin) bzw. 20 µM Ligandenkonzentration gefunden. Die Kalciumfreisetzungskinetiken waren unterschiedlich: einphasige Kinetik war bei Substance-P, biphasige Kinetik bei Oxytocin und Serotonin feststellbar. Die zweite Phase der Erhöhung des zytosolischen Kalciums war durch Reduktion des extrazellulären Kalziums mit EGTA inhibierbar.

Untersuchungen mit DiBAC4(3) ließen erkennen, daß Serotoninzugabe zur Depolarisierung der Zellen führte, wohingegen mit Substance-P eine deutliche mit Oxytocin eine geringfügige Hyperpolarisierung induziert wurde. Diese Ergebnisse erlauben Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Wege der intrazellulären Signaltransduktion in den isolierten Zellklonen.

Durchflußzytophotometrie und Sortierung von testikulären Zellen der Maus in unterschiedlichen Differenzierungsstadien

I. Tatchen und W. Göhde
Institut für Strahlenbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Hittorfstr. 17, 4400 Münster

Spermatogenetische Zellen erwiesen sich in zahlreichen Untersuchungen als besonders sensibles in vivo-Modell für die Untersuchung des Einflusses von physikalischen und chemischen Noxen. Seit mehreren Jahren hat das Interesse an biologischen Nachweismethoden der Wirkung geringer Dosen ionisierender Strahlung und des Einflusses von Umweltbelastungen zugenommen. Bisher läßt sich durch die Messung der DNS-Verteilungsmuster von Zellen aus Testis-Homogenisaten die Wirkung von Dosen oberhalb von 0,05 Gy nachweisen. Eine weitere Empfindlichkeitssteigerung ist durch noch genauere FCM-Messung und durch die Einführung weiterer Meßparameter zu erwarten.

Da anzunehmen ist, daß es während der spermatogenetischen Differenzierung zu Veränderungen der Kern-Plasma-Relation kommt, wurden simultane Messungen des DNS- und Proteingehaltes an testikulären Zellen ausgeführt. Die erhaltenen 2-Parameter Histogramme lassen 7 Zellpopulationen erkennen. Durch Zellsortierung und anschließende morphologische Analyse konnte untersucht werden, welche Differenzierungsstadien welchen Clustern im Zweiparameterhistogramm zuzuordnen sind. Die erhaltenen Ergebnisse sind die Grundlage dafür, die Effekte von Noxen gezielter an den besonders empfindlichen Stadien der spermatogenetischen Differenzierung untersuchen zu können.

Bedeutung der Heteroploidie für die prognosebezogene DNA-Messung beim Plattenepithelkarzinom des Oesophagus

Techen, G, Nekarda, H, Roder, JD, Fink, U, Siewert, JR

Chirurgische Klinik rechts der Isar, TU-München

Wir konnten in einer prospektiven Studie an unserem Patientengut (n=73) mit einem nicht vorbehandelten operierten Plattenepithelkarzinom (4/1987-12/1991) des Ösophagus zeigen, daß die Ploidie (euploid/aneuploid) und die lokale Tumorinfiltrationstiefe pT in der Subgruppe (n=47) der sogenannten "absolut" tumorfreien Patienten (pM1 ausgeschlossen) unabhängige prognostische Variablen für das rezidivfreie Überleben sind.
Uns hat interessiert, ob eine weitere DNA-Messung an anderer Stelle des Tumors zu einer Änderung des DNA-Indexes (DI >+-0.1) bzw. der DNA-Diagnose führt.
Nach der Vindeloev-Methode wurde von histologisch kontrollierten 70 μm Kryostatschnitten des schockgefrorenen Tumorgewebes eine Kernsuspension hergestellt und im FACScan gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Multicycle. Der CV-Wert lag bei 4 $\pm$ 1 %.
Von den 26 (36%) euploiden Tumoren konnte ein weiterer Tumorblock in 18 Fällen (70%) gemessen werden. In 10 Fällen (38%) wurde ein dritter bzw. vierter Tumorblock gemessen. Der DNA-Index bzw.die DNA-Prognoseklasse (euploid / aneuploid / multiploid) änderte sich bei 4/18 Fällen (28 %).
Bei den 47 (64%) aneuploiden Tumoren (4/47 multiploid) konnte ein zweiter Tumorblock in 34 Fällen (72 %) und ein dritter bzw. vierter Block in 20 (43 %) gemessen werden. In 9 von 34 Fällen (26 %) änderte sich der DNA-Index (> $\pm$ 0,1), während sich die DNA-Prognoseklasse lediglich in 1 von 34 (3%) der Fälle mit einem Wechsel zu einem multiploiden DNA-Muster änderte. Bei allen Fällen, die von euploid zu aneuploid bzw. aneuploid zu multiploid wechselten, handelte es sich um fortgeschrittene Karzinome.

Zusammenfassend fand sich eine Heteroploidierate von 26 bzw. 28 %, wobei die Wechselquote der Prognoseklasse bei 10 % lag. Bei fortgeschrittenen, zunächst euploid gemessenen Tumoren sollte immer eine zweite Tumorprobe untersucht werden, da dadurch die Fehlerquote in der Einschätzung der Prognoseklasse deutlich gesenkt werden kann.

Flow-zytometrisches DNA-Monitoring von In-vitro Zellkulturen

Ulrich, W. und Fritz, B.

Institut für Genetik, Universität Hohenheim, 7000 Stuttgart-70

In vielen Bereichen der medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschung werden in-vitro Zellkulturen zu experimentellen Untersuchungen herangezogen. Daneben werden diese Zellkulturen unter anderem auch zur Vakzineproduktion, zum Testen von Umwelt- Mutagenen oder in neuerer Zeit im Bereich des sog. "gene mapping research" herangezogen.

Bei Arbeiten mit gleichen Zellinien kommt es jedoch oft zu unterschiedlichen, manchmal sogar widersprüchlichen Ergebnissen. Dieses sind Folgen der Variabilität der Kulturen in-vitro, besonders bei Tumor-Stammzellinien. Zur Bestimmung der sehr häufig vorkommenden genetischen Instabiliät dieser Zellkulturen eignet sich sehr gut die DNA-Flow Zytometrie. Mit ihr kann nicht nur eine Veänderung des DNA-Gehalts ermittelt werden, sondern auch das Auftreten neuer Klonpopulationen innerhalb einer Kultur, wie es am Beispiel von Untersuchungen einiger permanent propagierbarer Zellinien (HeLa, HT-1080, CHO) gezeigt wird. Bei stabilen diploiden Fibroblastenzellkulturen mit eingeschränkter in-vitro Lebensdauer (z.B. WI-38) ist mit zunehmendem in-vitro Alter ein vermehrter Anteil von Zellen mit einem tetraploiden DNA-Gehalt nachweisbar.

Die DNA-Flow Zytometrie sollte als äußerst sensitive Methode der Bestimmung der zellulären DNA routinemäßig zur Kontrolle der Stabilität verwendeter in-vitro Zellkulturen herangezogen werden.

Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Identifikation von Gerstensorten

Ulrich, I., Ulrich, W., *Hutter, K.-J.

Institut für Genetik, Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, 7000 Stuttgart 70; *Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Im Neuemheimer Feld 280, 6900 Heidelberg 1

Zur Unterscheidung von Gerstensorten werden vornehmlich morphologische Kriterien (Bestimmung der Korngröße, Farbe, Spelzenbeschaffenheit etc.) und biochemische Methoden (Bestimmung der Hordein-Fraktion mit Hilfe der Elektrophorese) eingesetzt. Da die konventionellen Methoden zur Identifikation von Gerstensorten oft unbefriedigende Ergebnisse zeitigen, wird ein Verfahren beschrieben, mittels durchflußzytometrischer Analysen derartige Unterscheidungen vornehmen zu können.
Die methodischen Voraussetzungen für die Protoplastengewinnung aus Blatt- und Wurzelmaterial von zwei- und sechszeiligen Gersten unterschiedlicher Provinienz, sowie monoparametrige DNS-Analysen und simultane DNS-Proteingehaltsbestimmungen werden aufgezeigt.

Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.R., Ayres, N.M., Sharma, D.P., Firoozabady, E.: Science **220**, 1049-1056 (1983)

Ulrich, I., Ulrich, W.: Z. Naturforsch. **41**, 1052-1056 (1986)

SELBSTLERNENDE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE LISTENDATEIKLASSIFIZIERUNG MIT DEM CLASSIF1 PROGRAMMSYSTEM

G.Valet[1], M.Valet[1], D.Tschöpe[2], H.Gabriel[3]
[1]Arb.Gruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, 8033 Martinsried bei München, [2]Arb.Gruppe Zelluläre Hämostase, Diabetes Forschungsinstitut der Heinrich-Heine-Universität, 4000 Düsseldorf, [3]Inst.f.Sport- und Leistungsmedizin, D-6900 Saarbrücken

Moderne Durchflußzytometer erzeugen eine **große Menge** von Histogramm- oder mehrdimensionalen Listendateien, die mit der verfügbaren Software meist nur unzureichend auszuwerten sind. Bei mehrdimensionalen Messungen werden überwiegend die prozentualen Inhalte von Meßquadraten ausgewertet, **nicht aber** die Fluoreszenzintensitäten und die Packungsdichten der untersuchten Marker. Auf diese Weise bleibt eine **erheblicher Teil** der verfügbaren Information **ungenutzt**. Ein Mangel der bisherigen Software ist es auch, daß **keine Möglichkeit** besteht, die Unterschiede zwischen normalen und abnormen Proben aus **mehreren Messungen** mit verschiedenen Markern **gemeinsam** auszuwerten.

Das CLASSIF1 Programmsystem erlaubt es, diesen Problemen wirksam zu begegnen, da Listendateien **aller** käuflichen Durchflußzytometer oder Zellsorter mit diesem Programmpaket **selbstlernend** auswertbar sind. Gegenwärtig kann die relevante Information aus maximal 10 unterschiedlichen Listendateimessungen mit jeweils bis zu 8 Parameter herausgezogen und in bis zu 10 unterschiedliche Zustände klassifiziert werden.

Dazu wertet das Programm die einzelnen Listendateien mit frei wählbaren **Multifenstern** in mehreren Dimensionen aus und speichert die **Resultate** in **Datenbanken**. Mit Hilfe einer **Perzentilrechnung** werden für jede Probe die am besten zwischen normal und abnormen Proben unterscheidenden Datenkolonnen der verschiedenen Datenbanken in eine **neue Datenbank** gebracht. Aus dieser Lerndatenbank werden in einem iterativen Optimierungsprozeß **Klassifizierungsmasken** ausgerechnet, mit denen neue, dem Programm unbekannte Proben prospektiv klassifiziert werden können. Die **Klassifizierung** ist bei Langzeitkonstanz der Messungen infolge Eichung mit fluoreszenten Partikeln im Prinzip **apparate-** und **laborunabhängig**, da die Klassifizierung auf der Veränderung von **Parametermustern** und nicht von Einzelwerten beruht. Die Lern- und Meßdatenbanken können, ebenso wie die Klassifizierungsmasken, zu Vergleichszwecken und zur Etablierung der Klassifizierung an einem neuen Ort, in **standardisierter Form** weitergegeben werden.

Die **selbstlernende** CLASSIF1-Klassifizierung ist verglichen zu einer manuellen Klassifizierung außerordentlich **trennscharf** und **stabil**. So konnten bei Thrombozyten von normalen, Herzinfarktrisiko- und Diabetespatienten durch Messung der Aktivierungsantigene CD62, CD63 und Thrombospondin sowie einer IgG Isotypkontrolle 100%(n=17), 96%(n=97) und 57%(n=14) der Fälle **richtig klassifiziert** werden, während durch manuelle Computerauswertung zwar die Mittelwertunterschiede der Antigenexpression festgestellt, nicht aber im Einzelfall klassifiziert werden konnten.

Die Messung von CD45RO/CD4, CD45RO/CD8, CD3/HLA-DR, CD3/CD16 und CD19 Antigenen auf den peripheren Lymphozyten von Wettkampfradrennfahrern ergab in 12 bis 18 monatigen Studien bei Computer-unterstützter **Handauswertung keine** signifikanten Änderungen der prozentualen Quadranteninhalte d.h. auch in diesem Fall war keine Einzelfallklassifizierung möglich. Die selbstlernende Klassifizierung mit dem CLASSIF1 Programm ergab dagegen einen deutlichen Anstieg der CD45RO Antigenexpression, die eine **Einzelfallklassifizierung** des Übertrainingszustandes in 100%(n=21) und des Normalzustandes in 94%(n=51) der Fälle erlaubte.

IN SITU HYBRIDIZATION PRODUCES MOLECULAR DATA FROM MORPHOLOGICALLY INTACT CELLS

M. van der PLOEG, A.K. RAAP, R.W. DIRKS, J. WIEGANT
Dept of Cytochemistry and Cytometry,
Leiden University

During the last fifteen years Cytochemistry and Cytometry have become important tools in the fields of Diagnostic Oncology and Cytogenetics.
The possibility to obtain relevant molecular data from one or a few aberrant cells or chromosomes out of a total population, present in a morphologically optimal microscopic preparation, has increased diagnostic potentials enormously.

One of the cytochemical methods that has reached a high detection sensitivity is the non-radioactive in situ hybridization.
Single copy DNA sequences as small as 1 Kb can be localised in metaphase or interphase chromosome preparations. Using chromatin of varying states of decondensation, a high DNA resolution can be obtained; the smallest distance in kilobasepairs between two DNA targets that can be resolved microscopically at the moment being 10 to 50 Kb. The number of different DNA targets that can be identified in one prepa- ration simultaneously (if necessary), is 12. This number is likely to increase, particularly by use of image cytometry.
Non-radioactive ISH also allows the localization of mRNA's. Finally, the combination of ISH and immunocytochemistry, facilitates the visualization, not only of the presence, absence or amplification of genes and gene transcripts, but also that of the cognate proteins or peptides.
Through the combined efforts of several research groups, non-radioactive ISH methodology has reached the point that it is relatively easy to perform, and will allow to obtain accurate results rather fast.

