Abstracts

Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 21. bis 23. Oktober 1993

Tagungsort
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Kommunikationszentrum

Lokale Organisation
K. Goerttler, K.-J. Hutter, S. Meuer, M. Stöhr

Programm-Kommittee
G. Feichter, V. Kachel, S. Meuer, M. Nüsse,
F. Otto, A. Radbruch, G. Valet

Vorträge

DETECTION OF LOSS OF HETEROZYGOSITY IN FLOW SORTED OVARIAN TUMOUR CELLS: GENETIC EVIDENCE FOR THE EXISTENCE FOR INTRA-TUMOUR HETEROGENEITY.

Edwin C. A. Abeln, Willem E. Corver, Gert Jan Fleuren and Cees J. Cornelisse.

Dept. of Pathology, University of Leiden, The Netherlands

Edwin C. A. Abeln, Dept. of Pathology, University of Leiden, P.O. Box 9603, 2300 RC, Leiden, The Netherlands

Loss of heterozygosity (LOH) has become a widely studied phenomenon in the search for tumor suppressor genes. Aligning the LOH data has proven to be useful, in finding chromosomal sites which are strongly involved in a specific kind of tumors and -in some cases- in the cloning of a tumor suppressor gene. In most LOH studies DNA is isolated from total tumor tissue. In this study we report a method to separate different cell populations before LOH detection. Fresh ascites of an ovarian cancer patient was enzymatically dissociated and sorted by flowcytometry on phenotypic markers and DNA content. LOH was detected by the use of PCR amplified microsatellite markers, which has the advantage of minimal sample requirement. DNA isolated from 100 cells appeared to be sufficient for one estimation. Molecular genetic evidence was found for the existence of diploid tumor cells in ascites, next to an aneuploid tumor population. Possible models for the evolution of these tumor subpopulations are discussed.

IMMUNOFLUORESCENCE ANALYSIS OF LIVE CELLS FOR SECRETED CYTOKINES

Mario Assenmacher, Rudi Manz, Jürgen Schmitz and Andreas Radbruch

Institut für Genetik der Universität zu Köln, Weyertal 121, 50931 Köln

We have established an immunofluorescence method for the analysis of live cells for secreted cytokines. To this end an artifical affinity matrix is created on the surface of live cells by biotinylation of cell surface proteins and incubation with avidin-conjugated anti-cytokine antibodies. Then cells are allowed to secrete, incubating them in a medium of high viscosity, to prevent diffusion of secreted products between secreting and non-secreting cells. Secreted cytokines caught on the cell surface are stained with fluorochromated anti-cytokine antibodies. Cells stained that way can be further characterized for surface marker and sorted by MACS or FACS for functional assays. Combining this method with the intracellular detection of cytokines allows correlation of intracelluar accumulation and secretion of cytokines at the level of single cells.

Vergleich der flußzytometrischen Methoden: DNA-Färbbarkeit und Terminale Transferase Fluoreszenzmarkierung zur Identifizierung apoptotischer Zellen.

Heinz Baisch

Institut für Biophysik und Strahlenbiologie,
Universitätskrankenhaus Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg

Im Verlauf der Apoptosis wird die DNA enzymatisch degradiert, wobei DNA-Stücke von 140-200 bp und ganzzahlige Vielfache davon entstehen. Diese können elektrophoretisch nachgewiesen werden. Um den Anteil apoptotischer Zellen zu messen sind flußzytometrische Methoden jedoch besser geeignet.

Wir haben die von Darzynkiewicz (Cytometry 13, 795 (93)) vorgeschlagenen Methoden der DNA-Färbbarkeit und die Fluoreszenzmarkierung mit Terminaler Transferase (in-situ nick translation) an HL-60 Zellen und Me 180 Zervixkarzinomzellen untersucht. Die geringere DNA-Färbbarkeit der apoptotischen Zellen beruht darauf, daß während der Färbung mit Propidium Jodid (PI) in erhöhter Phosphatkonzentration die kleinen DNA-Stücke aus der Zelle diffundieren und deutlich weniger DNA und daher auch weniger Fluoreszenzintensität in der Zelle verbleibt als in den normalen Zellen. Die apoptotischen Zellen erscheinen daher in einem separaten Gipfel vor dem normalen DNA-Histogramm. Mit der Terminalen Transferase werden an den apoptotischen DNA-Einschnitten biotinilierte dUTP angelagert, die im nächsten Schritt mit Streptavidin-Fluorescein gefärbt werden.

An HL-60 Zellen, die mit 3 % Ethanol oder mit 1,5 µM Camptothecin, einem Topoisomerase I-Hemmer in die Apoptose getrieben wurden, zeigte sich gute Übereinstimmung der Anteile apoptotischer Zellen mit den beiden Methoden. Darüber hinaus läßt sich den Histogrammen entnehmen, daß bei Ethanol alle Zyklusphasen von der Apoptose erfaßt werden, während durch Camptothecin nur die S-Phase Zellen apoptotisch werden. Die Me 180 Zellen konnten durch Ethanol nicht zur Apoptose gebracht werden und mit Camptothecin nur durch erheblich höhere Dosen.

Advancements of Detector Technology in Flow Cytometry: The Use of Charged Coupled Devices (CCD's)

Wolfgang Beisker
GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung,
D-85758 Oberschleissheim, FRG

Since their invention in 1970 by Boyle and Smith, CCD detectors have been widely used in ultra low level radiation detection such as in astronomy. Due to their small size, their high quantum efficiency as well as do to their broadband wavelength response in the red and near infrared they are near perfect detectors for each kind of radiation.

In this report for the first time the different uses of CCD detectors in flow cytometry are described and various applications are demonstrated. Morphological analyses of specimens even orthogonal to the direction of flow are possible.

A simple CCD-array such as the full frame transfer array TC211 with 192 times 165 pixels is used in a thermoelectrically cooled environment at a temperature around -30°C. The pixel and line advance signals are generated directly by an 80x86 program written in machine language to allow efficient control of the CCD operation. A 12 Bit A/D converter with sample and hold is used for digitization.

Cellular DNA measurements, spectroscopic multiparameter applications as well as morphological discrimination of different cells obtained with this new method are shown in this study.

FLOW CYTOMETRIC MONITORING OF HIV-DISEASE: CORRELATION BETWEEN DEVELOPMENT OF HIV-INFECTION AND EXPRESSION OF δTCS1+γδTCR CELLS

Böhm I, Bauer R

Department of Dermatology, University of Bonn,
Sigmund-Freud-Str. 25
53105 Bonn

Although the function of γδTCR (T cell receptor) cells is still an enigma, there is increasing evidence for their pathogenetic role in special infectious as well as in autoimmunological diseases.
Therefore, we investigated lymphocytes from patients with infectious and non-infectious dermatological diseases with respect to the occurrence of Vδ1-Jδ1 and Vδ1-Jδ2 gene rearrangement products in γδTCR+ cells by using the three-color immunofluorescence technique in flow cytometry. The mAb δTCS1 specific for Vδ1-Jδ1 and Vδ1-Jδ2 gene rearrangements was used comparing the patient group with healthy controls. To further characterize δTCS1+ γδTCR cells we stained the cells with a panal of mAb.
We could demonstrate that circulating lymphocytes expressing γδTCR were significantly increased in HIV patients compared with HIV-negative patients and controls. Whereas Vδ1-Jδ1 gene rearrangement products usually are localized in body surface epithelia, we found δTCS1+ lymphocytes predominate in periperal blood in HIV patients. Furthermore, parallel to increasing δTCS1+ γδTCR cell numbers a subtype has been observed to become CD4- CD8+. Moreover, we found a clear correlation between the course of CD3+CD8+ versus δTCS1+ γδTCR and CD3+HLA-DR+ versus δTCS1+ γδTCR cells. At least the strong correlation between clinical stages and course of δTCS1 +γδTCR cell count provide evidence for an involvement of this T cell subtype in the pathogenesis of the acqiured immunodeficiency syndrome.

MULTIPARAMETER FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF PRIMARY BREAST CARCINOMAS AND LYMPH NODE METASTASES

Bert A. Bonsing, Willem E. Corver, Edwin C. A. Abeln, Gert Jan Fleuren, Cees J. Cornelisse

Departement of Pathology, University Hospital Leiden, The Netherlands.

Previous DNA flow cytometric studies have revealed considerable intratumor DNA index heterogeneity in primary breast carcinomas (>70%), with most primary DNA tumor stemlines recurring in lymph node and/or distant metastases (>60%). No preference for either DNA diploid or DNA aneuploid tumor stemlines has been found in metastases. No such intratumor heterogeneity was observed in an extended restriction fragment length polymorphism analysis (e.g. absence or presence of allelic imbalances in distinct samples of the same tumor). Athis molecular genetic level, only densitometry of the resulting autoradiograms provided limited evidence for intratumor heterogeneity.

Currently, intratumor heterogeneity in breast carcinomas is investigated using multiparameter flow cytometry. If intratumor heterogeneity is present in either DNA ploidy status or antigen expression, distinct tumor subpopulations are flow cytometrically sorted, followed by DNA isolation and allelotyping using PCR based techniques.

Biochemischer und durchflußzytophotometrischer Nachweis des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-R) in zwei- und dreidimensionalen *in vitro* Kultursystemen

G. Brockhoff, F. Hofstädter, R. Knüchel

Institut für Pathologie der Universität Regensburg, D-93042 Regensburg

Mit zunehmender Malignität steigt die Expression des EGF-R beim menschlichen Harnblasenkarzinom.
An unterschiedlich differenzierten *in vitro* Kulturen (*RT4* = pT2,G1 / *J82* = pT3,G3) wurden vergleichende Untersuchungen bezüglich der Darstellung des EGF-R gemacht, wobei durchflußzytophotometrische Messungen mit den klassischen Verfahren eines Rezeptornachweises in Beziehung gesetzt wurden. Mittels radioaktiv markiertem Liganden (^{125}J-EGF, Amersham) ließ sich der EGF-R im Scatchard Plot absolut quantifizieren. Trotz verschiedenartiger Dignität und abweichendem Wachstumsverhalten im Monolayer (ML), gaben beide Zellinien annähernd gleiche Rezeptorzahlen zu erkennen (ca. 4 x 10^4 Rezeptoren/Zelle). Die Daten spiegeln eine unimodale Rezeptorverteilung und somit Durchschnittswerte wider, obschon von einer inhomogenen Rezeptorexpression pro Zelle ausgegangen werden muß.
Auch durchflußzytometrisch wurden etwa gleiche Histogramme für die Grünfluoreszenz des EGF-R in beiden Zellinien gesehen. Darüberhinaus können wir durch die Mehrparameteranalyse [MPA] (z.B. gleichzeitige Darstellung von DNA) im Gegensatz zur Scatchard Analyse Subpopulationen identifizieren. In ML sahen wir eine Hinabregulation des Rezeptors nach Ligandbindung. Im multizellulären Sphäroid (MCS), in dem die Zellen durch den dreidimensionalen Kontakt der *in vivo* Situation näher kommen, sahen wir in Tumorzellen im Vergleich zum ML eine Hinabregulation des EGF-R auch ohne Zugabe von EGF. Diese durchflußzytometrischen Daten konnten durch immunhistochemische Färbungen belegt werden. Ferner zeigte sich bei den MCS eine zusätzliche Hinabregulation durch EGF-haltiges Medium bis auf das Negativkontrollniveau.
Um diese Daten noch besser mit denen der Scatchard Analyse korrellieren zu können, wurde eine zusätzliche durchflußzytophotometrische Quantifikation mit Hilfe von Microbeads mit definierter Zahl an Antikörperbindungsstellen durchgeführt.

Die Arbeiten zeigen, daß die unterschiedliche posttranskriptionale Regulation des EGF-R im ML und MCS an Tumorzellen mit geringem Rezeptorgehalt mittels Durchflußzytophotometrie sensitiv detektiert werden kann. Insbesondere in Form der MPA wird die genaue Bestimmung des EGF-R Gehaltes als Zusatzparameter in der Diagnostik von Tumoren und als Prognoseparameter ermöglicht.

SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF TWO CELLULAR ANTIGENS AND DNA USING FLUORESCEIN ISOTHIOCYANATE, R-PHYCOERYTHRIN AND PROPIDIUM IODIDE ON A STANDARD FACSCAN.

Willem E. Corver, Edwin C. A. Abeln, Bert A. Bonsing, Gert Jan Fleuren and Cees J. Cornelisse.

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

Willem E. Corver, Dept. of Pathology, P.O. Box 9603, RC 2300, Leiden, The Netherlands

Multiparameter flow cytometry is a powerful tool for analyzing the phenotypic, cell kinetic and ploidy heterogeneity of tumor cell populations. Because of the substantial spectral overlap of propidium iodide (PI) and R-phycoerythrin (PE) fluorescence emission, this combined use of these fluorochromes has been thought not to be feasible on a standard flow cytometer for these kind of studies. Instead of PI, 7-amino-actinomycin D (7-AAD) is used as DNA stain. In this paper however, we show that PI can be used as a DNA stain in combination with fluorescein isothiocyanate (FITC) and R-phycoerythrin (PE) on a standard FACScan. Three established ovarian cancer cell lines (IGROV1, NIH:OVCAR-3 and COV362.cl4) were used for these experiments. Cells were fixed with 1.0% paraformaldehyde and permeabilized with various concentrations of lysolecithin for the simultaneous detection of surface antigens by monoclonal antibodies MOv18, BMA180 or OV632, intermediate filament antigens (keratin 18 or vimentin) and DNA. A final concentration of 80 µg/ml lysolecithin was found to give optimal results. The emission spectrum overlap from PI into the orange fluorescence channel (FL2) used for PE fluorescence detection, could be sufficiently compensated to a maximum photomultiplier tube potential of about 440 Volts required at the FL2 channel. Using the same instrument settings, 5.10 x 10^4 PE equivalents were detectable. Under these conditions, CV's obtained for the DNA histograms ranged from 3.0 - 4.1. Application of the method on a mixture of activated peripheral blood lymphocytes and ovarian tumor cells resulted in a clear separation of the two populations both by surface and cytoplasmic antigen expression and DNA content.

DNA-Analyse und Karyometrie beim Mamma-Carcinom und benignen Mamma-Tumoren

Alexandra Coumbos[1], W. Kühn[1], Barbara Fleige[2], H.-K. Weitzel[1]

[1] Frauenklinik und [2] Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin

Bei der Prognoseabschätzung des Mamma-Carcinoms werden zunehmendst objektivierbare und reproduzierbare Untersuchungen gefordert. Mit Hilfe der computerassistierten DNA-Zytometrie (CAS 200) können sowohl karyometrische Daten (Kernflächen, Formfaktoren, Chromatin-Verteilung), als auch der DNA-Gehalt der Zellen eines Tumors (Diploidie, Tetraploidie, Polyploidie, Aneuploidie, DNA-Index) bestimmt werden.
Tupfpräparate von 100 malignen Mamma-Tumoren und 40 benignen Mamma-Veränderungen wurden nach einer nach Feulgen modifizierten DNA-spezifischen Kernfärbung behandelt. Die morphometrischen Daten wurden den etablierten Prognosefaktoren, wie histologischem Typ, Lymphknotenstatus, Menopausenstatus, Östrogen- und Progesteron-Rezeptor-Gehalt, Ki 67 und Grading gegenübergestellt.
Benigne Tumoren (Mastopathie, Fibroadenome, phylloide Tumoren) wiesen überwiegend diploide Histogramme auf. Bei proliferativen Veränderungen fanden sich vermehrt tetraploide peaks.
Bei den malignen Tumoren fand sich eine signifikante Korrelation zwischen Ploidiegrad und Östrogen- bzw. Progesteron-Rezeptor-Gehalt, Ki 67 und Grading ($p < 0,01$). Dagegen war die Korrelation zum histologischen Typ, der Tumorgröße, dem Lymphknotenstatus und dem Menopausenstatus nicht signifikant.
Die benignen Veränderungen unterschieden sich untereinander nicht in ihren karyometrischen Daten (Kernflächen, Formfaktoren, Chromatin-Verteilung). Bei den Malignomen fand sich mit zunehmender Aneuploidie eine Größenzunahme der Kernflächen, eine Zunahme der Kernunregelmäßigkeit.
Die DNA-Bildanalyse und die Karyometrie erfüllen die Forderung moderner morphologischer Prognosefaktoren. Gegenüber der Flow-Zytometrie liegt der Vorteil der Methode in der gezielten Zellanalyse. Auch kleinste Carcinome können vermessen werden. Inwieweit die Ergebnisse für das weitere follow-up von Bedeutung sind, vor allem für die postoperative adjuvante Therapie ungünstiger Tumorformen, muß weiteren Studien vorbehalten bleiben.

Apoptosis: The cell cycle related differences in cell susceptibility to different antitumor agents and their relevance in the treatment of leukemias.

Zbigniew Darzynkiewicz, Wojciech Gorczyca, Jianping Gong, Xun Li and Frank Traganos.
The Cancer Research Institute, New York Medical College, Valhalla, New York 10595

The aims of the present study were: (1) to reveal whether there is a relationship between cell cycle progression and susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by diverse agents; and (2) to evaluate the role of apoptosis in the treatment of human leukemias. The apoptosis "primed" HL-60 cells, during their exponential phase of growth were exposed to: the DNA topoisomerase I inhibitor camptothecin; the DNA topoisomerase II inhibitors teniposide, *m*-AMSA, Mitoxantrone or Fostriecin; the presumed tyrosine kinase inhibitor genistein; a serine/threonine kinase inhibitor H7; the protein synthesis inhibitor cycloheximide; the DNA replication inhibitor hydroxyurea, the nucleoside antimetabolites cytosine arabinoside (Ara-C) and 5-azacytidine; the alkylating agent nitrogen mustard, cisplatin, hyperthermia and γ irradiation.

The apoptosis-associated DNA degradation induced by these agents was assessed by two different flow cytometric methods, one based on DNA content measurements following extraction of low molecular weight DNA (Darzynkiewicz *et al.*, 1992), and another employing exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase to label *in situ* DNA strand breaks with biotinylated dUTP (Gorczyca *et al.*, 1992). Either of these methods allowed for both identification of apoptotic cells and analysis of the cell cycle distribution of the unaffected cell population. The method employing terminal transferase, however, also allowed for identification of the phase of the cell cycle of cells having the apoptosis-associated DNA strand breaks.

Apoptosis, confirmed by analysis of DNA degradation by gel electrophoresis and typical changes in cell morphology, was observed between 3-6 h after administration of most drugs, and in several instances was cell cycle phase specific. Thus, cells progressing through S phase were selectively susceptible when treated with camptothecin, teniposide, *m*-AMSA, Mitoxantrone, H7, hydroxyurea and Ara-C. Suppression of DNA replication by aphidicolin protected S phase cells against these drugs, indicating that active DNA replication was necessary for induction of apoptosis. Cells in G_2/M preferentially underwent apoptosis in cultures treated with H7 or with γ irradiation. Cells in G_1 phase were preferentially affected by 5-azacytidine, nitrogen mustard and hyperthermia. No significant cell cycle specificity was observed in the case of Fostriecin, genistein, cycloheximide or cisplatin. The observed differences in cell cycle susceptibility to apoptosis may be a reflection of both the severity of the lesion induced by a given drug and the cell's ability to repair that lesion; both can vary depending on the cell cycle phase.

Interestingly, while cycloheximide (5 μM) itself induced apoptosis of approximately 40% cells, regardless of their position in the cycle, it did protect S phase cells against apoptosis induced by camptothecin. Furthermore, apoptosis when induced by camptothecin, teniposide or *m*-AMSA was prevented by the proteinase inhibitor TLCK, but when induced by cycloheximide was enhanced by this inhibitor. These data suggest that the mechanism of triggering apoptosis by the protein synthesis inhibitor cycloheximide is different than that caused by other antitumor agents.