Examples of recent developments and potential applications will be presented.

Gene amplification in the absence of selective pressure. Experiments with cell hybrids.

Silvia Viaggi*, Michael Nüsse*, Laura Ottaggio+, Wolfgang Beisker*, Stefania Bonatti+

*GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung, Arbeitsgruppe Durchflußzytometrie, 8042 Neuherberg
+Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Laboratory of Mutagenesis, Genua, Italien

The isolation of two monochromosomal hybrids from Chinese hamster cells was previously described containing, as an additional chromosome, the marker of a phosphonacetyl-L-aspartate (PALA)-resistant cell line. This marker chromosome was found to contain a homogeneously staining region (HSR) with the amplified CAD gene (Viaggi et al., Mutation Research 265, 9-21, 1992). Integrated gene amplification is known to be generally stable during a period of several months of growth in the absence of the selective drug.
To investigate the stability of the amplified regions the PALA-resistant parental cell line and the hybrids were grown during a four months period in PALA-free medium.
Cytogenetic methods and flow karyotyping showed that the parental PALA-resistant cells were stable during the first six weeks of culture in the absence of selective pressure; after four months about 90% of the cells contained the original marker chromosome and showed unchanged PALA-resistance.
In both hybrid clones, however, the PALA-resistance decreased during the first month to about 50%, but increased again to 80% of the original value during the following three months.
The two hybrid clones were found to exhibit an unstable karyotype: the extra-chromosome containing the amplified CAD gene was apparently lost in about 90% of the cells during cultivation in the absence of PALA. At the same time a population appeared with a very small chromosome containing the amplified CAD gene demonstrated by in situ hybridation and slot-blot analysis of sorted chromosomes. The new population with the smaller marker chromosome found in both hybrids apparently overgrew the original hybrid population.

Externe Qualitätssicherung (QS) bei der Immunophänotypisierung in den USA und Deutschland

Alexander von Ruecker[1], Rolf Kruse[1]

[1]Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn
Sigmund-Freud-Strasse 25; 5300 Bonn 1

Im Gegensatz zu Deutschland existieren schon seit einiger Zeit externe QS-Programme für die Immunophänotypisierung in den USA. In Zusammenhang mit der AIDS Forschung und Diagnostik wurde 1988 ein Programm in den USA initiiert, welches die wichtigsten Lymphozyten-Subset-Untersuchungen in den öffentlich unterstützen Laborartorien regelmäßig kontrollierte.

Nach anfänglich logistischen Problemen, sah das Programmkonzept vor, sehr viele unterschiedliche Methoden und Meßgeräte zu berücksichtigen. Rückblickend wirkt das Programm konfus. Es hatte jedoch die positive Wirkung, daß die Ergebnisse der Teilnehmer sich deutlich verbesserten. Lagen die Messungen von CD4-Zellen beispielsweise anfänglich bei den gleichen HIV-positiven Proben zum Teil mehr als 100% auseinander, konnte dieser Unterschied im Verlauf der Studie auf 40 - 60 % reduziert werden.

Dieses positive Ergebnis bewog die Food and Drug Administration, ein allgemeines Qualitätssicherungsprogramm bei der Immunophänotypisierung unter Aufsicht des *College of American Pathologists (CAP)* einzuführen. Laboratorien müssen seither gewisse Leistungskriterien bei Ringversuchen erfüllen, um z.B. als AIDS-Untersuchungslabor akkreditiert zu werden.

Die Arbeitsleitlinien der CAP umfassen Empfehlungen zur Verwendung von Antikoagulantien, sowie Hinweise zur Geräte-Eichung, Lagerung (Temperatur) und Anfärbung der Proben. Wichtigstes Kriterium zum Bestehen einer Qualitätskontrolle ist der Consensus innerhalb einer (Geräte-)Gruppe und nicht ein festgelegter Referenzmethodenwert. Dies führt dazu, daß z.B. der Mittelwert bei der Bestimmung eines Lymphozyten-Subsets bei zwei unterschiedlichen Gerätegruppen über 100% verschieden sein kann, aber trotzdem beide Gruppen die 'Qualitätskontrolle' bestehen.

Die Richtlinien der Bundesärztekammer sehen in Deutschland momentan noch kein QS-Programm bei der Immunophänotypisierung vor. Zur Qualitätsverbesserung und Standardisierung erscheint es sinnvoll, Arbeitsrichtlinien, und, solange es noch keine Referenzmethoden gibt, ein ähnliches QS-System einzuführen wie in den USA (methodenabhängige Sollwerte ?).

Aufbauend auf den Erfahrungen der USA und einiger europäischer Staaten, versuchen die von der Bundesärztekammer mit der externen QS beauftragten Organisationen derzeit, bei der Immunophänotypisierung externe Ringversuche zu etablieren. Über erste Erfahrungen wird berichtet.

Automatisierte DNA Image Analyse beim Lymphknoten negativen Mammakarzinom: Ploidität und Anteil von Zellen mit hohem DNA-Gehalt (> 5c) als prognostische Faktoren.

T.Wagner*, A.Adler*, I.Assmann*, E.Kubista*, I.Ellis°, J.J.Ploem-Zaaijer#

* I.Universitäts-Frauenklinik, Wien, Austria
# Dep. of Cytometry & Cytochemistry, Sylviuslaboratory, Univ. of Leiden, The Netherlands
° Dep of Histopathology, City Hospital, Nottingham, UK

An Paraffingewebe von über 100 Lymphknoten (LK) negativen Mammakarzinomen wurden DNA Parameter mittels automatisierter Image Analyse gemessen. Automatisierte Image Analyse, durchgeführt mit Hilfe des Leiden Television Analysis Systems LEYTAS, wurde an Feulgen Azur A gefärbten Einzelzellkernpräparationen aus Paraffingewebe vorgenommen. Zusätzlich zur Ploiditätsbestimmung wurde bei allen Karzinomen der Anteil von Zellen mit einem hohen DNA Gehalt (>5c) gemessen. Diese Zellen kommen in malignen Tumoren meist nur in einem sehr geringen Prozentanteil vor (< 1%), scheinen jedoch von hoher biologischer Bedeutung zu sein. Die Detektion, auch bei einem Prozentanteil von unter 0.1 %, ist mit automatisierter Image Analyse (LEYTAS) möglich. Ein Anteil von mehr als 0.5 % an Zellen mit hohem DNA Gehalt (> 5c) erwies sich als prognostisch ungünstig. Bei der Analyse der Meßdaten von Ploidität, Anteil von Zellen > 5c, Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus und der klinischen Daten von Grading, menopausalem Status, Therapie und Tumorgröße ergab sich für den Anteil von Zellen > 5c die deutlichste prognostische Signifikanz.

Durchflußcytometrisch kontrollierte Chromatin in situ Testung mit Hilfe von Heparin, gemessenen an der Zellinie H184A1N4

Weiß H, Langen P, Nischke U, Thun I

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin

Untersuchungen zur Chromatin in situ Testung mit Hilfe von Heparin, als Information zur Proliferationskapazität, wurden an der durch Benzpyren immortalisierten menschlichen Mammazellinie H184A1N4 (M. Stampfer, 1985) fortgesetzt.
Ziel der Untersuchungen ist es, die Aussage des Chromatin in situ Testes durch Versuche an Zellen unter definierten Wachstumsbedingungen zu präzisieren, um ihn für die Einschätzung von Prognose und Chemosensitivität menschlicher Carcinome nutzen zu können.

Die Versuche wurden an nicht fixierten, mit EB/Mi, in Anwesenheit von Triton X-100, fluorochromierten Zellen vorgenommen. Ausgewertet wurde aus der über 21 Minuten verfolgten Reaktionskinetik, der 4 Min. nach Heparinzugabe gemessene Wert. Die Auswerung erfolgte in Form von Medianwerten.
Gemesse wurden Zellen, die nach einer 5-tägigen, exponentiellen Wachstumsphase (Basismedium alpha MEM/F-12HAM [1:1 Vol/Vol] mit Supplementen und 2 % FKS) einer 5-stündigen Nährstoffverarmung unterworfen wurden und danach, durch Zusatz des kompletten Nährmediums, 2 Std. restimuliert wurden.

Die Nährstoff depletierten Zellen zeigten eine durch Heparin induzierte Fluoreszenzintensitätszunahme von 7,2 %, während die restimulierten Zellen nur um 4,4 % anstiegen. Die Zellzahl nahm während der Restimulierungperiode um 2 % zu. (N=6)

Die Änderung der Chromatinsensitivität liegt zeitlich vor einem Anstieg der Zellen in der S- bzw. G_2M-Phase.
Vergleiche zur Expression von Proliferations assoziierten Antigenen werden angestellt.

Einfluß von Bromdesoxyuridin auf Zellproliferation und Mikrokern-Induktion in verschiedenen Zellsystemen

Eva Maria Weller*, Silvia Viaggi*, Manfred Kubbies+, Wolfgang Beisker* und Michael Nüsse*

*GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung
AG Durchflußzytometrie, 8042 Neuherberg
+Boehringer Mannheim GmbH, Abt. für Zellbiologie, 8122 Penzberg

Die Folgen der DNA-Substitution durch das Thymidin-Analog 5-Bromodesoxyuridin (BrdUrd) auf Zellproliferation und Mikrokern-Induktion wurden in verschiedenen Zellsystemen untersucht. Durchflußzytometrische Messungen des DNA-Gehalts und der Streulicht-Intensität in Zellkernen zeigten, daß Chinesische Hamster Embryozellen (CHE) in Gegenwart von BrdUrd (30 - 100 μM) in der G2-Phase des ersten Zellzyklus vorübergehend arretiert wurden. Nach diesem G2-Block und der anschließenden Zellteilung stieg die Häufigkeit von Mikrokernen als Funkton der Zeit und der BrdUrd-Konzentration an. Demgegenüber induzierte BrdUrd in menschlichen Amnion-Fibroblasten und in NIH-3T3 Maus-Fibroblasten weder zellkinetische Veränderungen noch Mikrokerne. Durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung der Kinetochore mit CREST Antikörpern konnte nachgewiesen werden, daß BrdUrd in CHE-Zellen Mikrokerne induzierte, in denen vorwiegend azentrische Chromosomenfragmente eingeschlossen waren (klastogene Wirkung von BrdUrd). Da die DNA-Verteilung der BrdUrd-induzierten Mikrokerne Strukturen aufwies, die durch zufällige Chromosomenbrüche nicht erklärt werden konnten, sollen zytogenetische Analysen klären, ob in CHE-Zellen Chromosomenbrüche in bestimmten Chromosomen-Abschnitten besonders häufig auftreten können.

Aufnahmekinetiken von Photosensibilisatoren in Epithelzellen

Jurina M. Wessels und Wolfgang Beisker

GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung,
AG Durchflußytometrie, 8042 Neuherberg

Die photodynamische Tumortherapie (PDT) hat sich in den vergangenen Jahren zu einer alternativen Form der Krebstherapie entwickelt. Tetrapyrolstrukturisomere, die gegenüber dem Normalgewebe eine erhöhte Tumorselektivität aufweisen, werden aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften als Diagnostika und Therapeutika in der PDT eingesetzt. Maßgebend für den Erfolg der Therapie sind die pharmakokinetischen Eigenschaften der Photosensibilisatoren. An dem Modellsystem Zelle wurden durchflußzytometrische Untersuchungen zur Charakterisierung des Aufnahmemechanismus von den hydrophilen Photosensibilisatoren $TPPS_4$ und $TPPC_4$ sowie von dem amphiphilen Protoporphyrin IX durchgeführt. Eine Doppelinkubation mit H33342 und dem Photosensibilisator wurde benutzt, um eine Differenzierung zwischen der Fluoreszenzintensität des aufgenommenen Photosensibilisators in verschiedenen Zellzyklen zu ermöglichen. Das lipophilere Protoporphyrin zeigt mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2}$ = 42 ± 14 min eine um einen Faktor 10 schnellere Aufnahmekinetik als das hydrophile $TPPS_4$. Die Unterschiede in den Halbwertszeiten beruhen auf einem unterschiedlichen Aufnahmemechanismus. Der amphiphile Photosensibilisator wird mittels eines diffusionskontrollierten Mechanismus aufgenommen, während beide hydrophilen Sensibilisatoren durch die unspezifische Endozytose aufgenommen werden. $TPPC_4$ wurde ebenfalls über die unspezifische Endozytose aufgenommen. Die Halbwertszeit betrug $t_{1/2}$ = 168 ± 24 min. Die Unterschiede in der Halbwertszeit zwischen den beiden hydrophilen Sensibilisatoren sind auf den Einfluß der Substituenten zurückzuführen.

Die "Nukleolar Organizer Region" und der "Proliferationsmarker" Ki-67 als zellkinetische Parameter für orale Dysplasien und Plattenepithelkarzinome*

J. Zöller[1], M. Flentje[2], A. Herrmann[1], P. Sinn[3], I.A. Born[3]

[1] Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Ärztl. Direktor: Prof.Dr.Dr.J.Mühling), Universität Heidelberg

[2] Radiologische Universitätsklinik Abt. Klinische Radiologie und Poliklinik (Ärztl. Direktor: Prof.Dr.Dr.M.Wannenmacher)

[3] Pathologisches Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. H.F. Otto)

Abstract

An 80 oralen Dysplasien sowie 40 Plattenepithelkarzinomen wurde die Wertigkeit der Nukleolar Organizer Region (NOR) sowie des "Proliferationsmarkers" Ki-67 als zellkinetische Parameter untersucht. Keine Beziehung war zwischen der Zahl der Nukleoli und der NOR-Zahl festzustellen. Hingegen war eine Korrelation zwischen der mittleren Zahl der NORs pro Zellkern und der S-Phase erkennbar. Die Zuordnung der durchschnittlichen NORs pro Kern zu dem histologischen Dysplasiegrad ließ eine ähnliche Verteilung wie diejenige der S-Phasen erkennen. Mit dem Anstieg des histologischen Dysplasiegrades bzw. des Tumorgradings nahm auch der prozentuale Anteil Ki-67-positiver Zellen bei breiter Streubreite zu. Eine Korrelation zwischen diesem Markierungsindex und dem S-Phasen-Anteil war evident. Beide Methoden scheinen als Referenzverfahren und Ergänzung zur DNS-Flußzytometrie geeignet.