To evaluate whether apoptosis plays a role in the chemotherapy of leukemias, DNA breakage was estimated (by the method involving strand break labeling with biotinylated dUTP with exogenous terminal transferase) in blood cells of leukemic patients during routine treatment of ALL, AML and CML. Induced DNA damage was observed in blast cells of all (20) patients studied. The percent of cells with extensive DNA breaks increased from 1-8% before treatment to as much as 80% during treatment. The DNA topoisomerase inhibitors mitoxantrone, VP-16 and *m*-AMSA were more effective in inducing DNA strand breaks than was hydroxyurea or Ara-C. In the peripheral blood cells with DNA strand breaks were identified for up to 5 days after administration of the topoisomerase inhibitors. In DNA aneuploid leukemias it was possible to observe that DNA strand breaks were more frequent in aneuploid cell populations than in presumably non-leukemic diploid cells. These data, part of which were recently reported (Gorczyca *et al.*, 1993), indicate that the response of leukemic cells by apoptosis plays a significant role in the course of standard chemotherapy of acute leukemias.

New strategies in treatment of human leukemias can evolve based on the observed cell cycle phase related susceptibility of leukemic cells to respond by apoptosis. Thus, a higher treatment efficiency is expected by combining drugs having specificity to different phases of the cell cycle (e.g. Ara-C and 5-azacytidine) or using them in sequence to synchronize cells in sensitive phases of the cycle (e.g. γ radiation followed by camptothecin).

Supported by NIH grant RO1 28704

References:

1. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry, 13: 795-808, 1992.

2. Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ, Gong J, Darzynkiewicz Z: DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early *in situ* detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. Int. J. Oncol., 1: 639-648, 1992.

3. Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, Ahmed T, Gong J, Melamed MR, Darzynkiewicz Z: Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. Leukemia, 7:650-670, 1993.

Mikrokerne unterscheiden sich von apoptotischen Zellen nach einer Kernpräparation in 2 Schritten.

Ellwart JW, Nüsse M

GSF-Institute für Experimentelle Hämatologie, München, und Biophysikalische Strahlenforschung, Neuherberg

Apoptotische Zellkerne bestehen zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt häufig aus einer oder mehreren unterschiedlich großen, völlig runden, strukturlosen Kugeln. Mikrokerne sind kleine, DNA enthaltende Partikel im Zytoplasma einer Zelle, die Chromosomenbruchstücke oder ein bis zu mehrere Chromosomen enthalten können. Beide, apoptotische Körper sowie Mikrokerne, entstehen als Folge subletaler Zellschädigungen. In die Apoptose können Zellen aus allen Zellzyklusphasen gehen, Mikrokerne dagegen entstehen nur während der Mitose. Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen, die zum Sterben programmiert sind, können sich Zellen mit Mikrokernen weiter teilen.

Ziel unserer Untersuchung war es zu klären, ob bei einer durchflußzytometrischen Messung von Mikrokernen diese mit apoptotischen Körpern verwechselt werden können. Zellen der Interleukin 3 abhängigen murinen myeloischen Zellinie 32Dcl23 wurden mit 3 Gy bestrahlt bzw. es wurde ihnen der Wachstumsfaktor entzogen. In beiden Fällen gingen Zellen in Apoptose, aber nur bestrahlte Zellen bildeten Mikrokerne.

Nach einem bekannten Verfahren (Weller EM et al., Mutagenesis 8, No.5, 1993, in press) wurden zunächst die Zellmembranen mit Nonidet P40 zerstört und darauf in einem zweiten Schritt das Zytoplasma mit Sacharose und Zitronensäure entfernt. Die mit Ethidium Bromid (EB) gefärbten Mikrokerne und Kerne wurden in einer doppelt logarithmischen Verteilung von 90-Grad-Scatter (SSC) und EB-Fluoreszenz dargestellt. In einem Bereich zwischen den Zellkernen mit intakter DNA und Ereignissen mit sehr kleinen SSC-, sowie sehr kleinen Fluoreszenzwerten liegen die Mikrokerne. Die apoptotischen Zellen dagegen wandern in der SSC/EB-Fluoreszenzverteilung zunächst von der Population der vitalen Zellen zu höheren SSC-Werten, später werden ihre SSC-Signale sowie ihre Rotfluoreszenzen kleiner. Wird erklären dies durch anfängliche Strukturveränderungen der apoptotisch werdenden Zellen, deren Kerne schrumpfen und kompakter werden. Dabei wird ihre DNA zerschnitten. Später wird sie verdaut.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die apoptoischen Zellen nach der Kernpräparation für Mikrokerne nicht im Bereich der Mikrokerne liegen und von diesen klar abgetrennt werden können.

Kontinuierliche Durchflußzytometrische Messungen in Echt-Zeit

Jörn Elsner, Gustav Dobos, Erwin Schöpf, Alexander Kapp, und Johannes Norgauer

Universitäts-Hautklinik Freiburg; Hauptstr.7; 79104 Freiburg; FRG

Um kinetische Zeitmessungen an lebenden Zellen bei 37 °C durchzuführen, haben wir ein technisches Durchmischungssystem für Pobenröhrchen konstruiert. Dieses System besteht aus einem Wasserbad aus Plexiglas, das über eine Umwalzpumpe ständig auf 37 °C temperiert ist. In der Mitte des kleinen Wasserbades befindet sich eine Vorrichtung, in der das Probenröhrchen steht (tube holder). Der Boden dieser Vorrichtung ist mit einem elektrisch regulierbarem Magnetrührer ausgestattet. Die im Wasserbad stehende Probe kann nun mit Hilfe eines Magnetfisches homogen durchmischt werden. Für die Probenmessungen wurden Glasröhrchen konstruiert, die einerseits für die Ansaugvorrichtung des Durchflußzytometers und andererseits für den tube holder geeignet waren. An der Seite des Glasröhrchens befindet sich ein Loch, das die Einführung einer Kanüle ohne Druckverlust ermöglicht. Während der Messung konnte unter homogener Durchmischung der Probe bei 37 °C über die Kanüle ein Stimulus injiziert werden. Am Beispiel der Kalzium-Messung mit dem Farbstoff Fluo-3 und der Chronys-Software wurde so der zelluläre Kalziumgehalt ohne Unterbrechung der Messung kontinuierlich durchgeführt. Damit stellt dieses System eine geeignete Möglichkeit dar, eine homogene Durchmischung einer Meßprobe während einer kinetische Messungen am Durchflußzytometer zu erzielen.

Durchflußzytometrische Untersuchungen ultraschallinduzierter Zellschädigungen

E. Endl , P. Steinbach , F. Hofstädter

Institut für Pathologie der Universität Regensburg , D-93042 Regensburg

Seit einigen Jahren wird die Anwendung aus der Lithotripsie bekannter hochenergetischer Ultraschallstoßwellen in der Tumortherapie diskutiert. Gute Erfolge *in vivo* werden hierbei insbesondere in Kombination mit Zytokinen und Zytostatika erreicht. Ein wesentlicher Wirkmechanismus dieses nicht-thermischen Ultraschalls ist neben rein mechanischen Effekten die sogenannte Kavitation. Kavitation ist die Entstehung von gasgefüllten Hohlräumen in Flüssigkeiten, bei deren Zusammenbruch das umgebende Medium konzentrisch auf deren Mittelpunkt hin beschleunigt wird, wodurch sehr hohe Drücke und Temperaturen enstehen. Dies wiederum kann zur Bildung von freien Radikalen führen . Zum genaueren Verständnis der Wechselwirkung von Zellen mit Ultraschallstoßwellen ist der Einfluß intra- oder extrazellulärer kavitationsbedingter freier Radikale von grundlegendem Interesse und Gegenstand der Diskussion in der aktuellen Literatur.
Der Vitalfarbstoff Hydroethidin, der nach seiner Oxidation durch freie Radikale als Ethidium in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert, bietet sich zum Nachweis intrazellulärer freier Radikale an. Bei unseren durchflußzytometrischen Untersuchungen mußten dabei Einflüße durch membranpermeabilisierte Zellen, in die Verunreinigungen der Farbstofflösung durch Ethidium oder in der Zellsuspension umgesetztes Hydroethidin nachdiffundieren, ausgeschlossen werden. Die Schwierigkeit bestand darin, daß Ethidium und Propidiumjodid, das wir als gängigen Farbstoff zum Nachweis der Membranintegrität benutzten, ihre Fluoreszenzen im selben Spektralbereich besitzen. Die Fluoreszenzmaxima der Farbstoffe weisen jedoch ein unterschiedliches Verhältnis von FL2 Signalintensität (575nm Bandpaß) zu FL3 Signalintensität (630 nm Langpaß) auf und konnten so, nach einer neueren Methode, in einer *dot plot* Auftragung FL2 gegen FL3 voneinander getrennt werden.
Zur näheren Charakterisierung des Ausmaßes und des zeitlichen Verlaufes der auftretenden Membranschäden beschallten wir unsere Proben in Propidiumjodidfarbstofflösung und färbten anschließend mit Fluoreszeindiazetat gegen. Gleichzeitig wurde die Größenverteilung der Zellen mit CASY 1 gemessen (Widerstandsmeßprinzip in Kombination mit Pulsflächenanalyse, Schärfe System). Beide Methoden ergaben Zellschädigungen, die proportional zur Anzahl der Ultraschallstoßwellen zunahmen. Sie zeigten jedoch deutliche Unterschiede in den Anteilen an Zellen, die beide Methoden als definitiv "tot" betrachten. Die Ergebnisse müssen deshalb mit konventionellen Proliferationsassays korreliert werden.
Aus unseren Untersuchungen ergab sich keine intrazelluläre Zunahme der Ethidium Fluoreszenz in den membranintakten Zellen durch zusätzlich auftretende freie Radikale. Wir konnten jedoch eine Verminderung der an den Stoffwechsel gekoppelten Umsetzung des Farbstoffes Hydroethidin beobachten.
Aussagen darüber, ob die beobachteten permanenten und transienten Membranpermeabilisierungen auf intra- oder extrazellulär auftretende freie Radikale beruhen, sind bisher noch nicht möglich. Vergleichende dosimetrische Messungen zur Kavitationsaktivität sollen zur weiteren Klärung dieser Frage beitragen.

Zum Einfluß von Präparationstechniken auf den Nachweis von DNS-aneuploiden Subpopulationen und auf die Höhe der S-Phasenfraktionen in verschiedenen malignen Tumoren.

Georg Feichter, Renate Albrecht, Rosemarie Chaffard

Institut für Pathologie der Universität Basel,
Schoenbeinstrasse 40, CH-4003 Basel, Schweiz

Vor dem Hintergrund notwendiger Bemühungen um eine weitreichende Standardisierung der Präparations-, Färbe- und Messverfahren in der Durchflußzytometrie stellt sich die Frage nach der allgemeinen Anwendbarkeit einer einzigen Standardmethode Routinemäßig durchgeführte interne Vorversuche haben in unseren Laboratorien bereits bei geringfügigen Abweichungen in der Konzentration und in den Inkubationszeiten in Einzelfällen zu erheblichen Unterschieden der Meßergebnisse geführt.

Wir haben unfixierte Gewebeproben aus bisher 40 verschiedenen bösartigen Tumoren von Dickdarm, Niere, Lunge, Schilddrüse, Ovar und Pankreas sowie Neuroblastome verschiedenen Konzentrationen einer Zitronensäurelösung bei unterschiedlichen Inkubatinszeiten ausgesetzt.
Die Gewebeproben wurden unfixiert in PBS (phosphate buffered saline) und mit Zitronensäure in standardisierten Konzentra-tionen (0,21%, 1,05%, 2,1%) mit einer Einwirkungszeit von jeweils 5, 10 und 20 Minuten präpariert. Die Proben wurden teils mit DAPI, teils mit Ethidiumbromid gefärbt und im einparametrischen Messverfahren mit PARTEC PAS II und eines FACS Analyser (Becton Dickinson) gemessen. Die DNS-Histogramme wurden mit Hilfe des Multicycle Programmes (Phoenix Flow Systems) auf einem IBM Rechner ausgewertet.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Abhängigkeit des Nachweises aneuploider DNS-Stammlinien und der Höhe der S-Phasen-Fraktion sowohl von der Konzentration der Zitronensäure-lösung, als auch von den Inkubationszeiten, und der jeweiligen histologischen Beschaffenheit der Tumoren.

Bei 5 zellreichen, bindegewebsarmen Tumoren des Dickdarms und der Lunge "verschwand" eine bei PBS-Präparation deutliche aneuploide DNS-Stammlinie nach Zusatz von Zitronensäure. Dafür traten nach längerer Inkubationszeit mit zunehmender Konzentration in 4 Fällen DNS-Aneuploidien zusätzlich auf.

Sollte sich der bisher festgestellte Trend im weiteren Verlauf der Untersuchungen bestätigen, müsste die Präparationsmethode hinsichtlich Konzentration und Einwirkungsdauer der Lösungen dem jeweiligen feingeweblichen Aufbau des zu untersuchenden Tumors im Einzelfall angepasst werden.

Differenzierung zwischen körperlichem Ruhe- und Belastungszustand mit selbstlernender Klassifizierung durchflußzytometrischer Listendaten bei immunphänotypisierten Lymphozyten

Holger Gabriel*, Günter Valet°, Axel Urhausen*, Wilfried Kindermann*

*Institut für Sport- und Leistungsmedizin, Universität des Saarlandes, 66041 Saarbrücken
°Max-Planck-Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Zellbiochemie, 82152 Marinsried

Akute Körperarbeit führt zu einer Mobilisierung von Lymphozytensubpopulationen in das periphere Blut. Nach Ende der Körperarbeit verschwinden diese Lymphozyten rasch wieder aus der Zirkulation (1, 2). Dabei existiert eine differenzierte Mobilisierung, die zu einem raschen Anstieg der natürlichen Killerzellen ($CD3^-CD16/CD56^+$), der zytotoxischen, nicht MHC-restringierten T-Zellen ($CD3^+CD16/CD56^+$) und $CD8^+$ Lymphozyten führt. B-Zellen ($CD19^+$), T-Zellen ($CD3^+$) und $CD4^+$ Lymphozyten erscheinen in deutlich geringerer Konzentration und langsamer in der Zirkulation. ***Ziel*** war es, diese bekannten Veränderungen der lymphozytären Immunphänotypen der Auswertung mit dem selbstlernenden Klassifizierungsprogramm CLASSIF1 zuzuführen, um im Hinblick auf die weitverbreitete Beurteilung von prozentualen Anteilen der lymphozytären Immunphänotypen beispielhaft die Möglichkeit der Differenzierung anhand der standardisierten Klassifizierung von durchflußzytometrischen Listendaten aufzuzeigen. Zu diesem Zweck wurden vor und 60min nach (körperlicher Ruhezustand) sowie in der 10. und während der letzten beiden Belastungsminuten (Belastungszustand) einer intensiven, erschöpfenden Ausdauerbelastungen auf dem Fahrradergometer mit 110% der individuellen anaeroben Schwelle (n=22; Dauer: 20±7min) Leukozyten mit den FITC bzw. PE konjugierten MAK CD4, CD8, CD45RO, CD16, CD11a, CD69 immunphänotypisiert (lysiertes Vollblut, Protokoll Becton-Dickionson). Die Klassifizierung der duchflußzytometrischen Listendaten (FACScan) erfolgte mit dem CLASSIF1-Programmsystem (3). Die Erkennungsrichtigkeiten für den Belastungszustand lag bei 92,7%, für den Ruhezeitzustand bei 93,2%. Eine Einzelfallklassifikation zwischen den einzelnen der vier Belastungszeitpunkten war zu wenig trennscharf. Die Klassifizierung zur Differenzierung zwischen Belastungs- und Ruhezeitpunkten erfolgte aufgrund quantitativer Zellzahländerungen, vor allem der Zunahme der NK-Zellen ($CD16^+$). Oberflächenantigenkonzentrationen hatten keine signifikante Bedeutung für die Klassifizierung.
Schlußfolgernd ergibt sich, daß eine programmgesteuerte Klassifikation von Immunphänotypen in standardisierter Weise zwischen Ruhe- und Belastungszustand differenzieren kann. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen beispielhaft neue Möglichkeiten für eine klinikgerechte durchflußzytometrische Diagnostik.

Literatur:

1.) Gabriel, H., L. Schwarz, P. Born, W. Kindermann. Differential mobilization of leukocyte and lymphocyte subpopulations into circulation during endurance exercise. Eur. J. Appl. Physiol. 65:529-534, 1992.
2.) Gabriel, H., A. Urhausen, W. Kindermann. Mobilization of circulating leukocyte and lymphocyte subpopulations during and after a short, anaerobic exercise. Eur. J. Appl. Physiol. 65:164-170, 1992.
3.) Valet G., Tschöpe D., Gabriel H., Kahle H., Valet M.: Standardized, self learning flow cytometric list mode data classification for thrombocyte and lymphocyte immune phenotyping. In: Ann. N.Y. Acad. of Sciences, Eds: A.L. Landay, K.A. Kenold, K.D. Bauer, P.S. Rabinovich. 677:233-251, 1993.

Flußzytometrische Bestimmung der BrdU-Markierungsindices nach DAPI- und FITC-Fluorochromierung

Wolfgang Göhde*, Inge Tatchen** und Gerlind Bellmann**
* Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universität Münster
** Institut für Strahlenbiologie der Universität Münster

Die Bestimmung des Anteils von DNA-synthetisierenden Zellen (Markierungsindex) wird in zunehmendem Maße statt mit 3H-Thymidin mit Hilfe von Antikörpern ausgeführt, die sich an Basenanaloge binden.

Um getrennte Bestimmungen der Gesamtzellzahl und der BrdU-positiven Zellen zu vermeiden, wird meist die BrdU-FITC Markierung mit der Propidiumjodid-Gegenfärbung kombiniert. Diese beiden Fluorochrome lassen sich zwar mit Blaulicht (meist wird 488 nm verwendet) recht gut anregen, die Methode hat aber eine Reihe von Nachteilen. 1. Weite Überlappung der Fluoreszenzspektren. 2. Teilweise Denaturierung der DNA ist nicht immer genau reproduzierbar; sie vermindert zudem die Zahl der PJ-Bindungsstellen: je nach Denaturierung ist die PJ-Fluoreszenz oder die FITC-Fluoreszenz optimal. 3. Die DNA-Histogramme nach Denaturierung und PJ-Färbung lassen oft an Qualität zu wünschen übrig (zu hoher CV).

Diese Mängel der BrdU-Methode lassen sich durch die Kombination der BrdU Fluorochromierung mit FITC und der DNA-Fluorochromierung mit DAPI vermeiden.

Für die Messung wurde ein PAS-III (Partec) verwendet, das die UV-Anregung der DAPI-Fluoreszenz mit der eingebauten Quecksilberhöchstdrucklampe und der Blauanregung der FITC-Fluoreszenz mit dem eingebauten 25 mW Argonlaser erlaubt. Die Ergebnisse zeigen unabhängig vom Ausmaß der Denaturierung sehr gute DNA-Histogramme. Die FITC-Fluoreszenz kann ohne Rücksicht auf die DNA-Fluoreszenz optimiert werden. Es gibt nahezu keine spektrale Überlappung. Die Methode wird wegen der sehr guten DNA-Histogramm-Auflösung für andere FITC-Antikörpermarkierungen, z.B. zur Analyse von Leukämie- und Tumorbiopsien mit aneuploiden oder multiklonalen Zellinien, diskutiert.

Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose durch den kombinierten Einsatz von in-situ Nick Translation und Tailing Techniken

R. Gold [1], M. Schmied [2], G. Giegerich [1], G. Rothe [3], H-P.Hartung [1], K.V. Toyka[1], H. Lassmann [2]

[1] Forschungsgruppe für Multiple Sklerose und Neurologische Klinik der Universität Würzburg
[2] Institut für experimentelle Neuropathologie der Universität Wien
[3] Institut für klinische Chemie der Universität Regensburg

Die auf der in-situ Nick Translation (ISNT) durch die DNA-Polymerase[1] und dem Tailing durch die Terminale Transferase[2] beruhenden enzymatischen Methoden werden zum Nachweis von DNA-Fragmentation bei Apoptose auf der Einzelzellebene eingesetzt. Allerdings kommt es auch in Terminalstadien des nekrotischen Zelltods zu DNA-Strangbrüchen. Wir verglichen deshalb die beiden Methoden, denen unterschiedliche molekulare Mechanismen zugrundeliegen, an in-vitro und in-vivo Modellen für apoptotischen oder nekrotischen Zelltod sowohl in der Durchflußzytometrie als auch auf Gewebeschnitten.

Als in-vitro Modell für Apoptose diente der strahleninduzierte Zelltod von Thymozyten. Zeitkinetiken zeigten, daß ab 5 Stunden nach Bestrahlung bis zu 25% mehr Zellen durch das Tailing als durch ISNT markiert wurden. Dieser Unterschied war für alle eingesetzten Strahlendosen bis zu 13 Stunden nach Bestrahlung nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt wurden praktisch alle Thymozyten durch beide Enzyme markiert. Die Beurteilung von Apoptose anhand morphologischer Kriterien korrelierte mit den Tailing-Ergebnissen.

Diese Ergebnisse sprachen dafür, daß den spezifischen Doppelstrangbrüchen, die nur durch die terminale Transferase erfaßt werden, im Laufe des apoptotischen Zelltods zufällig verteilte Einzelstrangbrüche folgen, die auch durch ISNT markiert werden können. Dies wurde am Modell des komplementvermittelten nekrotischen Zelltods von Thymozyten bestätigt. Hier markierte die ISNT einen wesentlich größeren Bestandteil der Population als das Tailing.

Vergleichbare Ergebnisse fanden sich am Modell des durch Injektion von Kainsäure induzierten nekrotischen Zelltods von Neuronen im Rattenhippocampus. Hier wurden 24 Stunden nach Injektion Neurone, die lichtmikroskopische Zeichen von Kernpyknose und Fragmentierung zeigten, auch durch ISNT markiert, während sie im Tailing ungefärbt blieben.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß durch den kombinierten Einsatz von Terminaler Transferase und DNA-Polymerase sowohl durchflußzytometrisch als auch auf Gewebeschnitten zwischen DNA-Strangbrüchen bei Apoptose und Nekrose differenziert werden kann. Im Verlauf des apoptotischen Zelltodes kommt es wenige Stunden nach Auftreten der spezifischen Doppelstrangbrüche zu sekundärer DNA-Fragmentation.

1. Gold R, Schmied M, Rothe G, Zischler H, Breitschopf H, Wekerle H, Lassmann H (in press): Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. J Histochem Cytochem

2. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493

BINDING OF HEPARIN TO HUMAN GRANULOCYTES USING FLUORESCEIN-LABELED HEPARIN FRAGMENTS

Job Harenberg, Reinhard Malsch, Lukas Piazolo, Jacomo Torri*, Benito Casu*, and Dieter L. Heene.

1st Dept. of Medicine, Faculty for Clinical Medicine Mannheim, University of Heidelberg, W-6800 Mannheim, Germany, * Istituto di Chimica e Biochimica "G. Ronzoni", Milan, Italy

A newly synthesized low molecular weight heparin (LMWH)-fluorescein has been used to assess the binding of heparin to human granulocytes and to analyze the structure function relationship of heparin related oligosaccharides using flow cytometry. Fluorescein-isothiocyanat has been coupled specifically to tyramine which was bound by endpoint attachment to the anhydromanysyl group of LMWH. The binding has been verified and quantified by 1H NMR spectra. LMWH-fluorescein bound dose-dependently to CD 14 granulocytes. Unfractionated heparins of three different origins displaced dose-dependently LMW-FITC and independently of the source of heparin. With decreasing the molecular weight of heparin fragments the displacement of LMWH-FITC decreased. Consequently LMWH of different origins can be characterized by the differential binding to granulocytes. The minimal binding sequence of heparin related oligosaccharides was a dodecasaccharide. Di- to decasaccharides also displaced LMWH-FITC to about 20 %. Dermatan sulfate, chondroitin sulfates A and C and undersulfated heparin also displaced LMWH-FITC only between 10 - 20 %. There are no differences for high and low antithrombin III affinity heparins. Monoclonal antibodies to antithrombin III did not displace LMWH-FITC indicating that other receptors than antithrombin III are responsible for heparin binding on granulocytes. Specific IgG1 monoclonal antibodies to heparin detected native heparin and LMWH-FITC on the cell surface of granulocytes. Intravenous injection of LMWH-FITC into rabbits showed a high binding of the compounds to granulocytes. The data give evidence for the first time, that heparin and heparin fragments bind specifically to human granulocytes independently of antithrombin III. Further studies are necessary to evaluate the clinical relevance of heparin binding to human granulocytes.

Supported by German Research Council (DFG) Grant HA 1164/3-1

FUNCTIONAL DETECTION OF MDR EXPRESSING CELLS BY FLOW CYTOMETRY

Ludescher C., Hilbe W., Eisterer W., Preuß E., Hofmann J., Thaler J.
Universitätsklinik für Innere Medizin, Universität Innsbruck, Anichstr. 35, 6020 Innsbruck, Austria

Classical multidrug resistance (MDR) is associated with the overexpression of a membrane glycoprotein termed P-glycoprotein (P-gp) that transports a variety of apparently unrelated anti-cancer drugs out of cells. Based on the fluorescent properties of the dye rhodamine 123 (Rh123) we intended to develop a functional flow cytometric assay for the detection of MDR-expressing cells. Using drug sensitive cell lines (KB-3-1) and MDR mutants (KB-8-5, KB-C1) experimental conditions were established that enabled demonstration of significant differences in Rh123 accumulation /efflux. Using two-colour flow cytometry we subsequently analysed 42 consecutive patients suffering from B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). 34/42 (81%) cases showed a marked Rh123 efflux which was completely abolished in the presence of the MDR inhibitor verapamil. The percentage of Rh123 effluxing cells ranged from 10 to 70% with a median of 32%. In 26 cases extracted RNA was analysed by quantitative polymerase chain reaction to evaluate the expression of MDR1 mRNA. In 25 of 26 (96%) cases MDR1 mRNA was detectable. The levels of MDR1 mRNA expression correlated well with the results of the Rh123 efflux assay ($r=0.72$; $p<0.0001$). In addition 37 cases of acute myeloid leukemia were analysed and demonstrated Rh123 efflux in 18/37 (49%).cases. In this entity the percentage of Rh123 effluxing cells ranged from 12 to 80% (median 45%). Additionally, we evaluated the Rh123 efflux/retention in peripheral blood cells of healthy volunteers. We found Rh123 efflux in the following subsets: CD16+ natural killer cells > CD8+ T cells > CD45RA T cells > CD19+ B cells > CD4+ T cells. In granulocytes and monocytes no activ efflux was detectable.
Our results indicate that flow cytometric measurement of Rh123 efflux proves applicable to detect MDR expressing cells in heterogenous clinical samples.

CYTOKINE-EFFECTS ON B-CLL-CELLS IN SERUM FREE SUSPENSION CULTURES MEASURED BY FLOW CYTOMETRIC DNA ANALYSIS

H.F. Hinrichs, C. Junghanß, E.K. Petershofen H.-D. Kleine, H. Poliwoda, and M. Freund

Department of Hematology and Oncology, Hannover Medical School, Konstanty-Gutschow-Straße 8, 30623 Hannover, FRG.

The effects of Stem Cell Factor (SCF), Interleukin 2 (IL2), Interleukin 4 (IL4), Tumor Necrosis Factor α (TNFα), and Interferon α (IFNα) on peripheral blood B-CLL-Cells were studied in vitro by bromodeoxyuridine/propidium iodide (BrdU/PI) DNA analysis. Peripheral blood cells from patients with B-CLL were examined for B- and T-phenotype with mABs for CD 3, 4, 5, 8, 10, 19, 20, 21, 23, 25, and prepared as follows: after Ficoll density centrifugation and lysis of monocytes by leucine-methyl-ester (LME) T-Lymphocytes were depleted with a CD3/ Avidin/ MACS-bead - complex in the MACS-system (Miltenyi Biotech).

Cells were grown in serum free culture medium (CG-medium) containing SCF, TNFα, IFNα, IL2, or IL4, controls without cytokines. Samples were drawn repeatedly at 20, 68, 92, 116, and 140 hours. DNA-analysis was performed after double DNA staining with propidium iodide and anti-BrdU-antibodies and determinated by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson). Direct stimulation or inhibition of the cells was examined by calculating the cells positive for BrdU-incorporation into the genome. Effects of cytokines can be quantified by calculating the relative difference between the integrals below the curves. Differences of more than 10% are considered as significant stimulatory effect.

Whereas Stem Cell Factor did not show significant influences on B-cells, cytokines as IL2, IL4, TNFα, and IFNα reached proliferating effects. Using this approach B-CLL cells can be stimulated to change from their G_0-phase back to cell-cycle and could then be affected by chemotherapy.

Ergebnisse regionaler Rundversuche von Lymphozytentypisierung mittels Durchflußzytometrie.

R. JILCH und E. SCHÖNWALD

Zentrallabor (Vorstand: Prof.Dr. M.Fischer) und
Dermatologische Abteilung (Vorstand: Prof.Dr. F.Gschnait)
im Krankenhaus der Stadt Wien-Lainz
Wolkersbergenstraße 1, A-1130 Wien.

Eine Teilnahme an Rundversuchen bietet derzeit die einzige Möglichkeit einer externen Qualitätskontrolle durchflußzytometrischer Bestimmungen.
An diesen Rundversuchen haben bisher 9 Labors teilgenommen, die jeweils aus 2 Proben frischen EDTA-Blutes ein empfohlenes Antikörperpanel gemessen haben. Die Antikörperauswahl sollte einen Standard Immunstatus ergeben. Gemessen wurde an Geräten von drei verschiedenen Herstellern. Alle Ergebnisse wurden in Relativprozent und Absolutwerten ermittelt. Zur Auswertung wurden die Variationskoeffizienten je Subpopulation der Werte aller Teilnehmer und einer Kontrolle (eine Probe an einem Gerät mehrmals gemessen) herangezogen. Bereits die Kontrollmessungen zeigten, daß sich die erzielbaren Variationskoeffizienten je Subpopulation unterschieden. Bei den CD3-, CD4- und CD8-positiven Lymphozyten konnten auch in der Gesamtgruppe Werte weit unter 10% erhalten werden. Die Variationskoeffizienten der aktivierten T-Lymphozyten oder zytotoxischen T-Zellen waren deutlich höher. Die erzielten Ergebnisse zeigten, daß bereits nach dem zweiten Rundversuch positive Aspekte wie Verbesserung der Ergebnisse bzw. Förderung der Kontaktnahme und Zusammenarbeit erkennbar waren und Diskussionen zu strittigen Punkten neue Impulse geben konnten.

Aminopeptidase- und gekoppelte Protease-Aktivitätsbestimmungen in lebenden Zellen mit fluorogenen Rhodamin 110-Substraten

S. Klingel, S. Ganesh, H. Kahle und G. Valet

Arbeitsgruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, 82143 Martinsried

Leucin-Aminopeptidase (Leu-AP) ist eine wesentlich am Proteinstoffwechsel beteiligte substratunspezifische Exopeptidase. Sie zeigt signifikante Aktivität im Zytoplasma und in den Mikrosomen fast aller Zellen und spaltet schrittweise einzelne Aminosäuren - bevorzugt Leucin oder Phenylalanin - vom Amino-Terminus einer Peptidkette ab. Da Veränderungen der Leu-AP-Aktivität bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Vorgänge, wie Metastasierung von Tumoren und entzündlichen Prozessen, beschrieben sind, wurde versucht, intrazelluläre Aminopeptidase-Aktivitäten in lebenden Zellen zu bestimmen. Darüber hinaus wurde versucht, gekoppelte Enzymmessungen zu ermöglichen, bei denen zuerst eine spezifische Endopeptidase das Substrat spaltet und dessen Reaktionsprodukt von Aminopeptidasen (AP) weiter zu einem fluoreszenten Endprodukt abgebaut wird.

Die Bestimmung der Proteaseaktivität in lebenden Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist mit Substraten basierend auf dem Fluorophor Rhodamin 110 (R110) bereits bei den Cysteinproteinasen Cathepsin B bzw. L und bei Serinproteinasen wie Elastase möglich (Biol.Chem.Hoppe-Seyler 373: 547-554, 1992). Die neu synthetisierten, nicht-fluoreszenten Substrate $(H_2N\text{-L-Leu})_2$-R110 und $(H_2N\text{-L-Phe})_2$-R110 mit freien Aminogruppen erwiesen sich als sehr geeignet für die Messung der AP-Aktivität, da sie intrazellulär außerordentlich effizient zu fluoreszentem R110 gespalten wurden. Der Fluoreszenzanstieg ließ sich durch Vorinkubation mit den AP-Inhibitoren Leucin-Chloromethylketon oder 1,10-Phenanthrolin vollständig unterbinden. Da eukaryontische Leu-AP keine D-Aminosäuren abspalten kann, diente $(H_2N\text{-D-Leu})_2$-R110 als Kontrolle und führte in keinem Ansatz zu einem Anstieg der Fluoreszenz.

Die schnelle Spaltung der AP-Substrate ermöglicht nicht nur die Bestimmung der Aktivität von Aminopeptidasen, sondern zusätzlich auch von Proteasen, die keine Aminosäure-Fluorophor-Bindung, sondern nur reine Peptidbindungen spalten können. Dies konnte mit den Cathepsin B/L-Substraten $(Z\text{-Arg-Arg-Leu})_2$-R110 und $(Z\text{-Phe-Arg-Leu})_2$-R110 gezeigt werden. Zunächst spalten die Cysteinproteinasen die Dipeptide Z-Arg-Arg bzw. Z-Phe-Arg aus den Substraten spezifisch ab, gefolgt von der Freisetzung des hochfluoreszenten R110 aus dem verbleibenden, nicht-fluoreszenten $(H_2N\text{-Leu})_2$-R110 durch Leu-AP. Diese gekoppelte Reaktion erweitert das Anwendungsspektrum der Rhodamin-Substrate für den Nachweis weiterer Zellproteasen, wie z.B.Cathepsin D.

Gefördert durch DFG SFB 207, Projekt G6

Is Monocyte Subpopulation Determination Suitable for Status and Regression Analysis in Atherosclerosis?

E. Kovacs, G. Rothe, G. Schmitz

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin- Zentrallaboratorium und Blutbank, Klinikum der Universität Regensburg, D-93042 Regensburg

The involvement of peripheral blood monocytes in the development of atherosclerosis (AS) through their dual role in inflammatory processes and vessel wall lipid and lipoprotein metabolism is well established. However, the question arises whether the enhanced adhesion and migration of monocytes from the plasma compartment into the subendothelial space in AS is either caused by activating effects of atherogenic lipoproteins exerted on all blood monocytes or only on specific monocyte subpopulations with distinct functional properties and higher susceptibility for inducing vessel wall transmigration. We investigated in a flow cytometric study the expression of activation and differentiation markers (CD14, CD16, CD4, HLA-DR), complement regulatory proteins (CD35, CD46, CD55, CD59) and adhesion molecules (CD11a, CD11b, CD18, CD48) on monocytes from freshly drawn blood of hypercholesterolemic patients with or without LDL-receptor deficiency (FH). We also determined by three color immunefluorescence blood monocyte subpopulations in order to analyze whether they reflect the different tissue targetting of mononuclear phagocytes into the reticuloendothelial system (RES) or to the vessel wall in various genetic disorders of lipoprotein metabolism. A significant decrease of differentiation markers (CD14, CD16, HLA-DR) and adhesion molecules against endothelial targets (CD11a, CD18) on blood monocytes was observed among the patients with FH suggesting the depletion of activated monocytes from circulation. Hypercholesterolemics with normal LDL-receptor status in contrast, showed increased expression of differentiation and endothelial adhesion markers as compared to healthy controls. A selective depletion of mature monocytes from circulation was also suggested in AS by the reduction of the $CD14^+/CD16^+/CD64^-$ "premacrophage" subpopulation in CHD^+ patients, which pool was reconstituted during regular therapy with LDL-apheresis in homozygote FH patients. In a family with cholesteryl ester storage disease (CESD), who have a 72 bp depletion of the acid lipase gene leading to hypercholesterolemia, early onset of AS and hepatosplenomegaly, the decrease of the $CD14^+/CD16^+/CD64^-$ subpopulation was accompanied with the appearance of an abnormal $CD14^{++}/CD16^+$ double positive population. Tangier disease is characterized by a cellular defect in processing HDL precursors to mature HDL and a widespread accumulation of monocytes in the RES, but not in the vessel wall. A selectively increased expression of extracellular matrix (ECM) receptor- CD44 indicated the role of ECM in monocyte uptake by the RES in Tangier disease. In addition, the appearance of the $CD14^{++}/CD16^+$ double positive and a $CD1a^+$ populations similar to the findings in CESD might correlate with the enhanced migration of blood monocytes into the spleen in both diseases. Our results suggest that circulating blood monocytes and monocyte subpopulations may be important targets for the ex vivo monitoring of enhanced AS risk in genetic disorders of lipoprotein metabolism and the AS status and regression during therapy.

APO-1 MEDIATED APOPTOSIS IN NORMAL AND MALIGNANT LYMPHOCYTES.

P.H.Krammer

In the context of negative growth regulation of normal and malignant lymphocytes, the monoclonal antibody anti-APO-1 was raised. Anti-APO-1 induced programmed cell death, apoptosis.
Anti-APO-1 defined the novel cell surface molecule APO-1. The APO-1 antigen was purified to homogeneity and found to be a transmembrane glycoprotein of 48 kD relative molecular weight, identical to the Fas antigen. Peptides of the purified APO-1 molecule were sequenced and the APO-1 cDNA was cloned. The APO-1 molecule is a novel member of the TNF receptor superfamily. The APO-1 mediated apoptosis signal required crosslinking of the APO-1 antigen. Two requirements for induction of apoptosis in the APO-1 system were identified: expression of the APO-1 antigen and an intact apoptosis signalling pathway. In human peripheral blood T and B lymphocytes, expression of the APO-1 antigen and susceptibility to anti-APO-1 induced apoptosis were dependent on the stage of activation and differentiation. Anti-APO-1 induced apoptosis was prevented by mechanisms of T cell activation, e.g. via CD3 of the T cell receptor. Heterogenous APO-1 expression was found on a variety of human tumor cell lines *in vitro* and on cells from various tumors taken directly from patients. These malignancies include pre-T-ALL, pre-B-ALL, CLL, various other tumors of the lymphoid series, B lymphoblastoid cell lines, glioblastomas, mammary carcinomas, colon carcinomas and soft tissue tumors. Susceptibility of corresponding *in vitro* cell lines to induction of anti-APO-1 mediated apoptosis was heterogenous. In contrast, cells obtained directly from ATL patients were almost completely sensitive.
These data may help to understand programmed cell death, apoptosis, on the molecular level, to assess the role of APO-1 expression in diagnosis and prognosis, and to test apoptosis as a concept of a rational intervention strategy in tumor therapy.