* Mit freundlicher Unterstützung des Vereins zur Förderung der Krebsforschung in Deutschland

Der Einfluß von Vitamin A auf Alkohol- und Tabak-induzierte Schleimhautveränderungen

Zellkinetische und morphometrische Untersuchungen am Tierexperiment

J. Zöller[1], H. Maier[2], M. Flentje[3], Chr. Hofele[1], I.A. Born[4]

[1] Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Ärztl. Direktor: Prof.Dr.Dr.J.Mühling), Universität Heidelberg

[2] Hals-Nasen-Ohrenklinik (Ärztl. Direktor: Prof.Dr.H.Weidauer), Universität Heidelberg

[3] Radiologische Universitätsklinik Abt. Klinische Radiologie und Poliklinik (Ärztl. Direktor: Prof.Dr.Dr.M.Wannenmacher)

[4] Pathologisches Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. H.F. Otto)

Abstract

In der Karzinogenese des Mundschleimhautkarzinomes werden Alkohol und Tabak als hauptsächliche Risikofaktoren angesehen. Da bisherige Untersuchungen gezeigt haben, daß Vitamin A und seine Derivate eine chemisch induzierte Karzinogenese wirksam verhindern können, interessierte uns die Frage, ob sich alkohol- und tabakinduzierte toxische Auswirkungen durch eine Vitamin A-Verabreichung beeinflussen lassen?
Die tierexperimentellen Untersuchungen an oralen Epithelien der Ratte ergaben, daß nach einer sechsmonatigen chronischen Alkohol- und Tabakverabreichung eine gleichsinnige signifikante Reaktion der Schleimhaut mit Kernhypertrophie, vermehrter Proliferation, verstäktem Auftreten von Mikronuklei und einer Expressionsverstärkung im Keratinmuster von K 8 und 13 festzustellen war. Durch eine zusätzliche Verabreichung von Vitamin A (10.000 I.E./kg KG) ließen sich diese toxischen Einflüsse besonders im Bereich der Mundbodenschleimhaut weitgehend vermeiden.

Zwei-dimensionale Durchflußzytometrie (DNA und Ki67) an menschlichen Rektum-Karzinomen

F. Zölzer, A. Speer und C. Streffer
Institut für Medizinische Strahlenbiologie,
Universitätsklinikum Essen, Hufelandstraße 55, 4300 Essen 1

Zur Bestimmung der Zellproliferation in menschlichen Tumoren hat die Messung von Häufigkeitsverteilungen des DNA-Gehalts weite Verbreitung gefunden. Stillschweigende Voraussetzung bei der Anwendung dieser Methode ist, daß Zellen nur mit einem G_1- (bzw. G_0-) DNA-Gehalt in eine Ruhephase übergehen, so daß S- oder G_2- DNA-Gehalt auf aktive Progression durch den Zyklus schließen läßt. Markierungsversuche mit ^{3}H-Thymidin oder BrdU haben jedoch den Verdacht aufkommen lassen, daß auch Zellen in den späteren Stadien inaktiv werden können. Wir erhofften uns weiteren Aufschluß in dieser Problematik mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ki67, der spezifisch proliferierende Zellen erkennt.

Zwei-dimensionale Durchflußzytometrie mit Propidiumiodid und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper erlaubt die Korrelation von DNA-Gehalt und Expression des (mutmaßlich) proliferations-spezifischen Antigens. Nach Überwindung einer Reihe von methodischen Problemen konnten wir 29 menschliche Rektum-Karzinome in dieser Weise untersuchen. Bei einigen Proben zeigte sich dabei das erwartete Muster: Ki67-negative (nicht proliferierende) Zellen traten nur bei G_1- (bzw. G_0-) DNA-Gehalt auf, während Zellen mit S- und G_2- DNA-Gehalt grundsätzlich Ki67-positiv waren. In anderen Fällen waren dagegen auch ruhende S- und G_2-Zellen zu beobachten, mitunter überwogen sie sogar die proliferierenden Zellen gleichen DNA-Gehalts. Wurden die Zyklus-Verteilungen von Ki67-positiven und -negativen Zellen separat bestimmt, so wiesen erstere allerdings fast immer eine deutlich höhere S- und G_2-Fraktion auf.

Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der Gesellschaft für
Zytometrie e.V.
in Heidelberg
vom 22. bis 24. Oktober 1992

Organisatoren:
KLAUS GOERTTLER · KARL-JOSEF HUTTER
STEFAN MEUER · MICHAEL STÖHR

Ort:
Kommunikationszentrum
des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg
im Neuenheimer Feld 280
D-6900 Heidelberg 1
Tel. 0 62 21 / 42 32 00, 42 25 57, 42 32 08

Beginn:	Donnerstag, den 22. Oktober 1992, 14.00 Uhr
Ende:	Samstag, den 24. Oktober 1992, 14.00 Uhr
Tagungs-beitrag:	DM 50.-

Donnerstag, 22. Oktober 1992

14.00 – 14.15 Begrüßung

14.15 – 17.45 Sitzung I: **ZELL- UND TUMORBIOLOGIE**
Chairmen: TRENDELENBURG – RADBRUCH

14.15 – 14.45 1. MAYALL, B. H.:
Flow and Image Cytometry in Biomedical Research

14.45 – 15.00 2. ASSENMACHER, M., SCHMITZ, J., and RADBRUCH, A.:
Analysis of cytokine production by immunofluorescence

15.00 – 15.15 3. JUNG, T., SCHAUER, U. und RIEGER, C.:
Detektion intrazellulärer Cytokine

15.15 – 15.30 4. BAUER, R., and BÖHM, I.:
Epitopes within the Ig-like domain of the CD4 molecule are localized on a substantial proportion of $CD8^+$ lymphocytes in HIV patients

15.30 – 15.45 5. FRÜHAUF, S., HAAS, R. und HUNSTEIN, W.:
Subgruppenanalyse von $CD34^+$ prä-B-Zellen bei Patienten mit monoklonalen Gammopathien und Normalspendern

15.45 – 16.00 6. ROTHE, G., KOVACS, E., and SCHMITZ, G.:
Abnormal interaction of mononuclear phagocytes with lipoproteins in Tangier disease