Tumorimmunology Program, Division of Immunogenetics, German Cancer Research Center, INF 280, 69120 Heidelberg, FRG.

IMPROVED DETERMINATION OF S-PHASE FRACTION AND PLOIDY FROM PARAFFIN SECTIONS: APPLICATION IN FLOW CYTOMETRIC DNA-ANALYSIS OVARIAN CARCINOMAS AND OVARIAN TUMORS OF BORDERLINE MALIGNANCY.

P. Kreisberger, N. Harbeck, E. Schüren, P. Ziffer, L. Pache, W. Kuhn, B. Schmalfeldt, M. Schmitt, F. Jänicke, P. Dettmar*, H. Höfler* and H. Graeff.

Frauenklinik und *Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität, München.

The prognostic importance of flow cytometric DNA analysis (ploidy and S-phase fraction) in gynecological malignancies is still controversial, partly due to differing methods of tissue extraction and data analysis. In particular, if paraffin sections are used, the quality of the results depends very much on the 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): After dewaxing and rehydrating, the sections are incubated in 0.5 % pepsin (pH 1.5, 37 °C, 2h). The nuclei are washed, filtered, resuspended in PBS-EDTA containing 100 U/ml RNAse, and dyed with propidium iodide. Nuclei of peripheral human blood cells serve as internal controls. The flow cytometric measurements are performed on a FACScan (Becton & Dickinson, Heidelberg, Germany). For data analysis we used the MODFIT software program (Verity Software House, Maine, USA): This program enables exact S-phase analysis even in aneuploid tumors with overlapping populations. Calculation of debris and aggregates can be adjusted for paraffin material.

Paraffin sections of 90 ovarian carcinomas and of 20 ovarian tumors of borderline malignancy were then evaluated by flow cytometry for ploidy and S-phase fraction (SPF). Of the ovarian carcinomas, 58 tumors (64 %) were diploid, 31 tumors (34 %) aneuploid and 1 tumor (2 %) tetraploid. All 20 borderline tumors were diploid. Using the CART-method (classification and regression trees), an optimal cutoff of 2 % was determined for the borderline malignancies: 17 (85 %) had a low ($\leq$ 2 %) and 3 (15 %) a S-phase (> 2 %). S-phase fraction (SPF) in diploid borderline tumors was a statistically significant prognostic factor for overall survival ($p = 0.0308$): 2/3 patients with high SPF have already died, as opposed to none of the 17 patients with low SPF. Correlation of ploidy and S-phase to other prognostic factors and the follow-up data of the ovarian carcinoma patients is currently being evaluated.

The method presented here allows fast and reproducible flow cytometric DNA analysis. If proper care is taken with respect to tissue extraction and data analysis, determination of S-phase and ploidy can be quite useful as prognostic factors in gynecological malignancies. To determine their impact in ovarian cancer, especially in borderline malignancies where new prognostic factors are urgently needed, further evaluation in larger patient collectives with longer follow-up periods is certainly required.

SIMULTANEOUS DETECTION OF MULTIPLE CHROMOSOMAL ABNORMALITIES BY FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

P. Lichter[1], S. Joos[1], U. Mathieu[1], S. Stilgenbauer[1], G. Cabot[2], M. Bentz[1], H. Döhner[2]

[1]Deutsches Krebsforschungszentrum and [2]Medizinische Klinik und Poliklinik V, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

Recent developments in fluorescence in situ hybridization techniques and digital imaging microscopy provide powerful tools for the detection of specific chromosomal abnormalities. The potential of various kinds of probes and probe sets to diagnose numerical and/or structural chromosomal aberrations is utilized for the analysis of metaphase chromosomes and interphase nuclei. Examples will be presented from our studies of B-CLL and acute leukemias. Hybridization of an alphoid probe specific for the centromere of chromosome 12 to cell nuclei of B-CLL patients revealed a higher incidence of trisomy 12 than detected by conventional chromosome analysis. By using a probe set spanning the 200kb of the retinoblastoma susceptibility gene (RB-1) located in 13q14, we found an unexpectedly high frequency of monoallelic RB1 deletions in B-CLL. Diagnosis of the bcr/abl fusion is performed by employing a new two color hybridization probe set which detects the translocation breakpoints in CML as well as ALL. These characterizations of probes detecting single chromosomal aberrations provide the basis for the development of disease specific multicolor probe sets designed for the simultaneous detection of the most relevant aberrations in chronic and acute leukemias. The current status of the development of such probe sets for ALL will be presented.

A new approach termed comparative genomic hybridization (CGH, Kallioniemi et al., Science 258:818-821) has been developed: whole genomic DNA from a particular cell population is hybridized to normal metaphase chromosomes. Above a general chromosomal staining, regions overrepresented in the analyzed genome (e.g. a trisomy or amplified sequences) become detectable by a stronger fluorescence signal, whereas underrepresented regions (e.g. a deletion) yield in weaker stained areas. Thus, CGH allows a comprehensive analysis of chromosomal imbalancies without the use of specific probe sets. Data from leukemias and solid tumor samples will be presented and the implications of CGH for the investigation of genetic changes in malignant disorders will be discussed.

DIFFERENZIERUNGSASSOZIIERTE ANTIGENE UND ADHÄSIONSMOLEKÜLE AUF CD34$^+$ BLUTSTAMMZELLEN

R. Möhle, K. Theilgaard-Mönch, R. Haas und W. Hunstein
Med. Klinik u. Poliklinik V, Universität Heidelberg, Hospitalstr. 3, 69115 Heidelberg

Das Antigen CD34 erlaubt die Bestimmung hämatopoetischer Stammzellen im Durchflußzytometer. Für die autologe Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation bietet die Messung der CD34-Expression eine Alternative zu den semisoliden klonogenen Kulturassays. Während des Leukozytenanstiegs nach Chemotherapie sowie nach Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren zirkulieren CD34$^+$ Zellen im peripheren Blut ("Mobilisierung") und können durch Leukapherese gewonnen werden.
Um die periphere CD34$^+$-Zellpopulation näher zu charakterisieren, untersuchten wir mittels Zweifarben-Durchflußzytometrie die Expression von differenzierungsassoziierten Antigenen (CD33, CD38, HLA-DR, c-kit) und Adhäsionsmolekülen (LFA-1, VLA-4, L-Selectin, ICAM-1, CD44) auf CD34$^+$ Zellen aus Leukaphereseprodukten von Patienten mit malignen Lymphomen und soliden Tumoren. Zur Stammzellmobilisierung benutzten wir G-CSF.
Über 90% der mobilisierten CD34$^+$ Zellen waren positiv für CD38 und HLA-DR. Die Expression von c-kit, dem Rezeptor für den Stammzellfaktor, hingegen lag unter 10%, während der myelomonozytäre Marker CD33 mit Werten zwischen 10% und 90% zwischen den einzelnen Patienten erheblich variierte. Insbesondere die Ergebnisse der HLA-DR- und CD38-Expression sprechen dafür, daß die Mehrzahl der CD34$^+$ Zellen liniendeterminierte Vorläuferzellen sind. Wird G-CSF nicht im Anschluß an eine Chemotherapie, sondern während der Ruhehämatopoese zur Mobilisierung von Blutstammzellen eingesetzt, ist die Anzahl der zirkulierenden CD34$^+$ Zellen im peripheren Blut etwa 10-fach geringer, jedoch findet sich auch ein höherer Anteil CD33$^-$, CD38$^-$, HLA-DR$^-$ und c-kit$^+$ Zellen. Dies spricht für einen höheren Anteil früher hämatopoetischer Stammzellen.
Die Adhäsionsmoleküle VLA-4 und ICAM-1 sind auf peripheren CD34$^+$ Zellen nur schwach exprimiert, während CD44 wie im Knochenmark auf mehr als 90% der CD34$^+$ Zellen nachweisbar ist. L-Selektin und LFA-1 sind auf etwa 50% der CD34$^+$ Zellen positiv, wobei im Knochenmark LFA-1 höher exprimiert wird, ebenso wie bei Mobilisierung mit G-CSF während der Ruhehämatopoese. Bemerkenswert ist der völlige Verlust von L-Selektin durch die für eine Transplantation erforderliche Kryopräservation der Zellen.
Differenzierungsassoziierte Antigene und Adhäsionsmoleküle sind auf CD34$^+$ Zellen von Blut und dem Knochenmark unterschiedlich exprimiert. Darüberhinaus hängt die Zusammensetzung mobilisierter Stammzellen davon ab, ob G-CSF während der Ruhehämatopoese oder nach Chemotherapie gegeben wird.

SIX COLOR FLOW CYTOMETRY OF CALCIUM RESPONSE IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Ravi Mylvaganam, Ph. D.,
Systems Applications Development -- Research Platform,
Coulter Corporation, Miami Lakes, Florida, USA

The flowcytometric measurement of intracellular calcium can be performed by using the calcium dyes Indo-1, Fluo-3 and Fura Red. Of these, Indo-1 is by far the better characterized and commonly used dye for calcium studies. Indo-1 is excited by ultraviolet (UV) light and emits at the violet wavelength when bound to calcium and blue region when free of calcium. By looking at the change in intensities of the violet to the blue wavelengths, the entry of calcium into cells can be measured ratiometrically. It has been reported that the entry of calcium into cells is one of the early events in cell activation and subsets of T lymphocytes handle calcium differently.

We have developed a multicolor flowcytometric procedure to simultaneously identify subsets of Indo-1 loaded lymphocytes using antibodies conjugated with four different fluorochromes and measuring the calcium response. Peripheral blood lymphocytes (PBL) were obtained from normal donors by centrifuging anticoagulated blood over a density gradient. The PBLs were washed twice with Hank's balanced salt solution (HBSS) and resuspended in RPMI 1640 containing 1 % fetal calf serum. The PBL suspension was loaded with 3 uM Indo-1 for 30 minutes at 37 °C. After loading the cells were kept in the dark at ambient temperature until required. For surface staining antibodies conjugated with FITC, phycoerythrin (RD1), phycoerythrin coupled to Texas Red (ECD), and allophycocyanin (APC) were added to Indo-1 loaded PBLs and incubated for 10 minutes at ambient temperature. HBSS was added, the contents centrifuged, and the supernatant discarded followed by resuspension in RPMI 1640.

Sample analysis (within 10 minutes of final resuspension) was performed on an EPICS Elite equipped with a gated amplifier and three lasers. The argon ion laser beam was set as the upper beam and the UV and helium neon laser beams as the lower collinear beam. Two of the photomultiplier tubes (PMTs) in the EPICS Elite have the capacity of each collecting emissions from two different dyes excited by two different lasers. Therefore, in this system six colors: FITC, RD1, ECD, APC, Violet, and Blue can be measured with only four PMTs. The PBLs were stimulated with the mouse anti-human CD3 monoclonal antibody and the calcium response measured for 10 minutes. The data was saved as a list mode file and replayed later for analysis.

Ergebnisse des Pilotringversuchs der Referenzinstitution zur Immunphänotypisierung

T. Nebe*, R. Kattermann*, A. v. Rücker+, F. Biedlingmeier+, D. Prohaska# und K. Kleesiek#

*Institut für Klinische Chemie, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg, +Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn, #Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herzzentrum Nordrhein-Westfalen, Bad Oeynhausen

Die externe Qualitätssicherung für die durchflußzytometrische Immunphänotypisierung von peripheren Blutlymphozyten wird in Deutschland im internationalen Vergleich verspätet etabliert. Die etablierten Institutionen für Ringversuche, INSTAND in Berlin und die Referenzinsitution in Bonn, haben daher unabhängig Pilotringversuche veranstaltet, um eine externe Qualitätssicherung möglichst bald auf regelmäßiger Basis anbieten zu können. Die Vorgehensweise beruht auf Vorschlägen, die von der Arbeitsgruppe Durchflußzytometrie und bildgebende Verfahren erarbeitet wurden und Erfahrungen aus anderen Ländern berücksichtigen.

In kleineren Pilotringversuchen wurde bereits das Material erprobt und die Einflußgrößen der Analytik abgeschätzt.

Mit Unterstützung von Fachverbänden und Industrie wurden ca. ca. 350 Insitutionen eingeladen. Der Teilnahmewunsch von 230 Laboratorien ist angesichts der fehlenden Ringversuchspflicht beträchtlich.

An 230 Laboratorien in der Bundesrepublik wurden Ende Juni zwei speziell vorbereitete Vollblutproben (A und B) versandt. Die Herkunft der Teilnehmer umfaßte sowohl den Bereich der Patientenversorgung als auch den der Forschung. Als Meßparameter sollten die Markerkombinationen CD14/45, CD3/19, CD3/16&56, CD3/4, CD3/8 und optional CD19/kappa bzw. CD19/lamba und die Retikulozyten ermittelt werden.

Die Resultate und die Methoden wurden auf einem Formular erfragt zur Auswertung mit Hilfe der Software der Referenzinstitution, welche für bereits existierende Ringversuchsparameter entwickelt wurde. Die Ergebnisse von A und B werden als sog. Youden-Plots graphisch dargestellt. Wegen fehlender Referenzmethoden und streuender Expertenergebnisse im Vorversuch sind Ausreißer-bereinigte Mittelwerte (Konsensusmethode) als Zielwerte vorgesehen.

Neben dem "state of the art" sollen die möglichen Zusammenhänge der Streuung mit der Art Probenvorbereitung und den Reagenzien aufgezeigt werden.

Welche Ploidieeinteilung ist von prognostischer Bedeutung beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus unter Berücksichtigung der Heteroploidie?

H. Nekarda[1], G. Techen[1], K. Becker[2], K. Ulm[3] J. Roder[1], U. Fink[1] and J.R. Siewert[1];

[1]Chirurgische Klinik,[2]Institut für Pathologie, [3]Institut für Statistik,Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

In der Literatur wird die Bestimmung der Ploidie beim operierten Plattenepithelkarzinom des Ösophagus als ein "tumorbiologischer" Parameter mit prognostischem Wert für das Überleben diskutiert. Wesentliche Kritik begründet sich in der Heteroploidierate dieser Tumorentität (DNA-Indexdifferenz von >0.1 in 2 Tumorproben) von 26 % (Cancer 68:2403,1991) bis 28 % im eigenem Kollektiv (Abstraktband, Zytometrie Symposium, 1992, S 59).

Wir haben in einer prospektiven Studie von 62 Patienten mit einem nicht vorbehandelten operierten Plattenepithelkarzinom des Ösophagus , die länger als 3 Monate lebten, untersucht, welche Gruppierung des DNA-Index die größte prognostische Beteutung für das Überleben im Vergleich zu den "konventionellen" prognostischen Parameter (Residualtumorstatus, pTNM-Kategorien der UICC,1987, histologische Grading) hat.
Nach der Vindeloev-Methode wurde aus histologisch kontrollierten 70μm Kryostatschnitten von schockgefrorenem Tumorgewebe eine Kernsuspension hergestellt und im FACScan mit 1% Propidiumjodid gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Multicycle.Der CV-Wert lag bei 4 +- 1 %.
Mindestens zwei Tumorproben konnten bei 51 Patienten (82%) gemessen werden. Die Heteroploidierate war 33%. Auf der Basis des jeweils theoretisch prognostisch schlechteren DNA-Index der Messungen wurden vier Ploidiegruppen (PG) eingeteilt : **PGI**: DI=1-1.2 (n=21; 34%), **PGII**: DI=1.8-2.2 (n=8; 13%), **PGIII**: :DI=1.3-1.7 (n=28; 45 %), **PGIV**: DI= >2.2 oder multiploid (n=5; 8%). Die einzelnen Gruppen wurden weiterhin zu drei Ploidieklassen (PK) zusammengefaßt [**PK1**= (PGI, PGII, PGIII+PGIV) **PK2**= (PGI+PGII, PGIII, PGIV), **PK3**= (PGI+PGII, PGIII+PGIV)] und in einer multivariaten COX-Regressionsanalyse ($p<0.05$) hinsichtlich des Überlebens mit den anderen Parametern ausgewertet.
In dem Gesamtkollektiv war der Residualtumorstatus (R0/R1,2), die Tumorinfiltrationstiefe (pT1/2/3), der Lymphknotenbefall des Truncus coeliacus (pM0/1[Lym]) und die Ploidieklasse 3 unabhängige prognostische Parameter. Das relative Sterberisiko war in den einzelnen Kategorien um das 2,9-fache, 2,4-fache, 4-fache beziehungsweise 2,6-fache erhöht. In der prognostisch günstigeren Subgruppe der 47 Residualtumor frei resezierten Patienten (76%) ohne lymphogene Fernmetastasierung (pM0,R0) waren die Tumorinfiltrationstiefe (T1,2 versus T3) und die Ploidieklasse 3 unabhängige prognostische Parameter. In der nodal negativen Untergruppe (pN0,M0,R0) von 21 Patienten (34%) war der einzige signifikante prognostische Parameter die Ploidieklasse 3.
Zusammenfassend zeigte sich, daß unter der Vorausetzung einer zusätzlichen Ploidiemessung aus dem Primärtumor die Heterogenität des Tumors für die prognostische Beurteilung an Hand der DNA-Indices von untergeordneter Bedeutung ist, da eine relevante prognostische Einteilung durch die Zusammenfassung von diploiden, nahe diploiden und tetraploiden versus aneuploiden, hypertetraploiden oder multiploiden Plattenepithelkarzinomen vorgenommen werden kann.

Konzentrationsbestimmung von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten in verdünntem Vollblut durch Messung der Lichtstreuung mit Hilfe eines Laser-Durchflußzytometers

J.Neukammer, V.Ost, H.Rinneberg

Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Berlin-Charlottenburg, Abbestr. 2-12, 10587 Berlin

Im Laboratorium "Zytometrie" der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt ist ein Laser-Durchflußzytometer zur Bestimmung der Konzentration (Anzahldichte) von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten aufgebaut worden. Dabei können simultan für jede einzelne Zelle bis zu vier Meßgrößen registriert werden. Erythrozyten und Thrombozyten werden anhand ihrer verschiedenen Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (Kleinwinkelstreuung) bei 488 nm oder 632.8 nm und durch den axialen Lichtverlust (Extinktion) bei Verwendung eines Amplituden-stabilisierten He-Ne-Lasers unterschieden. Bei der Bestimmung der Anzahldichte der Leukozyten wird ausgenutzt, daß aufgrund der starken Absorption des Hämoglobins im Maximum der Soret-Bande (414 nm) die Intensität der durch die Erythrozyten hervorgerufenen Lichtstreuung drastisch reduziert ist. Unter Verwendung eines Kr^+-Lasers bei 413.1 nm lassen sich in verdünntem Vollblut bei der Beobachtung der Kleinwinkelstreuung und der seitlichen (90°) Streuung Erythrozyten und verschiedene Leukozytensubpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) identifizieren, so daß die bisher erforderliche Zerstörung der Erythrozyten durch Hämolyse nicht mehr erforderlich ist. Das optische Durchflußzytometer wird neben Zellzählgeräten, die nach dem elektrischen Verfahren (Coulter-Verfahren) arbeiten, zur Ermittlung von Referenzwerten im Rahmen von Ringversuchen zum kleinen Blutbild eingesetzt werden.

STANDARDISIERUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN BESTIMMUNG VON HLA-KLASSE I ANTIGENEN, "THROMBOZYTENSPEZIFISCHEN" GLYKOPROTEINEN SOWIE VON AKTIVIERUNGSMARKERN AN THROMBOZYTEN

J. Neumüller[1], M. Tohidast-Akrad[1], R. Jilch[2], W.R. Mayr[3]

[1]Ludwig Boltzmann Institut für Rheumatologie und Balneologie, Kurbadstr. 10, A-1107 Wien^
[2]Zentral-Laboratorium des Krankenhauses der Stadt Wien-Lainz, Wolkersbergenstr. 1, A-1130 Wien
[3]Klinische Abteilung für Blutgruppenserologie, Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien-Universitätskliniken, Währinger Gürtel 18-20, A-1090 Wien

Die Durchflußzytometrie (DFZ) ermöglicht eine reproduzierbare Untersuchung thrombozytärer Oberflächenantigene. Da Thrombozyten (Thr) hinsichtlich ihrer geringen Größe im unteren Erfassungsbereich des DFZ liegen und durch Blutabnahme sowie durch Isolation aktiviert werden können, sind standardisierte Präparationsprotokolle notwendig. Zur Erstellung von Standardvorschriften wurden Vergleichsuntersuchungen durchgeführt und eigene Präparationsprotokolle erstellt. Für die Blutabnahme wurden Einmal-Vakuum-Blutabnahmeröhrchen (Greiner, Deutschland) mit Zitrat- oder ACD-Lösung verwendet und miteinander verglichen. Es wurden 3 Isolationsverfahren geprüft: 1. Isolation durch differentielle Zentrifugation nach Tschöpe et al. (Platelets (1991) 1: 127-133); 2. Isolation mittels Ficoll Hypaque, 1:3 mit PBS verdünnt, und 3. Isolation mithilfe einer Thrombofuge (Coulter, USA). Außerdem wurde geprüft, inwieweit eine, vor der Markierung der Thr durchgeführte Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA), zu einem Antigenverlust führte.
Folgende Antigene wurden nach Markierung mit monoklonalen Antikörpern (MAK) der Firmen Becton Dickinson (USA) und Immunotech (Frankreich) mit einem FACScan mithilfe der Lysys-Software (Becton Dickinson, USA) untersucht: Glykoproteine (GP), wie GPIa/IIa, GPIIb, GPIIb/IIa, HLA-Klasse I, sowie Aktivierungsmarker wie Thrombospondin (TSP), CD 62 und CD 63.

Die Blutabnahme in Zitratpuffer-Röhrchen erbrachte gegenüber der in ACD-Röhrchen eine bessere Bewahrung der Antigenität.
Im Streulicht-Doppelhistogramm werden Thr von Proteinaggregaten und Detritus überlagert. Um eine Thr-Ausbeute > 90 % zu erhalten, war daher bei der DFZ-Messung eine Konzentration von 10^7-10^8 Thr/ml PBS notwendig. Die Isolation mithilfe der Thrombofuge erlaubte keine ausreichende Abtrennung der Erythrozyten und führte zu einer Anreicherung von Detritus. Die beiden anderen Isolationsmethoden lieferten brauchbare Ergebnisse, die Isolation mit Ficoll Hypaque erbrachte jedoch gegenüber der differenziellen Zentrifugation eine höhere Thr-Ausbeute.
Eine 15-minütige Fixation mit 1 % PFA in PBS ergab zumeist die beste Antigenerhaltung (höhere Fluoreszenzintensitäten als bei nicht fixierten Thr). Eine Ausnahme bildeten die Aktivierungsmarker TSP, CD 62 und CD 63, bei denen eine 15-minütige Fixierung mit 0,1 % PFA die besten Ergebnisse lieferte. Die Isolation der Thr führte zu deren Aktivierung. Um diesen Vorgang zu vermeiden, wurde das Vollblut sofort nach der Blutabnahme 15 Min. mit 1 % PFA fixiert. So konnte ein etwaiger Thr-Aktivierungszustand von Patienten erfaßt werden, ohne daß es zu einer Interferenz mit der isolationsbedingten Aktivierung kam. Um die Aktivierbarkeit der Thr durch Thrombin, ADP usw. *in vitro* zeigen zu können, wurden sofort nach der Blutabnahme fixierte Thr mit nach der Isolation fixierten Thr im DFZ hinsichtlich ihrer Aktivierungsmarker verglichen.
Zusätzlich wurden HLA Klasse I Antigene untersucht, die teils als integrale Memban-GP, teils jedoch nur in adsorbierter Form an der Thr-Membran nachweisbar sind. Nach Behandlung mit Chloroquin bei pH 5 (2 Stunden) oder mit Zitronensäure bei pH 3 (10 Minuten) kann die Antigenität der HLA Klasse I Antigene reduziert oder ausgelöscht werden, während die "thrombozytenspezifischen" GP nahezu unverändert bleiben. Es konnte mithilfe von MAK, die mit der nativen schweren Kette der HLA Klasse I Antigene, nicht jedoch nicht mit dem gesamten Heterodimer reagieren, gezeigt werden, daß die Chloroquin- oder Zitronensäurebehandlung hauptsächlich zu einer Abspaltung des β_2- Mikroglobulins führt, sodaß neue Epitope an der nativen schweren Kette des HLA Klasse I Moleküls für diese Antikörper erkennbar werden. Diese Methodik des HLA-Antigen-"Strippings" kann zur Differenzierung von Allo- oder Autoantikörpern gegen HLA Klasse I Antigene bzw. thrombozytenspezifische Antigene und auch therapeutisch bei alloimmunen Thrombozytopenien angewendet werden (Shanwell et al., Br J Haematol (1991) 79: 462-465).

Analysis of the chromosomal composition of micronuclei using flow cytometry and fluorescence in situ hybridization (FISH)

*Michael Nüsse and +Beate M. Miller

*GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Biophysikalische Strahlenforschung, AG Durchflußzytometrie
85758 Oberschleißheim
+PRPT, Preclinical Division, Pharma Research, Hoffmann La-Roche AG, Basel, Switzerland

The chromosomal composition of micronuclei induced by the spindle damaging agent 2-chlorobenzylidene malonitrile (the tear gas CS) and by ionizing radiation as a clastogenic agent was studied in mouse NIH 3T3 cells. From a suspension of micronuclei and nuclei micronuclei with specific DNA contents were sorted on glas slides and hybridized to a murine centromere-specific gamma-satellite DNA probe. A clear correlation between DNA content of micronuclei and number of centromeric hybridization signals was obtained. About 80% of CS-induced micronuclei with low DNA contents contained one hybridization spot (indicating one chromosome or chromatid). With increasing DNA content of micronuclei, two, three or more centromeric hybridization signals were found indicating the presence of several chromosomes per micronucleus. Radiation-induced micronuclei with low DNA contents, however, did not show centromeric signals indicating their formation from acentric chromosome fragments. Only a small fraction of micronuclei with higher DNA contents (> 5% of G1-phase nuclei) showed centromeric signals.
These results agreed well with results from theoretical calculations of micronucleus distributions based on data from in situ hybridization on micronuclei in fixed cells.
The DNA distribution of micronuclei can be measured quickly and easily using flow cytometry giving information on possible mechanisms of action of chemicals. By sorting of micronuclei from interesting regions and hybridizing them with specific DNA probes, the chromosomal composition of micronuclei can be studied in detail.

Ergebnisse des Ringversuchs 1993 zur Standardisierung der durchflußzytometrischen DNA-Messung.

Friedrich J. Otto

Fachklinik Hornheide, Experimentelle Tumorforschung, 48157 Münster

Der zweite größere Ringversuch zur Standardisierung der durchflußzytometrischen DNA-Messung, der im Januar 1993 durchgeführt wurde, fand wiederum eine erfreuliche Beteiligung. 33 Labors hatten zugesagt und erhielten die Proben zugesandt; 26 Labors führten die Messungen durch und schickten auswertbare Daten zurück. Einige Labors setzten mehrere unterschiedliche Färbemethoden ein.

Die Proben bestanden aus tierischen und menschlichen Zellen und Zellkulturen, die ohne irgendeine Vorbehandlung in Ethanol fixiert waren.

Die Auswertung ergab ein wenig befriedigendes Bild. Die Meßwerte und abgeleiteten Daten zeigten eine erhebliche Streuung.

Die Meßgenauigkeit war in den verschiedenen Labors sehr unterschiedlich. Auch bei Anwendung desselben Färbeverfahrens und Einsatz des gleichen Meßgerätes ergab sich eine hohe Streuung der CV-Werte. Insgesamt schnitt, wie bereits im ersten Ringversuch, die DAPI-Färbung in Kombination mit HBO-Lampe am besten ab.

Die Bestimmung der DNA-Indizes, die für wenig kritisch angesehen wird, ergab unerwartet große Abweichungen. Die Ursachen dieser Aweichungen müssen gefunden und abgestellt werden, wenn die DI-Bestimmung zuverlässig und die Befunde vergleichbar sein sollen.

Bei der Ermittlung der S-Phasen-Anteile, die bei 3 Proben durchgeführt wurde, waren Schwankungen nicht unerwartet. Die Analyse der Ergebnisse deutet darauf hin, daß systematische Fehler vorkommen, die weniger von der Auswerte-Software als vom Auswerter abhängen.

Angesichts dieser Resultate ist die Notwendigkeit offensichtlich, weitere Anstrengungen zur Standardisierung der Methode zu unternehmen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse und Sicherheit der Aussagen zu gewährleisten.

THE IMPACT OF BIOIMAGING TECHNIQUES IN QUALITATIVE CYTOLOGY

J.S.Ploem, University of Leiden, The Netherlands

Image cytometry has developed significantly in the last decade. The main reasons for this development are: (1) The development of powerful personal computers at an affordable price. (2) The construction of automated microscopes. (3) The availability of CCD cameras with large arrays composed of very small elements, providing the capacity of integration with time of relatively weak fluorescence signals. (4) The possibilities created by mathematical morphology and other image analysis algorithms to recognize cells and subcellular structures (e.g. chromosomes) and eliminate artifacts. Relatively complicated images can be analyzed in this way in an automated fashion. Using mathematical morphology algorithms, the selection of cells to be measured in the sample is very efficient. As a result the speed of automated cytometry has increased significantly in the last years and often hundreds of cells can be measured within a minute.

Modern automated microscopy in combination with high resolution CCD cameras enable the analysis of microscopic fields at relatively low magnification, contributing to sufficient light intensity for many fluorescence applications. The use of automatic shutters in the illuminating light path avoids further fading of fluorescence after the image has been stored in computer memory. Using computer driven motors for movement in the Z direction of the microscope enables automated focusing of both absorbance and fluorescence images. Special microscopes have been developed for image cytometry. Without changing the objective they provide a low and a high magnification channel, each provided with a CCD camera. In some instruments the microscopic image can be switched under computer control from a black and white camera to a colour camera. This permits the addition of colour analysis in cytometry. Instruments permitting autofocusing through movement of the objective in stead of movement of the relatively heavy microscope stage are now commercially available. Interestingly, image cytometry has led to the development of the first types of microscopes that are fully automated through the use of a personal computer. The present development of the multimedia PC will further contribute to image cytometry.

In several areas of biomedical research this has lead to significant progress in image analysis. In chromosome analysis the detection of low intensity fluorescence signals with very sensitive CCD cameras has facilitated the analysis of IN SITU hybridisation signals in several colours. This facilitates the analysis of chromosome abnormalities in interphase nuclei of cancer cells (interphase cytogenetics). In cytology and haematology, image cytometry has shown to be a powerful tool in rare event detection. Since the images of all detected objects can be stored in an image memory and inspected later, the verification that a detected object is really the cell one wanted to find and not an artifact, is readily possible. For cytochemical and metabolic studies image cytometry is increasingly used. Cellular processes can be studied by storing the images at certain time intervals for later analysis.

CELLULAR MECHANISMS FOR THE PROMOTION OF THE ATHEROSCLEROTIC LESION BY LP(A)

G. Rothe, E. Kovacs, H. Ullrich, J. Hankowitz, W. Drobnik, I. Prokovski*, G. Schmitz.

Institut für Klinische Chemie, Zentrallaboratorium und Blutbank, Klinikum der Universität Regensburg, D-93042 Regensburg, *Akademie der Wissenschaften, Moskau

Increased plasma levels of Lp(a) are a major and independent risk factor for the development of atherosclerosis. The cellular mechanism of the promotion of the atherosclerotic lesion by Lp(a), which chemically resembles a multiple repetitive structure of the plasminogen kringle 4-like domain, is still unclear. Potential Lp(a) effects could be based on the promotion of the inflammatory destruction of the endothelium by mononuclear phagocytes or on smooth muscle cell proliferation in the subendothelial space. Therefore, in this study Lp(a) effects on the expression of adhesion antigens and complement regulatory proteins and the production and release of reactive oxidants and lysosomal proteases by mononuclear phagocytes and on smooth muscle cell (SMC) proliferation were studied by flow cytometry. Lp(a) was isolated from a patient during serial therapeutic selective immunoadsorption with an isolated increase of Lp(a) (Chol. 140 mg/dl, TG 125 mg/dl, Lp(a) mg/dl) and a history of early myocardial infarction. *In vitro*, Lp(a) above 10 µg/ml enhanced the oxidative burst of monocytes and induced cellular alkalinization. During 7 d culture of monocytes Lp(a) at 50 µg/ml induced an increased expression of CD16, CD4, HLA-DR and integrins (CD11a, CD18) suggesting cellular activation. Simultaneously, an increased expression of complement regulatory proteins (CD35, CD46, CD55, CD59), an increased oxidative burst activity and an increased lysosomal cathepsin B activity suggested an inflammatory phenotype. Additionally, as compared to LDL, Lp(a) above 10 µg/ml was able to shift synchronized smooth muscle cells from a resting (G_0/G_1-phase) into a proliferating state (S-phase). An *in vivo* role of Lp(a) in monocyte activation was shown in the serial study of the patient with an isolated increase of Lp(a). In this study an initially high oxidative burst response of monocytes 2.8-fold above controls decreased to a low response with a time lag of 4 d in 3 cycles of selective therapeutic Lp(a) immunadsorption. A decrease of lysosomal cathepsin B/L activity was observed in parallel. During the regular immunoadsorption the diene content of the eluated Lp(a) decreased upon treatment with a simultaneous decrease of its biological activity. Our results suggest that Lp(a) through its action on the release of inflammatory mediators by mononuclear phagocytes and smooth muscle cell proliferation may be an important mediator in the development and progress of the atherosclerotic lesion.

DNA-Zytometrie und Morphometrie am zytologischen Abstrich als Grundlage einer individualisierten Therapieplanung.

M. Ruhnke, A. Coumbos, C. Unverricht und W. Kühn

Frauenklinik im Klinikum Steglitz der FU Berlin
Hindenburgdamm 30 12200 Berlin

In der Präneoplasiesprechstunde der Universitätsfrauenklinik Steglitz werden Patientinnen mit auffälligen Cervix- oder Vulvabefunden betreut. Zytologische Abstriche dieser Patientinnen wurden mit einer computerassistierten Bildanalyse (CAS 200, Becton Dickinson) auf den DNA-Gehalt und morphometrische Kriterien ihrer Zellkerne untersucht. In jedem nach Feulgen gefärbten Abstrich wurden 100 Zellen vermessen. Als morphometrische Kriterien wurden Kernfläche, Formfaktor, Blobness und Entropie bestimmt. Bei der Auswertung der DNA-Histogramme wurden folgende Gruppen gebildet: diploid, suspekt, triploid, tetraploid, aneuploid und aneuploid/polyploid. Die klinische Einteilung orientierte sich am Pap-Befund und am kolposkopischen Bild.

Bei unauffälligen Pap-Befunden (Pap I und II) ließen sich in 9% der Fälle tetraploide Zellen nachweisen. Alle anderen Abstriche waren diploid oder suspekt. bei höhergradigen Pap-Befunden steigt die Anzahl tetraploider und aneuploider bzw, aneuploid/polyploider Zellen. Beim Pap III waren 32% tetraploid, weitere 32% aneuploid/polyploid und 12% aneuploid. Bei Pap IIID waren 22% tetraploid, 28% aneuploid/polyploid und 14% aneuploid. Beim Pap IV waren 8% tetraploid, 67% aneuploid/polyploid und 21% aneuploid. Beim Pap IV (n=5) fanden sich ausschließlich aneuploid/polyploide Abstriche.

Bei der Auswertung der Kernmorphologie kommt der Kernfläche die größte Bedeutung zu. Formfaktor, Blobness und Entropie zeigen eine geringere Trennschärfe. Mit der Analyse größerer Fallzahlen sollte auch für diese Kriterien eine low-risk von einer high-risk Gruppe zu differenzieren sein.

Besonders in der Pap IIID-Gruppe können aus den DNA-Analysen therapeutische Schlüsse gezogen werden. So werden Patientinnen mit einem low-risk DNA-Histogramm nicht mehr konisiert sondern engmaschig kontrolliert bzw. organschoned laservaporisiert. Patientinnen mit high-risk DNA-Profil ohne Tendenz zur Rückbildung werden frühzeitig mit Laservaporisation saniert. Die Einbeziehung weiterer objektiver Kriterien bei der Beurteilung zytologischer Abstriche kann ein overtreatment verhindern und eine individualisierte Therapie ermöglichen.

p53 Gen-Veraenderungen und genetische Instabilitaet von Harnblasenkarzinomen: Untersuchung mitttels Flow Cytometrie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung

G. Sauter[1], H. Moch[1], R. Albrecht[1], F. Gudat[1], M.J. Mihatsch[1], T. Meecker[2], F. Waldman[2]

[1]Institut fuer Pathologie, Universitaet Basel, Schweiz
[2]Division of Molecular Cytometry, University of California, San Francisco, USA

Dem p53 Tumorsuppressorgen wird heute eine Schluesselrolle in der Tumorbiologie zugeschrieben. In vitro fuehrt ein p53 Funktionsausfall zu einer vermehrten genetischen Instabilitaet und damit zu Gen-Amplifikation und Aneuploidie. Ziel dieser Studie ist es, den Zusammenhang zwischen p53 Gen-Veraenderungen und Parametern fuer genetischen Instabilitaet an Harnblasenkarzinomen in vivo zu untersuchen.

141 formalinfixierte Harnblasenkarzinome wurden untersucht. Mit dem monoklonalen Antikoerper CM1 wurde p53 Protein Ueberexpression nachgewiesen. Kernsuspensionen (50μm Schnitte, Hedley-Technik) wurden fuer Flow Cytometrie (FACScan, Multicycle) und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) verwendet. Der Nachweis von Gen-Amplifikationen und Deletionen erfolgte durch Doppelmarkierungen mit jeweils einer DNS-Probe fuer das interessierende Gen und fuer die Zentromerregion des entsprechenden Chromosoms. 50-100 Zellen wurden pro Tumor ausgezaehlt. Die folgenden DNS-Proben wurden verwendet: p7alphaTET (Zentromer 7), pLCA11 (Zentromer 11), p17H8 (Zentromer 17), erbB-2 (17q21), p53 (17p13.1) und bcl-1 (11q12). p53 Laesionen wurde in 3 Gruppen eingeteilt: keine Laesion (keine p53 Protein Expression und keine 17p Deletion), partielle Laesion (p53 Protein Expression oder 17p Deletion) und komplette Laesion (p53 Protein Expression und 17p Deletion). Entsprechend dem DNS Histogramm wurden die Tumoren eingeteilt in diploid (DI = 1), peridiploid (DI >1, < 1.15) und aneuploid (DI >1.15). Polysomie fuer ein Chromosom wurde definiert als durchschnittliche Zentromer Anzahl pro Zellkern > 2.3.

Von 141 tumoren zeigten 41 keine, 62 eine partielle und 38 eine totale p53 Laesion. Dabei war ein deutlicher Zusammenhang zwischen p53 Laesionen und dem Vorkommen von Aneuploidie ($p<0.0001$) sowie Polysomien der Chromosomen 7 ($p=0.0023$) und 17 ($p<0.0001$) gegeben. Tumoren ohne p53 Laesion zeigten vergleichsweise selten eine Aneuploidie (10 von 38), eine Polysomie 7 (11/25) oder eine Polysomie 17 (13/41). Aneuploidie (32/59), Polysomie 7 (29/46) und Polysomie 17 (32/59) waren haeufiger in Tumoren mit partieller Laesion. Tumoren mit kompletter p53 Laesion wiesen klar am haeufigsten quantitative DNS Veraenderungen auf: Aneuploidie (33/38), Polysomie 7 (28/32), Polysomie 17 (35/38). Kein klarer Zusammenhang fand sich zwischen p53 Laesionen und dem Vorkommen von bcl-1 und erbB-2 Amplifikationen.

Unsere Befunde sind vereinbar mit einer Schluesselrolle des p53 Gens fuer genetische Stabilitaet von Harnblasentumoren in vivo und illustrieren den postulierten additiven Effekt von 17p Deletion und p53 Protein Ueberexpression.

ISOLATION OF FOLLICULAR DENDRITIC CELLS (FDC) FROM HIV-1 NEGATIVE AND POSITIVE LYMPHATIC TISSUE BY MACS OR FACS

J. Schmitz[1,3], F.T. Hufert[2], J. van Lunzen[3], S. Petrasch[4], P. Racz[5], H. Schmitz[1], M. Dietrich[3], and K. Tenner-Racz[6]

Departments of Virology[1] and Pathology[5] and Clinical Medicine Section[3], Bernhard Nocht Institute, Hamburg, Germany; Division of Internal Medicine[4], Knappschaftskrankenhaus, Ruhruniversität Bochum, Germany; Institute for Medical Microbiology and Hygiene[2], Freiburg, Germany; Department of Hematology[6], Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Hamburg, Germany.

The objetive was to achieve a high enrichment of FDC from HIV-1 negative (tonsils) and positive (lymph nodes, CDC stage II/III) lymphatic tissue for further investigations by immunohistochemistry, electron microscopy, in situ hybridization and nested polymerase chain reaction (PCR).
After mechanic and enzymatic disruption, FDC were pre-enriched by discontinuous density gradient centrifugation. Thus, FDC from tonsils were enriched between 8% to 15% and FDC from lymph nodes between 1% to 3%. Further purification of FDC from tonsils by MACS yielded a mean purity of 78.4% and a mean total cellcount of 7.1×10^6 cells. The cells appeared morphologically intact by immunohistochemistry and electron microscopy. Enrichment of FDC from lymph nodes by MACS yielded in a mean purity of 25% and total cell counts up to 3.0×10^5 cells were achieved. High amounts of HIV-1 particles and HIV-1 RNA could be demonstrated on the dendritic extensions of FDC. Intracytoplasmatic virus particles or budding were not seen. Positive staining for HIV-1 RNA was detected only on the surface of FDC, but not over the cytoplasm. FACS purification of FDC yielded a purity of over 93% with total cell counts between 3.0×10^4 to 6.0×10^4 cells. Limiting dilution assays of these FDC showed no integration of proviral DNA by nested PCR, except for one cell fraction. We believe that FDC retain high amounts of HIV-1 immun-complexes on their surface, but are not productively infected during asymptomatic HIV-1 infection. The proviral load of FACS purified T helper cells obtained from lymph nodes showed a 5 to 150 times higher rate of infection compared to peripheral blood T helper cells.

Differenzierung und Expression von proliferationsassoziierten Antigenen bei HL-60-Zellen nach Bestrahlung

A. Sendler+*, M. Lindinger*, W. Kaffenberger* und D. van Beuningen*

+Chirurgische Klinik und Poliklinik der TU München, Klinikum "rechts der Isar", 81675 München
*Institut für Radiobiologie, Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr, 80901 München.

Die HL-60-Zellinie, eine humane Promyelocytenleukämie, wurde bestrahlt und mit 1.25% DMSO (Dimethylsulfoxid) zur granulozytären Differenzierung induziert. Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde über das Zellwachstum, mit Klonierungstesten und dem BrdUrd/DNA-Assay untersucht, das Differenzierungsverhalten durch die durchflußzytometrische Bestimmung der Expression von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) und des Ki-67-Antigens dargestellt. Dazu wurde die Expression von PCNA im Verlauf des Zellzyklus untersucht.

Dieses HL-60-Modell ist charakterisiert durch eine zunehmende Differenzierung bei abnehmender Proliferation. Die untersuchte Zellinie ist sehr strahlensensibel. Das Zellwachstum nimmt nach Induktion ab und erreicht nach 5 Tagen ein Plateau; Bestrahlung und Induktion verringern das Zellwachstum additiv. Der BrdUrd/DNA-Assay zeigt, daß der G_2-Block nach Bestrahlung unterschiedlich exprimiert wird. Nicht induzierte Zellen verharren nach 1 Gy 26 Std. im G_2-Block, induzierte nur 12 h. Die Expression des PCNA-Antigens wird bei nicht induzierten Zellen erst beim Erreichen der stationären Wachstumsphase (8 Tage) vermindert; es zeigt sich kein Strahleneffekt. Nach Induktion verlieren die Zellen ab dem 3. Kulturtag die Fähigkeit, PCNA zu exprimieren; dieses wird durch Bestrahlung deutlich beschleunigt [46% vs. 3% (Kontrolle) PCNA-negative Zellen am Tag 2]. Nicht induzierte, bestrahlte Zellen zeigen in der späten S-Phase eine höhere PCNA-Expressiondichte als unbestrahlte. Dieser Effekt wird bei induzierten HL-60-Zellen nicht beobachtet, die Expressionsdichte der frühen S-Phase befindet jedoch bereits auf einem höherem Niveau.

In dieser Zellinie beeinflußt Bestrahlung sehr früh die Differenzierungsprozesse. Ob der strahleninduzierte Verlust des PCNA für Proliferation und/oder Reparaturvorgänge entscheidend ist, muß weiterhin untersucht werden. Die Zellzyklus- und induktionsabhängige Expression von PCNA wird diskutiert. Die Ergebnisse der PCNA- und Ki-67-Expression werden miteinander verglichen.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CELL SURFACE MARKERS OF CD56 dim+ AND bright+ NATURAL KILLER CELL SUBPOPULATIONS IN THE PERIPHERAL BLOOD

Peter Sedlmayr[1], Libuse Tomková[1], Gottfried Dohr[2], Martini Wilders-Truschnig[1]

Dept. of Internal Medicine[1] and Institute of Histology and Embryology[2],
Karl-Franzens-University Graz, Austria

Evidence has been presented previously that natural killer (NK) cells characterized by different surface densities of CD56 and CD16 resp. do not represent different functional stages but rather distinct subpopulations, which differ in terms of proliferative capacity in response to Il-2, and of secretion of IFNγ. Enriching fresh human peripheral blood NK cells from nylon wool-nonadherent PBMNC by negative selection with anti-CD3-coupled microparticles and magnetic cell sorting (MACS), we compared surface markers of unstimulated CD56 dim+ and CD56 bright+ NK cells, the latter comprising about 10% of total peripheral blood $CD3^-CD56^+$ NK cells. In contrast to CD56 dim+ cells, CD56 bright+ were positive for CD55 (decay-accelerating factor, DAF), HLA-DR, the spermium antigen GZS-1 and brighter in respect to CD2, CD44 and CD7. On the other hand, they were negative in respect to CD69 and CD57. CD56 bright+ and dim+ cells showed a bimodal distribution in respect to CD8. These results support the notion that CD56 bright+ NK cells, according to their different marker profile, may possess different functional and biodistribution properties than the majority of peripheral blood NK cells. According to our results, negative selection for $CD55^-$ cells, as was proposed as a means for isolating fresh NK cells, should enrich for CD56 dim+ cells only and lose CD56 bright+ ones, this way skewing the distribution of NK subsets encountered in the peripheral blood.

Supported by the Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, grant # P8736-MED.

Die zytochemische Bestimmung der Aktivität von NAD(P)H-Oxidoreduktasen mit dem Fluß-Zytometer

E. Severin und E. Seidler

Institut für Strahlenbiologie der Universität Münster, Hittorfstr.17 und
Institut für Anatomie der Humboldt-Universität, Berlin, Philippstr.12

Die NAD(P)H-Oxidoreduktasen sind eine biochemisch uneinheitliche Gruppe von Enzymen, welche die Nucleotide NADH und NADPH als Substrate oxidieren und die Elektronen auf verschiedene Akzeptoren übertragen, z.B. auf das Ubichinon, oder auf Zellgifte und freie Radikale, die dadurch ungiftig werden, oder auf Zytostatika, z.B. auf Mitomycin C und Adriablastin, die erst dadurch aktiviert werden. Deshalb könnte deren Bestimmung für die Klinik eine wichtige Rolle spielen.

Einige dieser Enzyme werden neuerdings intensiv untersucht, z.B. die NADPH-Dehydrogenase. Sie ist identisch mit der Respiratory-Burst-Oxidase der Phagozyten und mit der NO-Synthase der Endothel- und Nervenzellen.

Die histochemische Bestimmung einzelner Vertreter dieser Gruppe mit nicht-immunologischen Methoden, z.B. mit der Tetrazoliumsalz-Technik, ist nicht möglich, weil stets die anderen Vertreter der Gruppe partiell mitreagieren und weil der Indikator auch nicht-enzymatisch vom Substrat NAD(P)H bereits chemisch reduziert wird. Darum wurde die Gesamtaktivität der NADH- und NADPH-Oxidoreduktasen mit Hilfe des "indirekten Kopplungsverfahrens" gemessen: Auf dem Wege einer normalen Dehydrogenase-Reaktion werden reduzierte Nucleotide während der Inkubation von den Zellen erzeugt, indem NAD oder NADP zusammen mit einem Substrat für ein NAD(P)-abhängiges Enzym, wie z.B. für LDH bzw. G6PDH, dem Medium zugesetzt werden. Die reduzierten Nucleotide dienen in einer Folgereaktion den NADH- bzw. NADPH-Oxidoreduktasen als Substrat, und wir erhalten deren spezifische Aktivität allein, wenn durch Kontrollreaktionen bewiesen ist, daß die zelluläre NAD(P)H-Oxidation die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion ist.

Mit Hilfe des Tetrazoliumsalzes CTC wurden nach dem skizzierten Verfahren die Aktivitäten der NAD(P)H-Oxidoreduktasen in Aszitestumoren und kultivierten Zellen von Magen-Darm-Tumoren flußzytometrisch Zelle für Zelle gemessen.

Tabelle der wichtigsten NAD(P)H-Oxidoreduktasen

EC 1.6.99.1 NADPH-Dehydrogenase
EC 1.6.99.2 NAD(P)H-Dehydrogenase (Chinon)
EC 1.6.99.3 NADH-Dehydrogenase
EC 1.6.99.5 NADH-Dehydrogenase (Chinon)
EC 1.6.2.4 NADPH-Ferrihaemoprotein-Reduktase
EC 1.6.2.5 NADPH-Cytochrom-C_2-Reduktase
EC 1.6.5.3 NADH-Dehydrogenase (Ubichinon)

CD4-ELISA: A METHOD FOR DETERMINING CD4$^+$-CELLS AND A POSSIBLE BENEFIT FOR LABORATORY QUALITY ASSURANCE PROGRAMMES.

Sommer, L.[i]; Bauer, R.[ii]; von Ruecker, A.[i]

Institut für Klinische Biochemie[i] and the Klinik für Hautkrankheiten[ii],
University of Bonn

The determination of absolute CD4-T-lymphocyte counts by flow cytometry has several drawbacks. Most important is the fact that it usually requires results from three analytical procedures involving different instruments and techniques: 1) the white blood cell count, 2) the differential count to determine the percentage of lymphocytes, and 3) immunophenotyping to detect the CD4 positive T-lymphocytes. Recent external quality assessment trials in Germany[1] have shown that the sum of errors is significant. The coefficient of variation (CV) in the case of CD4-T-lymphocytes was 20-24%, the maximum and minimum values varied by 270- 340%. Similar observations have been made in other countries[2]. On the basis of such findings, it seems doubtful whether reliable clinical care can be given to e.g. HIV patients, where treatment relies on correct CD4$^+$-T-lymphocyte counts.

A CD4-ELISA which measures CD4 surface molecules in suspension after lysing of cells may help avoid the indicated drawbacks, providing CD4 surface molecules are expressed in a constant manner on CD4-T-cells and the amount of CD4 surface molecules on other cells (e.g. monocytes) or soluble CD4 in plasma can be safely ignored. This point is controversial. Our results with n=109 patients show that the overall correlation between flow cytometric CD4-T-lymphocyte counts from two separate laboratories and CD4-ELISA (TRAx^{TM}) enumeration data is satisfactory. Coefficients of correlation ranged from 0.82 to 0.95 depending not so much on the flow cytometer and monoclonal antibodies used in comparison, but on individual laboratory enumeration schemes used in flow cytometry.

Low CD4-T-lymphocyte counts ($<500/\mu l$) observed in HIV patients were associated with only a minor decrease (approx. 4%) in specific CD4-immunofluorescence per cell using flow cytometric data. Also according to flow cytometry, major errors made by the CD4-ELISA in HIV patients were due to a) monocytes which are CD4$^+_{dim}$-cells (average error observed: 20%, range 2-85%), b) CD4$^+_{dim}$/CD8$^+$-T-lymphocytes which play an important role in HIV patients with e.g. lymphoma and EBV infections[3] (average error observed: 3%, range 0-52%), and c) soluble CD4 molecules in plasma (average error: 11%, range 0-97%). The average errors increase 1.5-2-fold in HIV patients with low CD4$^+$-T-lymphocyte counts ($<$ 500 cells/μl). Coefficients of correlation between the CD4-ELISA and CD4-T-lymphocytes in flow cytometric data improve to 0.85-0.97 if CD4-ELISA data is corrected by the monocyte count (approx. 9 monocytes are equivalent to 1 true CD4-T-lymphocyte).

In conclusion, we find the use of a CD4-ELISA kit to monitor CD4$^+$-cells in HIV patients comparable to flow cytometric methods, but no less problematic. The CD4-ELISA seems to be a sufficient means for monitoring CD4$^+$-cells in specific non-flow-cytometric settings (e.g. rural regions, developing countries). Sophisticated HIV monitoring centers will probably stick to more complex monitoring panels. For such centers, the CD4-ELISA may nevertheless be an attractive method for intra-/interlaboratory quality control programmes, if monocytes, CD4$^+_{dim}$/CD8$^+$-T-lymphocytes and soluble CD4 in plasma are taken into account.

[1] von Ruecker, A. et al. Klin.Lab. 39: 321-328 (1993)
[2] Strauss, K.W. World-wide survey of QC/QA schemes for immunophenotyping, Becton Dickinson, 1993
[3] Ortolani, C. et al. Biochem.Biophys.Res.Commun. 191:601-609 (1993)

In vitro Untersuchungen zum Fluoreszenzverhalten des endogenen Photosensibilisators Protoporphyrin IX zur Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms

P. Steinbach[1], R. Baumgartner[2], M. Kriegmair[2] F. Hofstädter[1], A. Hofstetter[2], R. Knüchel[1]

[1]Institut für Pathologie der Universität Regensburg, D-93042 Regensburg
[2]Urologische Klinik und Poliklinik der Universität München, D-81366 München

Die Produktion des endogenen Photosensibilisators Protoporphyrin IX (PP IX) kann durch Gabe von 5-delta-Aminolävulinsäure (ALA) *in vivo* und *in vitro* stimuliert werden. Die Möglichkeit einer topischen Applikation läßt diese Substanz zur Therapie und Fluoreszenzdiagnostik bei Tumoren und flachen Läsionen der Harnblase interessant erscheinen. Fluoreszenzanalysen an Biopsien von mit ALA behandelten Patienten zeigen eine deutliche PP IX- Fluoreszenz unterschiedlicher Intensität sowohl an histologisch normal erscheinendem Urothel als auch an benignen und malignen Veränderungen. Eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensität im Hinblick auf eine Korrelation mit dem histologischen Befund ist an Biopsiematerial nur schwer durchführbar, wäre aber gerade für eine klinische Anwendung in Diagnostik und Therapie als auch für das biologische Verständnis der Wirksamkeit einer photodynamischen Behandlung mit endogenen Porphyrinen von großer Bedeutung. Die vorliegende Studie befaßt sich daher mit einer quantitativen Analyse ALA induzierter PP IX- Fluoreszenz an unterschiedlich differenzierten Harnblasenkarzinomzellinien in zwei- und dreidimensionaler Zellkultur. Zur Fluoreszenzanalyse intakter drei-dimensionaler Zellkulturen (multizelluläre Tumorzellsphäroide, MCTS) wurde ein konfokales Laserrastermikroskop mit einem Krypton-Laser mit einer Emissionswellenlänge von 406.7 nm ausgerüstet, die dem Hauptanregungsmaximum von PP IX entspricht. Zur durchflußzytometrischen Untersuchung an einem FACStar-Gerät mit UV-Anregung wurden die MCTS nach Inkubation in ALA- haltigem Medium in Einzelzellen zerlegt bzw. Zellen in Monolayerkultur mit ALA-Lösung versetzt. Der Umsatz von ALA zu PP IX führt über einen Zeitraum von 8h zu einer linearen Zunahme der PP IX Fluoreszenzintensität. Die Linearität der Zunahme ist in einem Konzentrationsbereich von 30 bis 60µg/ml unabhängig von der initialen ALA-Konzentration. Die weitere Inkubation in ALA-freiem Medium führt hingegen bereits nach zwei Stunden zu einer signifikanten Abnahme der PP IX Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität wird darüber hinaus mit dem Differenzierungsgrad der unterschiedlichen Harnblasenkarzinomzellinien sowie normalen humanen Fibroblasten verglichen.

TV-bildanalytische Quantifizierung der mittels Ki-67 bestimmten Proliferationsfraktion in benignen und malignen Läsionen der Prostata

Striepecke, E., Handt, S., Griefingholt, H., Böcking, A.

Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.

In 10 formalinfixierten Prostatektomiepräparaten mit Prostatakarzinom des Stadiums pT3 NX MX wurde jeweils an vier Paraffinschnitten aus unterschiedlichen Tumor- und BPH-Arealen Ki-67-Antigen nachgewiesen. Als immunhistochemische Methode verwendeten wir die indirekte Immunperoxidase-Technik mit dem monoklonalen Antikörper MIB1 (DIANOVA) und Diaminobenzidin als Chromogen. Die anschließende Auswertung erfolgte quantitativ mit Hilfe des TV-Bildanalysesystems MIAMED (LEICA). Das Programm "Receptor Analysis" steuert neben der Meßroutine einen Filterwechsler. Dabei wird ein Rotfilter (623nm ± 5nm) zur Detektion der Methylgrün-gegengefärbten Zellkerne, ein Grünfilter (550nm ± 10nm) zur Detektion der DAB-positiven Zellkerne verwendet.