16.00 – 16.15 Kaffeepause

16.15 – 16.30 7. KOVACS, E., ROTHE, G., and SCHMITZ, G.:
Role of mononuclear phagocyte subpopulations as markers of atherogenicity in hypercholesterolemic patients

16.30 – 16.45 8. SCHMITT, M., CHUCHOLOWSKI, N., RETTENBERGER, P., SCHÜREN, E., MONIWA, N., GORETZKI, L., WILHELM, O., WEIDLE, U., and GRAEFF, H.:
Flow cytometric analysis of the urokinase receptor (uPA-R) on tumor cells by fluorescent uPA-ligand or monoclonal antibody #3936

16.45 – 17.00 9. DEHOS, A., SIMKÓ, M., KRIEHUBER, H., CZEMPIEL, H., EGBLOMASSÉ, C., and MEIER, S.:
Changes in viability and surface markers of lymphocytes after exposure to ionizing radiation

17.00 – 17.15 10. BAISCH, H.:
Tumornekrosefaktor (TNF) induzierte Modifikation der Zellkinetik in menschlichen Tumorzellen

17.15 – 17.30 11. TÁRNOK, A.:
Charakterisierung von Zellklonen mit funktionell intakten Neurotransmitterrezeptoren, die über ligandeninduzierte Erhöhung des zytosolischen-freien Kalziums sortiert wurden

17.30 – 17.45 12. HANKOWITZ, J., and SCHMITZ, G.:
Ca^{++}-antagonists Nifedipine and Nitrendipine arrest smooth muscle cells in G0/G1-phase

17.45 – 18.00 Kaffeepause und Postermontage

18.00 – 19.00 **Posterausstellung:** alle Poster, Titel siehe Anhang
Poster bitte erst am Freitagabend entfernen
Chairman: HÜTTER

19.00 – 21.00 Empfang durch den Stiftungsvorstand des DKFZ

Freitag, 23. Oktober 1992

8.30 – 10.30 Sitzung II: **ZYTOGENETIK UND MUTAGENITÄT**
Chairmen: NÜSSE – VAN DER PLOEG

8.30 – 9.00 1. VAN DER PLOEG, M., RAAP, A. K., DIRKS, R. W., and WIEGANT, J.:
In situ hybridization produces molecular data from morphologically intact cells

9.00 – 9.15 2. GOLD, R., ROTHE, G., SCHMIED, M., ZISCHLER, H., VALET, G., WECKERLE, H. und LASSMANN, H.:
In-situ Nick-Translation zum Nachweis von Apoptose in Flußzytometrie und auf Gewebeschnitten

9.15 – 9.30 3. WEISS, H., LANGEN, P., NISCHKE, U. und THUN, I.:
Flußzytometrisch kontrollierte Chromatin-in-situ-Testung mit Hilfe von Heparin, gemessen an der Zellinie H184A1N4

9.30 – 9.45 4. BONSING, B. A., BEERMAN, H., DEVILEE, P., KUIPERS-DIJKSHOORN, N., FLEUREN, G. J., and CORNELISSE, C. J.:
Flow cytometric and restriction fragment length analysis of breast carcinomas with metastases

9.45 – 10.00 5. VIAGGI, S., NÜSSE, M., OTTAGGIO, L., BEISKER, W., and BONATTI, S.:
Gene amplification in the absence of selective pressure. Experiments with cell hybrids

10.00 – 10.15 6. CAO, J., BEISKER, W., ADLER, I. D. und NÜSSE, M.:
Flußzytometrische Analyse von Mikrokernen in polychromatischen und normochromatischen Erythrozyten aus dem peripheren Blut von mit Chemikalien behandelten Mäusen

10.15 – 10.30 7. TATCHEN, I. und GÖHDE, W.:
Flußzytometrie und Sortierung von testikulären Zellen der Maus in unterschiedlichen Differenzierungsstadien

10.30 – 10.45 Kaffeepause

10.45 – 12.15 Sitzung III: **TUMORDIAGNOSTIK: REZEPTOR- UND ENZYMAKTIVITÄTEN**
Chairmen: DÖRKEN – MEUER

10.45 – 11.15 1. PANTEL, K., SCHLIMOK, G., KUTTER, D., BRAUN, S., ANGSTWURM, M., SCHMAUS, W., KLEIN, C., RIETHMÜLLER, G.:
Immunzytochemische Charakterisierung disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark von Karzinompatienten

11.15 – 11.30 2. BÖHM, I., and BAUER, R.:
Expression of an abnormal CD3/TCR complex on peripheral blood-lymphocytes in patients with cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)

11.30 – 11.45 3. DANOVA, M., GIORDANO, M., RICCARDI, A., WANG, E., and MAZZINI, G.:
Cell kinetics of acute Leukemia studied with in vivo Bromodeoxyuridine, cell cycle-related antigen expression and multiparameter flow cytometry

11.45 – 12.00 4. KNÜCHEL, R., NICOLAI, H., BACH, E. und HOFSTÄDTER, F.:
Mehrparameter-Flußzytometrie zur Phänotypisierung und DNA-Bestimmung von urothelialen Neoplasien in vitro und in vivo

12.00 – 12.15 5. SEVERIN, E. und CHE-JEN HUANG:
Dehydrogenase-Aktivitäten in primären gastrointestinalen Tumor-Zellinien

12.15 – 13.15 Mittagspause

13.15 – 16.45 Sitzung IV: **TUMORDIAGNOSTIK: QUANTITATIVE BILD- UND DNA-FLUSSANALYTIK**
Chairmen: GOERTTLER – SCHLEGEL

13.15 – 13.45 1. BARTELS, P. H., and THOMPSON, D.:
Uncertainty management in quantitative histopathology by interference networks

13.45 – 14.00 2. WAGNER, T., ADLER, A., ASSMANN, I., KUBISTA, E., ELLIS, I. und PLOEM-ZAAIJER, J. J.:
Automatisierte DNA Image Analyse beim Lymphknoten-negativen Mammakarzinom: Ploidität und Anteil von Zellen mit hohem DNA-Gehalt (>5c) als prognostische Faktoren

14.00 – 14.15 3. MENZE, R., RÜSCHOFF, J., KNÜCHEL, R. und HOFSTÄDTER, F.:
Bildanalytische und flußzytometrische Mehrparameteranalysen am Mammakarzinom

14.15 – 14.30 4. TECHEN, G., NEKARDA, H., RODER, J. D., FINK, U. und SIEWERT, J. R.:
Bedeutung der Heteroploidie für die prognosebezogene DNA-Messung beim Plattenepithelkarzinom des Oesophagus

14.30 – 14.45 5. NAKAMURA, T., NEKARDA, H., BECKER, K., SCHÜLER, M., BOLLSCHWEILER, E., HÖLSCHER, A. H., and SIEWERT, J. R.: Flow cytometric analysis of adenocarcinoma of the oesophagus

14.45 – 15.00 6. NEKARDA, H., BECKER, K., TECHEN, G., DITTLER, J., RODER, J. R., FINK, U. und SIEWERT, J. R.: Praktikabilität flußzytometrischer Messung von DNA und immunhistologischer Bestimmung der Ki67 assoziierten Proliferationsfraktion an Biopsien des Gastrointestinaltraktes

15.00 – 15.15 7. ZÖLZER, F., SPEER, A. und STREFFER, C.: Zwei-dimensionale Flußzytometrie (DNA und Ki67) an menschlichen Rektum-Karzinomen

15.15 – 15.30 Kaffeepause

15.30 – 15.45 8. EISENMENGER, M., FÖGER, A., SIMAK, R., MARBERGER, M. und WIENER, H.: Wertigkeit der Ploidiebestimmung von Biopsie-Tupfpräparaten bei Urotheltumoren mittels Image Analyse

15.45 – 16.00 9. LIEDL, TH., CULLMANN, H. und LIEDL, B.: Aussagekraft flußzytometrischer DNA-Analysen von OP-Präparaten und Feinnadelbiopsien der Prostata

16.00 – 16.15 10. HARBECK, N., SCHÜREN, E., YAMAMOTO, N., PACHE, L., SCHMITT, M., JÄNICKE, F., DETTMAR, P., HÖFLER, H., and GRAEFF, H.: Flow cytometric DNA-analysis in primary breast cancer: S-phase fraction and ploidy as prognostic factors and their correlation to tumor-cell associated proteases

16.15 – 16.30 11. AUNER, H., SCHÖLL, W., LUSCHIN, G., ADELWÖHRER, N. und PÜRSTNER, P.: DNA-Analytik mittels Flußzytometrie bei Ovarialtumoren

16.30 – 16.45 12. GEHRING, M., HAAG, D., GOERTTLER, KL., and SCHWAB, M.: Combined analysis of prognostic parameters in neuroblastoma

16.45 – 17.00 Kaffeepause

17.00 – 19.00 Sitzung VI: **NEUE KONZEPTE: ANREICHERUNG SELTENER ZELLEN BILDAUFNAHME IM DURCHFLUSS MEHRFACHFLUORESZENZEN**
Chairmen: GARRITSEN – PFLÜGER

17.00 – 17.15 1. GARRITSEN, H. S. P., GÄNSHIRT-AHLERT, D., DOHR, A., HELMER, E., WALDE, C., and HOLZGREVE, W.: Isolation of fetal cells from maternal blood by a combination of density gradient centrifugation and magnetic cell sorting

17.15 – 17.30 2. BÜSCH, J., HOLTZ, J., HEIFER, U., and RADBRUCH, A.: Enrichment of fetal erythroblasts from maternal blood for analysis of the fetal genome by PCR

17.30 – 17.45 3. KIMITAKA, KATO, and RADBRUCH, A.: Sorting of rare cells: Positive selection of $CD34^+$ hematopoietic progenitor cells in human peripheral blood by magnetic cell separation

17.45 – 18.00 4. SCHEFFOLD, A., RADBRUCH A. und MILTENYI, S.: Immunspezifische Magnet- und Fluoreszenzmarkierung mit Liposomen

18.00 – 18.15 5. MANZ, R., MILTENYI, S. und RADBRUCH, A.: Flußzytometrie und Zellsortierung lebender Zellen anhand spezifischer sezernierter Moleküle

18.15 – 18.30 6. KLEINE, H. D., SCHEINICHEN, D., LUX, E., DÖRING, G., POLIWODA, H., and FREUND, M.: A constant flux system using the "Magnetic Cell Separator" (MACS) for highly efficient cell depletion

18.30 – 18.45 7. BEISKER, W., CAO, J. und NÜSSE, M.: Mikrokernanalyse in Maus-Erythrozyten mittels Slit-Scanning Flußzytometrie

18.45 – 19.00 8. HÜLLER, R., GLOSSNER, E., WEINGÄRTNER, J. und KACHEL, V.: Mehrparametriges „Optisches Sortieren" durch Bildaufnahme aus dem Durchfluß

19.00 – Ende Kaffeepause und Mitgliederversammlung der Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Samstag, 24. Oktober 1992

8.30 – 11.45 Sitzung VII: **INSTRUMENTATION, METHODIK UND PRODUKTE**
Chairmen: BEISKER – KACHEL

8.30 – 8.45 1. SCHÜREN, E., YAMAMOTO, N., HARBECK, N., SCHMITT, M., JÄNICKE, F., HÖFLER, H., and GRAEFF, H.: Flow cytometric analysis of fresh human tumor tissue: A new separation system for identification of single tumor cells and application to analysis of tumor-associated proteases

8.45 – 9.00 2. MARTIN, E. und BHAKDI: Flußzytometrische Quantifizierung von Opsonophagozytose und Abtötung von S. aureus und C. albicans durch periphere Blutleukozyten

9.00 – 9.15 3. WESSELS, J. M. und BEISKER, W.: Aufnahmekinetiken von Photosensibilisatoren in Epithelzellen

9.15 – 9.30 4. FARRENKOPF, CH. und KACHEL, V.:
Ein 4-Parameter flußzytometrisches Datensystem auf einer PC-Einsteckkarte

9.30 – 9.45 5. GÖHDE, W., SCHMIDT, E. M. und TATCHEN, I.:
Eigenschaften eines Piezo-Sorters

9.45 – 10.00 Kaffeepause

10.00 – 10.15 6. Beckton-Dickinson

10.15 – 10.30 7. Coulter Electronics

10.30 – 10.45 8. Molter

10.45 – 11.00 9. BIOTEC

11.00 – 11.15 10. Dianova Immunotech

11.15 – 11.30 11. Medac

11.30 – 11.45 12. NN

11.45 – 12.00 Kaffeepause

12.00 – 13.45 Sitzung VIII: **QUALITÄTSKONTROLLE, NORMIERUNGSANALYSEN**
Chairmen: SCHMITZ – VALET

12.00 – 12.15 1. VON RUECKER, A. und KRUSE, R.:
Externe Qualitätssicherung (QS) bei der Immunophänotypisierung in den USA und Deutschland

12.15 – 12.30 2. NEBE, C. T.:
Interne Qualitätskontrolle in der Flußzytometrie

12.30 – 12.45 3. OTTO, F. J.:
Ergebnisse des Ringversuchs 1992 zur Standardisierung der flußzytometrischen DNA-Messung

12.45 – 13.00 4. STROHMEIER, R., NAUJOKS, H., VAN DRIEL-KULKER, A. M. J. und PLOEM, J. S.:
Erprobung eines vollautomatischen Bildanalysesystems in einem zytologischen Routinelabor

13.00 – 13.15 5. STRIEPECKE, E., AUER, H., RAUPACH, H., KOCH, A. und BÖCKING, A.:
Methodische Variablen der TV-bildanalytischen Quantifizierung immunhistochemischer Reaktionen am Beispiel des Proliferationsmarkers PCNA bei Meningiomen

13.15 – 13.30 6. BURPEE, A. V.:
Comparative list mode data analysis strategies using 1, 2, 3, and 4 color reagent combinations