In jedem Schnitt wurden nach Zufallskriterien 100 Gesichtsfelder mit z.T. unterschiedlich differenzierten Adenokarzinomanteilen und 70 Gesichtsfelder mit stromalen und epithelialen Anteilen der BPH ausgewertet. Die histologische Gradierung erfolgte nach Böcking et al. (1982). Es ergaben sich folgende mittlere und mittlere maximale Proliferationsfraktionen (PRF):

	Mittlere PRF	Mittlere maximale PRF
Epitheliale Anteile der BPH (n=27):	0.61% ± 0.34%	3.7% ± 2.13%
Stromale Anteile der BPH (n=29):	0.47% ± 0.36%	3.6% ± 2.29%
Gut differenziertes Adenokarzinom (n=3):	1.76% ± 0.3%	11.1% ± 2.76%
Wenig differenziertes Adenokarzinom (n=16):	2.13% ± 1.03%	10.81 ± 7.63%
Kribriformes Adenokarzinom (n=10):	3.48% ± 0.87%	16.41 ± 6.47%
Solides Adenokarzinom (n=1):	2.51%	11.3%

Die Unterschiede in der mittleren und maximalen Ki-67 PRF zwischen benignen und malignen Prostataanteilen waren statistisch signifikant (Wilcoxon, $p \leq 0.0001$). Innerhalb der verschiedenen Differenzierungsgrade des Prostatakarzinoms erwies sich der Unterschied zwischen wenig differenziertem und kribriformem Adenokarzimon als statistisch signifikant (Wilcoxon, $p < 0.01$). Aufgrund der geringen Anzahl von Beobachtungen in den Gruppen des gut differenzierten und soliden Karzinoms war eine statistische Auswertung leider nicht möglich.

Diese signifikanten Ergebnisse konnten wir aufgrund einer guten Übereinstimmung der Meßwerte innerhalb gleichdifferenzierter Karzinomanteile finden.

Allerdings ist die Heterogenität der Verteilung von Ki-67-Antigen in den benignen und malignen Anteilen der Prostata so groß, daß selbst nach Messung von 100 Gesichtsfeldern das 95% Konfidenzintervall im Mittel noch 20% der mittleren PRF beträgt. Senkt man die Zahl der ausgewerteten Gesichtsfelder auf 50 bzw. 30, steigt das 95% Konfidenzintervall um 10 bzw. 8%.

Zusammenfassend konnten wir demonstrieren, daß die angewandte Methodenkombination plausible Ergebnisse liefert. Zur Erzielung repräsentativer Ergebnisse ist allerdings eine große Anzahl von Messungen erforderlich.

Beziehungen zwischen Hormonrezeptorstatus, DNA-Ploidie und S-Phase-Fraktion beim Mammakarzinom

R. Strohmeier, A. Vering, W. Schröder, C. Ruppert, K. Engels, S. Pilz, H.G. Bender

Universitäts-Frauenklinik, Gynäkologie und gynäkol. Onkologie, Theodor-Stern-Kai 7, 60596 Frankfurt am Main

Der Steroidhormon-Rezeptorstatus und durchflußzytometrisch gewonnene Größen aus DNA-Analysen sind - zusätzlich zu Lymphknotenstatus und Tumorgröße - vielversprechende, vom histologischen Malignitätsgrad unabhängige, Prognosefaktoren beim Mammakarzinom.
An 86 Mammakarzinomen wurden nach histologischer Tumorbestätigung an kryokonserviertem Material durchflußzytometrische DNA-Analysen und biochemische Östrogen- und Progesteron-Rezeptor-Bestimmungen durchgeführt.
62,8 % der Tumoren waren Östrogen-Rezeptor (ER)-positiv und 54,7 % sowohl ER als auch Progesteron-Rezeptor (PR)-positiv. Von den 32,5 % als diploid (DNA-Index <1,1) eingestuften Tumoren, waren 75 % ER-positiv und 61 % PR-positiv. Diese Gruppe zeigte auch den höchsten Hormonrezeptorgehalt in den Tumoren mit niedriger S-Phasen-Fraktion (SPF). Der Anteil ER-positiver Tumoren war unter den aneuploiden deutlich geringer (57 %).
Die SPF war bei 83 % der Tumoren bestimmbar. Eine geringe SPF (<5%) hatten 18 % und ein hohe SPF (>9%) hatten 52 % aller Tumoren. Bei den aneuploiden Tumoren bestand eine negative Korrelation zwischen dem Alter der Patientin und der Höhe der SPF ($p = 0,002$). Eine positive Korrelation bestand zwischen SPF und Ploidie ($p = 0,002$), sowie zwischen SPF und DNA-Index ($p = 0,0003$).
Bei den diploiden Tumoren von Patientinnen unter 50 Jahren waren die ER-Werte 3 mal so hoch wie in aneuploiden Tumoren. Die PR-Werte waren in diploiden Tumoren dieser Altersgruppe doppelt so hoch wie in aneuploiden Proben. Bei den Tumoren der Patientinnen über 50 Jahren waren kaum Unterschiede im PR-Gehalt zwischen diploiden und aneuploiden festzustellen, die ER-Werte lagen bei den aneuploiden um ca. 20 % höher.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl ER-Gehalt als auch PR-Gehalt mit der Ploidie und der Höhe der SPF in Zusammenhang stehen. Möglicherweise lassen diese Parameter auf den Grad der funktionellen Differenzierung des Tumors schließen.

Kopf-Aktivator induzierte Signaltransduktion bei Säugerzellen

A. Tárnok

ZMNH, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, UKE, Martinistr.52, 20246 Hamburg.

Der Kopf-Aktivator (KA) ist ein aus dem Süßwasserpolyp *Hydra spec.* isoliertes Oligopeptid. Er stimuliert in Hydra Zellproliferation und induziert Zelldifferenzierung (H.C.Schaller, Fortschritte der Zoologie 26:153, 1981). KA wurde auch im Serum von Säugern nachgewiesen und liegt dort in hoher Konzentration vor. Er bewirkt bei neuronalen Säugerzellinien, wie den Neuroblastoma-Glioma Hybridzellen (NB), die Erhöhung des Mitoseindex und wirkt somit auf den G2/Mitose Übergang (H.C.Schaller et al., EMBO J., 11:3311, 1989). Die Signalübermittlung erfolgt durch membranständige Rezeptoren.
Ziel der hier dargestellten Untersuchung war es mit Hilfe der Durchflußzytometrie festzustellen, über welche Wege der KA-Rezeptor Signale an die Zellen weiterleitet. Für die Analysen wurden die neuronalen Zellinien NB und PC12 eingesetzt. Es wurden auch Untersuchungen an Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) durchgeführt, da die Vermutung bestand, daß KA auf (einige) Leukozyten stimulierend wirkt. Gemessen wurde die KA-induzierte Veränderung (1.) der cytoplasmatischen freien Kalziumkonzentration, [Ca2+]i, mit Indo-1, Fluo-3 bzw. FuraRed, (2.) des Membranpotentials mit DiBAC4(3), sowie (3.) des intracellulären pH, [pH]i, mit SNARF-1 (alle Farbstoffe von Mol.Probes, Inc.). Um die zeitliche Korrelation der Vorgänge zu bestimmen, wurden z.T. mehrere der Parameter simultan gemessen (e.g. Membranpotential + [Ca2+]i; [Ca2+]i + [pH]i).

In NB und PC12 Zellen wurde durch KA Zugabe die [Ca2+]i transient (d.i. für ca. 20-60sec.) erhöht. Allerdings waren höchsten 20 - 40 % der Zellen stimulierbar. Da in neuronalen Zellinien KA die Zellen an G2/Mitose-Übergang stimuliert nehmen wir an, daß insbesondere Zellen in G2 angeregt werden. Weiterhin erhöhte sich in den Zellen transient das Membranpotential (=Hyperpolarisierung). 3T3-Fibroblasten reagierten nicht auf KA Zellen, diese Zellen weisen keinen KA-Rezeptor auf (C.Schaller, pers. Mitteilung) . Als weitere Veränderung wurde eine bei NB-Zellen und RAM eine leichte KA-induzierte Abnahme des [pH]i gemessen. Dabei ging der Abnahme des Membranpotentials und des [pH]i die Erhöhung des [Ca2+]i voraus.
Hyperpolarisierung konnte durch Entleeren des intrazellulären Kalziumpools mit EGTA inhibiert werden. Dies zeigt, daß die Reaktion durch intra- und wahrscheinlich nicht durch extrazelluläres Ca2+ vermittelt wird. Die Erhöhung des [Ca2+]i wurde durch Pertussistoxin (PTX) ihibiert, was darauf hindeutet, daß die Signale zumindest teilweise von einem PTX sensitiven Gi Protein vermittelt werden. Durch weitere Kombinations-Messungen sowie Sortierung reaktiver neuronaler Zellen soll festgestellt werden ob überwiegend Zellen in bestimmten Zyklusphasen auf KA regieren.

POSITIVE ENRICHMENT OF CD34^{+} HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS BY MINIMACS

Andreas Thiel, Alexander Scheffold, Kimitaka Kato, Andreas Radbruch and Stefan Miltenyi*
Institute for Genetics, University of Cologne, 50931 Cologne, *Miltenyi Biotec GmbH, 51429 Bergisch Gladbach, Germany

We have developed a new staining and separation technique for fast and efficient enrichment of human CD34+ progenitor cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood. Cells are stained with a chemically modified CD34 antibody (clones QBEND-10 or HPCA-2) and labelled magnetically using MACS-Microbeads recognising the chemical modification. Cells are then magnetically separated using the MiniMACS separation system. CD34 expressing cells from peripheral blood of normal donors (0,05%-0,2% of PBMC's) can be rapidly and efficiently enriched to a purity of 80%-90% with a recovery of 50-80%. Assuming an initial frequency of 0,1% CD34+ cells in the original PBMC-population the enrichment rate is about 20000fold.

Starting with PBMC's, staining and separation is done in about 1h. The efficiency of the separation is measured by flow cytometry using fluorochromated CD34 monoclonals (clones QBEND-10 or HPCA-2) or, to increase the fluorescent labelling of CD34 cells, using magnetofluorescent liposomes, specific for the chemical modification. The enrichment of CD34+ by MiniMACS allows even the separation of CD34^{lo} cells; these cells, which have a different immunophenotype then CD34+ cells, might be more differentiated. The detection of CD34^{lo} cells demonstrates the sensitivity of the MiniMACS separation system.

The new staining and separation technique combines high purity isolation of CD34+ cells even from normal peripheral blood with short processing time and high recovery.

Durchflußzytometrische Bestimmungen des Ploidie-Status bei Antheren-Kulturen.

Eine einfache, schnelle und genaue Methode in der Pflanzenzüchtung.

Wolfgang ULRICH[1], Ingunn ULRICH[2] und Wolfgang GÖHDE[3]

1) Institut für Genetik, Universität Hohenheim, W-7000 Stuttgart 70
2) Partec GmbH Münster, Büro Süddeutschland, W-7441 Schlaitdorf
3) Institut für Strahlenbiologie und Radiologie der Universität Münster, W-4400 Münster

In der pflanzlichen Kreuzungszüchtung gibt es große Schwierigkeiten bei der Züchtung neuer Pflanzen mit spezifischen Eigenschaften, da vorteilhafte rezessive Allele sehr oft durch nachteilige dominate Allele unterdrückt werden. Hinzu kommt die große Zahl an Rekombinationen und die sich anschließenden langjährigen Auslese- und Prüfungsverfahren. Eine Verbesserung in der Pflanzenzucht hat die Haploidenzüchtung durch die in-vitro Antheren-Kultivierung erbracht. Aus Antheren diploider Pflanzen können monohaploide Pflanzen, aus tetraploiden können dihaploide Pflanzen etabliert werden. Bei monohaploiden Pflanzen manifestieren sich alle Gene im Phänotyp. Generell beträgt die Regenerationsrate neuer Pflanzen jedoch nur 5%, wobei unterschiedliche Antherengewebe an der Ausbildung der Regenerate beteiligt sein können. Deshalb ist eine Bestimmung des Ploidie-Status der regenerierten Pflanzen von großer Bedeutung. Der Einsatz der DNA-Durchflußzytometrie bietet sich hier an, da schnell und genau der Ploidiegrad der Regenerate nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz zu den bisher eingesetzten konventionellen Methoden, wie z.B. Chromosomenanalysen, kann der Ploidie-Status in einem sehr frühen Stadium und nur unter Verwendung von geringem Blattanteil der neuen Pflanzen ermittelt werden, wie am Beispiel von *Nicotinana tabacum* (Tabak) demonstriert wird. Ebenfalls erfolgreich waren Untersuchungen an Antherenkulturen von *Secale cereale* (Roggen) und *Zea mays* (Mais). Bis zu 500 frisch regenierte Pflanzen können pro Tag mit der Durchflußzytometrischen DNA-Analyse untersucht werden.

High resolution flow cytometry of human breast cancer.

Us-Krasovic, M.*, Auersperg, M.*, Pogacnik, A.*, and Göhde, W.**
* Institute of Oncology, Ljubljana
** Clinic for Radiotherapy and Radiooncology, University of Münster

DNA-Histograms of breast cancer cells are widely used as additional diagnostic and prognostic parameters. Several histogram properties have been investigated intensively, like DNA index, S-phase fraction and the frequency of cells exceeding particular DNA-values like the 5c-exceeding rate. The value of such data is strongly dependent on the used DNA analysis technique, the accuracy of the DNA measurement of each individual cell, and on the number of cells analysed in each case.

We have analysed about 800 breast cancer biopsies from patients of the Institute of Oncology, Ljubljana. The aim of this study has been, to employ those staining and analysis techniques, which allow the most accurate DNA-histogram measurement, so far.

Results: Breast cancer (as cancer in common) can show aneuploid cell lines with DNA indices close to 1. The probability to detect aneuploidies depends strongly on the CV. CV's larger than 2% should not be accepted because of high risk that aneuploidies cannot be resolved. The number of analysed cells must be large because the frequency of tumor cells in the biopsies can be very small, small CV's and the analysis of many thousand cells guarantee the detectability of rare tumor cells down to less than 1%. The 5c-exceeding rate is an useless if not dangerous parameter. There are many cases of clear aneuploidy where 5c-exceeding cells are almost completely missing. The S-phase frequency may have large prognostic importance. More data have to be collected in order to understand this parameter because there are frequent cases which have clear aneuploid cell lines but almost no S-phase cells.

In a separate report the cytophotometrical, cytological, histological, clinical and follow up data will be summarized.

BIOLOGISCHE STRAHLENDOSIMETRIE MITTELS FUNKTIONSZYTOMETRIE UND SELBSTLERNENDER DATENKLASSIFIZIERUNG

G.Valet, H.Kahle

Arb.Gruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, 82152 Martinsried

Die schnelle Feststellung ionisierender Ganzkörperbestrahlung im Dosisbereich 0.5-10Gy ist trotz vielfältiger biochemischer Untersuchungsmöglichkeiten bisher nur schwer möglich, da dabei keine strahlenspezifischen Veränderungen biochemischer Eigenschaften im Blut, Blutserum oder Urin auftreten.

Ziel einer Pilotstudie war es festzustellen, ob die durchflußzytometrische Erfassung der Veränderungen von Funktionseigenschaften in Blut- und Knochenmarkszellen zusammen mit einer standardisierten automatischen Klassifizierung der vielparametrigen Meßdaten als Grundlage für die biologische Strahlendosimetrie geeignet ist.

Dazu wurden Wistarratten (100g) 1, 4 und 24h nach einer Röntgenganzkörperbestrahlung mit 1,25-10Gy (280KV, 0,6Gy/min, 2mmCu-Filter) in Äthernarkose Blut und Knochenmark entnommen. Die durchflußzytometrische Messung der frisch entnommenen Zellpräparationen erfolgte nach Anfärbung der DNS/RNS mit Acridinorange (AO, 8µg/ml), des Transmembranpotentials (DiOC6(3) 0,2µg/ml) sowie des intrazellulären pH-Wertes und der Esteraseaktivität mit 1,4-Diacetoxy-2,3-Dicyanobenzol (ADB, 20µg/ml). Alle Ansätze enthielten 40µg/ml Propidiumjodid zur simultanen Gegenfärbung der DNS toter Zellen. Die Daten wurden als Dreiparameterlistendateien mit Zellvolumen sowie Grün- und Rot- bzw. Blau- und Grün- + Rotfluoreszenz aufgenommen.

Die Datenauswertung und Klassifizierung erfolgte mit dem selbstlernenden CLASSIF1 Programm (Ann.Ny Acad.Sci **677**,233-251(1993). Die Erkennung der **Bestrahlungszeitpunkte** 1, 4 und 24Std nach Bestrahlung war bei **vorgegebener Strahlendosis** mit Erkennungsraten (Sensitivität) von 100% und mittleren Multiplizitätsindizes zwischen 1.0 und 1.15 aus den Blut und Knochenmarksdaten möglich. Der Multiplizitätsindex ist ein Maß für die Spezifität der Klassifizierung. Er ist 1,00 wenn keine Doppelklassifizierungen auftreten, 1,10 wenn im Mittel jede zehnte, 1,25 jede vierte, 1,33 jede dritte, 1,50 jede zweite Probe doppelklassifiziert werden.

Für die Frage nach der **Dosis** bei bekanntem **Bestrahlungszeitpunkt** wurden Erkennungsraten zwischen 80-90% bei Multiplizitätsindizes zwischen 1.07 bis 1.15 erreicht. Die durchflußzytometrische Messung zellulärer Funktionseigenschaften im Bereich der ersten 24h nach ionisierender Bestrahlung erscheint damit zur praktischen Durchführung einer biologischen Strahlendosimetrie aussichtsreich. Zur weiteren Verbesserung der Klassifizierung und zur Vereinfachung durch Beschränkung auf die Blutzellmessung ist die Erhöhung der Anzahl der gemessenen Funktionseigenschaften (z.B. metabolischer Burst, freies Glutathion, freie Protein-SH-Gruppen, Proteaseaktivitäten, intrazelluläre Ca^{2+}-Werte) von Wichtigkeit.

FUNKTIONZYTOMETRIE MARINER ZOO- UND PHYTOPLANKTON-ZELLEN

G.Valet[1], M.Sieracki[2], H.Kahle[1], T.Cucci[2]

1) Arb.Gruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, 82152 Martinsried, 2) Bigelow Laboratories for Ocean Sciences, West Boothbay Harbor, Maine 04575, USA

Die Erfassung biochemischer Funktionseigenschaften von marinen Planktonzellen ist zur Aufklärung des komplexen Ineinanderwirkens verschiedenster Arten von Mikroorganismen von Interesse. Aufmerksamkeit verdienen auch die Beobachtung von Zellpopulationsänderungen durch vermehrtes atmosphärisches CO_2 Angebot und erhöhte UV-Lichteinstrahlung infolge Ozonrarifizierung in höheren Luftschichten sowie die Erfassung von Populationsveränderungen durch veränderte Wasserzusammensetzung.

Es wurde untersucht, ob die für den biologisch-medizinischen Bereich ausgearbeiteten zellbiochemischen Funktionsfärbungen grundsätzlich auch bei Planktonzellen durchführbar sind, und ob sie in Gegenwart der teilweise hohen zellulären Autofluoreszenz von Chlorophyll oder Phycobiliproteinen mit ausreichender Spezifität vermessen werden können.

Die an Zellkulturzellen (Synechococcus sp., Micromonas pusilla, Pycnococcus provasolii, Isochrysis sp., Rhodomonas tertiolecta, Thalassiosira weissflogii, Amphidinium carterae) durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die Vermessung UV- (350, 354nm) anregender Farbstoffe, wie des Glutathion- und freie Protein-SH Indikators Orthophtaldialdeyd (OPT) und des intrazellulären pH und Esteraseaktivitätsfarbstoffes 1,4-Diacetoxy-2,3-Dicyanobenzol (ADB) unter ähnlichen Färbebedingungen wie bei Säugetierzellen möglich ist. Die Nutzfluoreszenzen werden zwischen 390-440nm und 500-600nm zusätzlich zur Chlorophyllautofluoreszenz zwischen 620-700nm erfaßt. Farbstoffe, die bei 488nm anregen, wie die Transmembran - und Mitochondrienpotentialindikatoren DiOC6(3) und Rhodamin123, die oxidativen Burstindikatoren Dichlorofluorescin (DCFH), Dihydrorhodamin (DHR) und Hydroethidin (HE) sowie verschiedene Rhodamin110-Proteasesubstrate für Kathepsin B, H, L und Serinproteinasen können im FITC- (512-542nm) oder Phycoerythrinlichtkanal (572-600nm) simultan mit der Chlorophyll Autofluoreszenz zwischen 600-700nm erfaßt werden.