13.30 – 13.45 7. VALET, G., VALET, M., TSCHÖPE, D. und GABRIEL, H.:
Selbstlernende flußzytometrische Listendateiklassifizierung mit dem Classif1 Programmsystem

ENDE

POSTERBEITRÄGE

1. BIESTERFELD, S., WOHLTMANN, D., WOLTER, D., EMMERICH, M. und STRIEPECKE, E.:
Bestimmung der Repräsentativität DNA-zytometrischer und morphometrischer Parameter durch Varianzanalyse

2. BIESTERFELD, S. und SUN, D. Q.:
Hauptkomponentenanalyse – ein faktoranalytisches Modell zur Bestimmung von Erkennungsmustern in multivariaten morphologischen Gradierungssystemen

3. ENGELS, K., STROHMEIER, R., ACKERMANN, H. und SCHNÜRCH, H. G.:
Reproduzierbarkeit bei interaktiver Tumorzellkernvermessung an histologischen Routineschnittpräparaten von Mammakarzinomen

4. HUTTER, K. J.:
Mehrfluoreszenzfarbstoffanalyse zum Nachweis unterschiedlicher Mikroorganismenspezies

5. JÄGER, R., SCRIBA, A., HEYMANNS, J. und PFLÜGER, K. H.:
Proliferationsstudien an Leukämiezellinien nach Stimulation mit verschiedenen Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren

6. KLEINE, T. O., HACKLER, R. und ALBRECHT, J.:
Vorläufige Referenzwerte für acht Lymphozytensubpopulationen im Liquor Cerebrospinalis

7. LIEDL, TH., VAHLENSIECK, W., IDZIKOWSKI, M. und FABRICIUS, P.:
Methodik und Wertigkeit flußzytometrischer DNA-Analysen im Rahmen der Spermatogenesebeurteilung

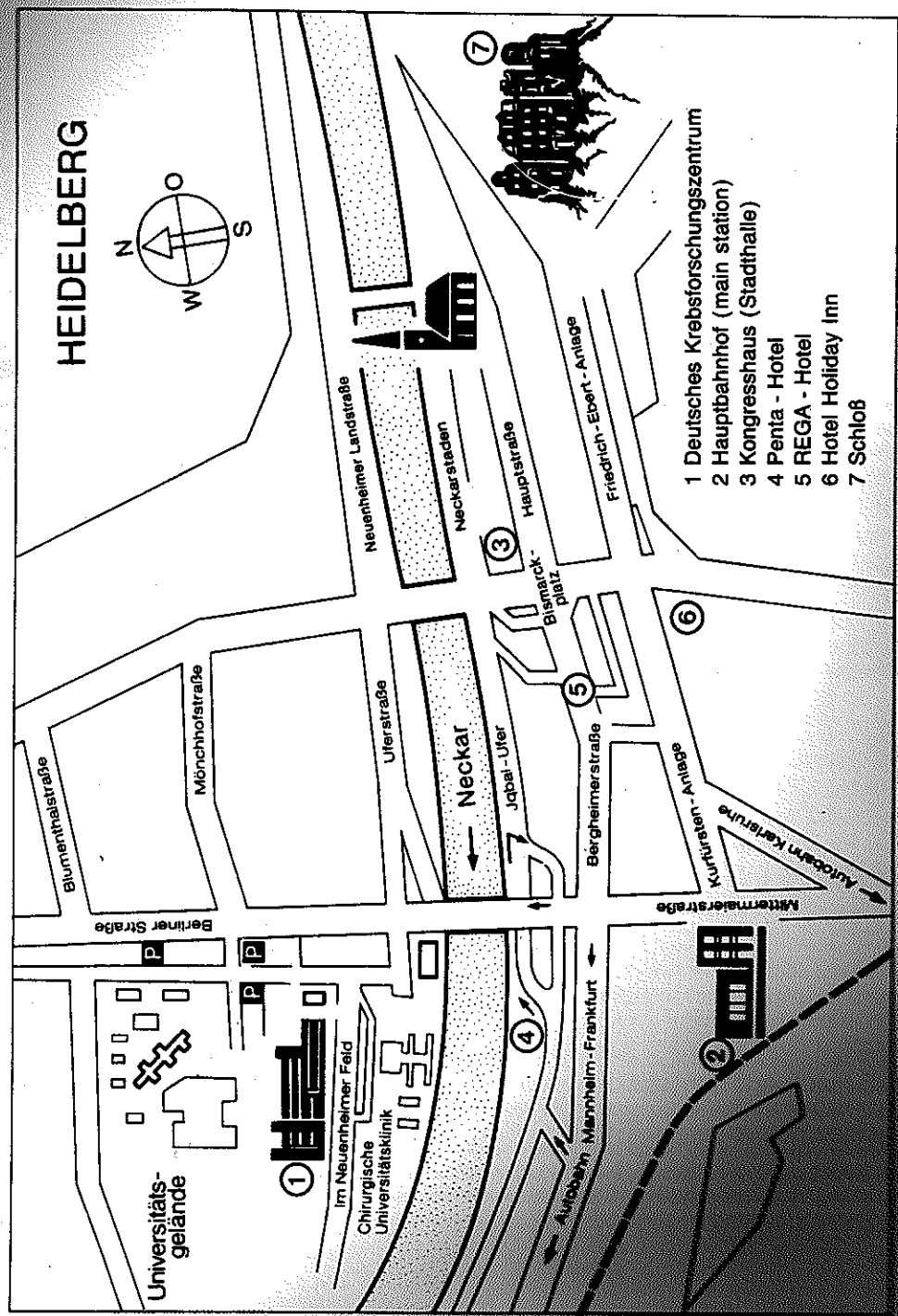
8. RENNER, H., UNGER, U. und CHRIST, R.:
Immundiagnostik von Zellen der bronchoalveolären Lavage (BAL) bei interstitiellen Lungenerkrankungen

9. SCRIBA, A., JÄGER, R., HEYMANNS, J. und PFLÜGER, K. H.:
Differenzierungsstudien an humanen Leukämiezellinien nach Stimulation mit Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren

10. Ulrich, W. und Fritz, B.:
Flußzytometrisches DNA-Monitoring von in-vitro Zellkulturen

11. Ulrich, I., Ulrich, W. und Hutter, K. J.:
Flußzytometrische Untersuchungen zur Identifikation von Gerstensorten

12. Weller, E. M., Viaggi, S., Kubbies, M., Beisker, W. und Nüsse, M.:
Einfluß von Bromdesoxyuridin auf Zellproliferation und Mikrokern-Induktion in verschiedenen Zellsystemen

13. Zöller, J., Flentje, M., Herrmann, A., Sinn, P. und Born, I. A.:
Die „Nukleolar Organizer Region" und der „Proliferationsmarker" Ki-67 als zellkinetische Parameter für orale Dysplasien und Plattenepithelkarzinome

14. Zöller, J., Maier, H., Flentje, M., Hofele, Chr. und Born, I. A.:
Der Einfluß von Vitamin A auf Alkohol- und Tabak-induzierte Schleimhautveränderungen