Mit den Funktionsmessungen können Veränderungen des Verhaltens von Planktonzellen unter veränderten Lebensbedingungen festgestellt werden. So erhöht sich z.B. bei Thal.weissflogii unter Lichtabschluß die intrazelluläre Chlorophyllkonzentration, das Transmembranpotential und die oxidative Aktivität während die Proteaseaktivitäten vergleichsweise unverändert bleibt.

Die gegenwärtigen Erfahrungen mit biochemischen Funktionsmessungen an Planktonzellen sind zwar noch sehr begrenzt, die weitere Anwendung und Fortentwicklung der Methodik zum besseren Studium von Entwicklungsprozessen und Populationsdynamik von Süß- und Salzwasserplanktonzellen erscheint aber von allgemeinem Interesse.

AKUTE UND CHRONISCHE ANSTRENGUNG: KREUZKLASSIFIZIERUNG VON LYMPHOZYTENPHÄNOTYPEN ZUR SPEZIFITÄTSERMITTLUNG DER AUTOMATISCHEN LISTENDATEIKLASSIFIZIERUNG

G.Valet[1], H.Gabriel[2]

1) Arb.Gruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, 82152 Martinsried, 2) Inst.f.Sport- und Leistungsmedizin der Universität, 66123 Saarbrücken

Die selbstlernende Klassifizierung von CD45RO/CD4 und CD45RO/CD8 Listendateisätzen ergab bei **längerfristigem** Ausdauertraining einen deutlichen **Anstieg** der CD45RO Antigenmenge und Zelloberflächenpackungsdichte auf T-Lymphozyten (Ann.NY Acad.Sci **677**,233-251(1993)). Diese kann als Hinweis für das bevorstehende Auftreten eines Übertrainingssyndrom gewertet werden. Die prozentuale Häufigkeit der einzelnen Lymphozytenpopulationen in der üblichen Quadrantenanalyse blieb dagegen im Verlaufe der Trainingsperioden bemerkenswert **konstant**.

Andererseits ergeben sich bei **akuter** körperlicher Anstrengung ebenfalls deutliche Veränderungen der Lymphozytenpopulationen vor allem bei den **prozentualen** Häufigkeiten der peripheren Lymphozytenpopulation (siehe Abstract H.Gabriel et al.). Sie entsprechen mit Wahrscheinlichkeit einer reversiblen Umverteilung der Lymphozyten.

Die **automatische** Klassifizierung der jeweiligen Datensätze ergab, daß das CLASSIF1 Programm 94.1% (n=51) der normalen und 95.2% (n=21) der übertrainierten Probanden richtig erkennt. Bei akuter Anstrengung wurden 93.2% (n=44) der normalen und 92.7% (n=41) der akut angestrengten Probanden richtig klassifiziert.

Es entstand nun die Frage, ob mit den jeweils gelernten Klassifizieren eine **Kreuzklassifizierung** der Datensätze möglich ist d.h. ob jeder Klassifizierer beim zusätzlichen Vorliegen anderer Zustände seine eigenen Zustände weiterhin identifiziert. Als hilfreich erwies sich hierbei, daß die Blutabnahme bei allen Probanden der Übertrainingsstudie in **Ruhe** erfolgte. Der akute Anstrengungsklassifizierer (AK) bewertete, unabhängig davon, ob das Blut von einem normalen oder einem übertrainierten Probanden kam (n=95), 73.7% der Probanden als in Ruhe befindlich, 17.9% als akut angestrengt und 8.4% als Zwischenzustand zwischen normal und akut angestrengt.

Für die Kreuzklassifizierung des Akutanstrengungsdatensatzes mit dem Übertrainingsklassifizierer (ÜK) wurde als Bewertungsmaßstab das Vorliegen **längerer Trainingsperioden** gewählt, da keiner der Probanden zum Untersuchungszeitpunkt akut übertrainiert war. Der ÜK klassifizierte die ihm unbekannten Proben bei nicht im Training befindlichen Probanden zu 63.4% (n=60) als normal und bei im Ausdauertraining befindlichen Probanden zu 75.0% (n=36) als übertrainiert bzw. in Übertrainingsgefahr.

Beide Klassifizierer arbeiten demnach überraschend trennscharf d.h. mit **hoher Spezifität**. Dies ist Ausdruck des differenzierten Reaktionsvermögens der lymphozytären Systems auf unterschiedliche Anforderungen. Die Befunde sind ein ermutigender Anreiz für die zukünftige Klassifizierung von Lymphozytenphänotypen bei Erkrankungen des Immunsystems.

Ploidie und S-Phase in Abhängigkeit vom Metastasierungsstatus beim resezierten Magenkarzinom

H. Vogelsang, H. Nekarda, J. Roder, U. Fink, J.R. Siewert

Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Beim resezierten Magenkarzinom haben der Lymphknoten- (pN), der Fernmetastasen- (pM) und der Residualtumorstatus (R-Kategorie) eindeutig die größte prognostische Relevanz. Die prognostische Bedeutung der Ploidie und der S-Phase wird dagegen sehr kontrovers diskutiert. Ein Bezug von Ploidie und S-Phase auf exakte Stagingparameter ist notwendig, um eine mögliche Bedeutung für Prognose und Therapieplanung zu erfassen. Es bedarf eines standardisierten Operationsverfahrens (einschl. erweiterter Lymphadenektomie) mit Erzielung makroskopischer und miskroskopischer Tumorfreiheit nach der Operation (R0-Resektion, UICC 1987) sowie differenzierter pathohistologischer Beurteilung, um kein heterogenes Patientengut einzubringen.

Im eigenen Krankengut wurde zwischen 1987 und 1991 bei 164 wegen eines Magenkarzinoms operierten Patienten mit der Durchflußzytometrie (FACScan, Becton Dickinson) die Ploidie und S-Phase bestimmt. Entsprechend der Methode nach Vindeloev wurden Kernsuspensionen aus histologisch kontrollierten 60µm Kryostatschnitten von schockgefrorenem Tumorgewebe hergestellt und mit 1% Propidiumjodid gemessen. Die Auswertung erfolgte mit einem Computerprogramm (Multicycle, Phoenix Flow Systems). Der CV-Wert betrug 3.6%.

Bei 105 Patienten erfolgte eine komplette mikroskopische und makroskopische Tumorresektion einschließlich erweiterter Lymphadenektomie (sogenannte R0-Resektion, R0, pM0). Die Aneuploidierate war für pN0, pN1 und pN2 nicht signifikant unterschiedlich (41%, 57% und 56%). Differenziert nach der pN-Kategorie waren die Überlebensraten bei diploiden bzw. aneuploiden Tumoren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich. Eine intestinale Differenzierung ging gegenüber einer nicht-intestinalen Differenzierung mit einer signifikant höheren Aneuploidierate einher (62% bzw. 45%, $p < 0.05$). 46 Patienten hatten lymphogene (pM1Lym) oder hämatogene Fernmetastasen. Patienten mit Fernmetastasen hatten gegenüber Patienten ohne Fernmetastasen eine signifikant höhere Aneuploidierate (74 bzw. 50%, $p < 0.01$)

Der mittlere S-Phasenanteil war in der R0-Gruppe nicht signifikant verschieden für pN0, pN1 und pN2 (10.3%, 11.6%, 12.0%). Ein prognostisch relevanter S-Phasenanteil konnte nicht gefunden werden. Bei intestinaler Differenzierung war der S-Phaseanteil signifikant höher als bei nicht-intestinaler Differenzierung (13.4 bzw. 8.7%, $p < 0.0001$). In der pM1-Gruppe war die mittlere S-Phase mit 13.7% signifikant größer als in der pM0-Gruppe mit 11.3% ($p < 0.01$).

Aneuploidie und hoher S-Phasenanteil korrelieren beim operierten Magenkarzinom nur mit dem Auftreten von Fernmetastasen. Dagegen besteht ein signifikanter Unterschied bezüglich des Phaseanteiles zwischen intestinal und nicht-intestinal differenzierten Tumoren. Aufgrund dieser Untersuchung ist die Bestimmung von S-Phase und Ploidie bei Patienten nach kompletter Tumorexstirpation ohne Bedeutung.

Anteil an Zellen mit hohem DNA Gehalt und p53 Mutationen als prognostische Parameter beim Lymphknoten negativen Mammakarzinom:

T.Wagner*, A.Adler*, R.Zeillinger*, A.Reiner', M.J.M de Wind#, L.Szabo*, V.Pruckner*, P.Sevelda*, K.Czerwenka*, E.Kubista*, P.Speiser*, J.J.Ploem-Zaaijer#
* I.Universitäts-Frauenklinik, Wien, Austria, ' Inst. für Klin. Pathologie, Wien, Austria, # Dep. of Cytochemistry & Cytometry, Univ. of Leiden, The Netherlands,

Fragestellung:
In dieser Studie wurden 150 Lymphknoten negative Mammakarzinome mit einem follow-up von max 10 Jahren auf ihren Anteil an Zellen mit hohem DNA Gehalt (> 5 C), p53 Mutationen und c-erbB-2 Amplifikation untersucht. Die Aussagekraft als prognostische Parameter wurde zusammen mit dem Rezeptorstatus und klinischen Parametern durch Überlebensanalysen überprüft.

Material & Methoden:
Paraffingewebe von 150 Lymphknoten negativen Mammakarzinomen aus den Jahren 1983 bis 1987 wurde für die Analysen verwendet. Der Prozentanteil von Zellen mit einem hohen DNA-Gehalt (> 5 C) wurde mittels automatisierter Bildanalyse bestimmt. P53 Mutationen und c-erbB-2 Amplifikationen konnten durch eine Kombination von PCR und TGGE der PCR Produkte dargestellt werden. In die statistischen Analysen wurden Rezeptorstatus und klinische Faktoren wie Tumorstadium und Grading inkludiert.

Ergebnisse:
Von 150 Patientinnen starben in einem Beobachtungszeitraum von maximal 112 Monaten 18Patientinnen, 9 Patientinnen erlitten ein Rezidiv. In 72 % Tumoren war der Anteil an Zellen mit hohem DNA Gehalt (> 5 C) kleiner als 1 Prozent, in 28 % größer als 1 %. In 83 % konnte keine Mutation des p53 Gens dargestellt werden. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem hohen Prozentsatz von Zellen > 5 C und p53 Mutationen ($p = 0.000$, chi square analysis). Bei der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ergab sich für die Gruppe von Patientinnen mit einem Anteil an Zellen > 5 C von weniger als 1 % ein signifikant besser Prognose bezüglich des Überlebens im Vergleich zu solchen mit einem Anteil an Zellen > 5 C mit mehr als 1 %. Das Auftreten von Mutationen im Gen für p53 war ebenfalls mit einer signifikant schlechteren Prognose bezüglich des Überlebens assoziiert.

Schlußfolgerung:
Der Anteil an Zellen mit hohem DNA Gehalt und p53 Mutationen konnten in dieser Studie ihre Relevanz als prognostische Faktoren beim Lymphknoten negativen Mammakarzinom aufzeigen. Um diese Bedeutung als prognostische Faktoren besser Einschätzen zu können sollte der Beobachtungszeitraum auf 15 Jahre verlängert und mehr Daten analysiert werde.

Porphycenes as a membrane marker for flow cytometric detection of micronuclei.

J.M. Wessels, M. Nüsse,

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Biophysikalische Strahlenforschung, AG Durchflußzytometrie
85758 Oberschleißheim, Germany.

For flow cytometric analysis of micronuclei induced by ionizing radiation or chemicals, debris plays an important role for the unambiguous detection of micronuclei. Several flow cytometric parameters have been used for a discrimination of micronuclei and debris (Schreiber et al., Cytometry 13:90-102, 1992). For a better discrimination between micronuclei and debris the fluorescence of a membrane specific dye was used as an additional parameter besides DNA-staining. 2-hydroxyethyl-7,12,17-tris(methoxyethyl)-porphycene (HEPn) packed into L-α-phosphatidylcholine dioleoyl liposomes shows a fast intermembrane exchange between the liposomal membrane and the membranes of nuclei, micronuclei and membrane-derived debris. Additionally, this dye exhibits excellent photophysical properties, i.e. a high extinction coefficient and a high fluorescence quantum yield. Therefore we used HEPn for a selective stainining of cellular and nuclear membranes. In combination with the DNA specific dye proflavine we were able to either stain selectively the debris produced by membrane particles or to stain the membranes of nuclei and micronuclei for a better discrimination of debris and micronuclei.

Möglichkeiten zur Steigerung des Signal - zu Rauschverhältnisses bei der Fluoreszenzlichtmessung in der Durchflußzytometrie mittels optimierter Reflexionsoptik

J. Wietzorrek, V. Kachel

Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18a, 82 152 Martinsried

In der Durchflußzytometrie bieten sich innen verspiegelte Rotationsellipsoide als effiziente Sammeloptik für Fluoreszenzlicht an. Das Rotationsellipsoid bildet dann im Idealfall einen Objektpunkt, der mit dem ersten Brennpunkt zusammenfällt, frei von sphärischer Aberration mit hoher Apertur in den zweiten Brennpunkt ab. Zur Einschränkung des Gesichtsfeldes des Detektors, das für Störstrahlung zugänglich ist, wird üblicherweise im zweiten Brennpunkt oder in einem zu diesem optisch konjugierten Punkt eine Raumfilterung mit einem Pinhole durchgeführt. Damit wird eine Verbesserung des Signal - zu Rauschverhältnisses erreicht, was sich in einer entsprechenden Steigerung der Nachweisempfindlichkeit manifestiert.
Bei bisher vorgeschlagenen Konstruktionen ging man davon aus, daß sich zwischen dem Emissionspunkt und der verspiegelten Ellipsoidwand ein Medium mit identischem Brechungsindex (z.B. Luft, Wasser) befindet und damit die einfachen Ellipsoidgesetze gelten. Um eine einfache Handhabbarkeit zu erreichen und die Ablagerung von zum Teil auch toxischen Substanzen zu vermeiden, ist jedoch eine Führung der Meßpartikel innerhalb des Rotationsellipsoids in durchsichtigen Rohren sinnvoll. Dies führt dazu, daß das Medium zwischen dem Emissionspunkt und der Spiegelfläche unterschiedliche Brechungsindices aufweist. Eine solche inhomogene Brechungsindexverteilung verursacht sphärische Aberration, die die weitere Abbildung mit dem Rotationsellipsoid beeinträchtigt. Dies resultiert in einer Verbreiterung der Intensitätsverteilung in der Ebene, die den zweiten Brennpunkt enthält, womit die Effizienz der Raumfilterung herabgesetzt wird.
Für eine an die Symmetrie des Rotationsellipsoids angepaßte Küvettengeometrie wurde der vom Raumfilter übertragene Anteil von der insgesamt abgegebenen Fluoreszenzstrahlung in Abhängigkeit vom Pinholeradius berechnet. Damit kann man die Empfindlichkeit abschätzen, die in Meßkammern mit Reflexionsoptik ohne Korrektur erreichbar ist.
Weiterhin wurde eine optimierte, rotationssymmetrische Reflexionsoptik berechnet, die für eine vorgegebene Küvettengeometrie eine aberrationsfreie Abbildung gestattet. In diesem Fall wird der günstigste Pinholeradius lediglich von der Justiergenauigkeit und der Beugung an der wirksamen Aperturblende bestimmt.
Letztlich wird ein Konstruktionsvorschlag für ein in Hinsicht auf Empfindlichkeit optimiertes Durchflußzytometer unterbreitet, der Küvettengeometrie und Optik umfaßt.

Durchflußzytometrischer Nachweis einer erhöhten Aufnahme von Adriamycin und Mitoxantron durch Stoßwellenbehandlung menschlicher Tumorzellen

Klaus Wörle, Pia Steinbach & Ferdinand Hofstädter

Universität Regensburg, Institut für Pathologie, D–93042 Regensburg

Mittels durchflußzytometrischer Messungen wurde die intrazelluläre Fluoreszenz von Adriamycin und Mitoxantron in verschiedenen Blasentumorzellinien quantifiziert. Während die Fluoreszenzeigenschaften von Adriamycin bereits detailliert beschrieben und in vielen Arbeiten zur Charakterisierung von Adriamycin–Aufnahme und –Verteilung genutzt wurden, sind in dieser Hinsicht für Mitoxantron nur wenige Daten verfügbar. Obwohl die Absorptionsmaxima von Mitoxantron bei 610 nm und 660 nm liegen, konnte dennoch mit der Standardkonfiguration des Durchflußzytometers (Anregung mit Argon–Ionen–Laser bei 488 nm) eine ausreichende Fluoreszenz (> 650 nm) erreicht werden. Es zeigte sich, daß die Fluoreszenzintensität mit der Konzentration an Zytostatika und der Inkubationszeit in einem weiten Bereich zunimmt. Die Zellen wurden zusätzlich während der Inkubation einer Behandlung mit hochenergetischen Lithotripter–Stoßwellen ausgesetzt. Dadurch wurde eine deutliche Erhöhung der zellulären Fluoreszenzintensität von Adriamycin bzw. Mitoxantron erreicht. Diese stärkere Fluoreszenz korreliert mit einer Abnahme der Proliferationsfähigkeit nach kombinierter Behandlung mit Stoßwellen und Adriamycin oder Mitoxantron, die den rein additiven Effekt der beiden Behandlungsmodalitäten einzeln angewandt übersteigt. Ergänzend wurde die intrazelluläre Verteilung der Zytostatika mittels Fluoreszenzmikroskopie und konfokaler Laser–Rastermikroskopie untersucht. Sowohl Adriamycin als auch Mitoxantron färben bevorzugt Kernmembran und Nukleolen; bei Mitoxantron ist zusätzlich eine hohe zytoplasmatische Fluoreszenzintensität nachweisbar. Nach Stoßwelleneinwirkung resultiert eine stärkere Fluoreszenz des Kerns, wobei sich die bevorzugte Anfärbung von Membran und Nukleolen zugunsten einer gleichmäßigeren Fluoreszenz des gesamten Kernvolumens abschwächt. Eine Stoßwellenbehandlung könnte daher durch Membranpermeabilisierung bzw. Einwirkung auf nukleäres Chromatin zu einer quantitativ erhöhten Bindung dieser Zytostatika im Zellkern beitragen.

Poster

Tumorzellabhängiger Abbau von Bromdesoxyuridin in vitro

D. Bartkowiak[1], J. Hemmer[2], E.M. Röttinger[1]

[1]: Abt. Strahlentherapie d. Universitätsklinik, 89070 Ulm

[2]: Sektion Tumorbiologie d. Universitätsklinik, 89070 Ulm

Bei Markierungsexperimenten an menschlichen Hirntumorzellen (A7) mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) wurde ein intensiver Abbau der Ausgangssubstanz zu Bromuracil beobachtet. Obwohl die in vitro Immunfluoreszenzmarkierung und flowzytometrische Messung des BrdU-Einbaus bei A7 gelingt, ist aufgrund der beobachteten Reaktion damit zu rechnen, daß zellinienabhängige Unterschiede der Markierungsraten auftreten. Auch bei der in vivo Verwendung dürften nicht nur die normalen Entgiftungsprozesse über Leber und Niere eine Rolle spielen, sondern die Tumorzellen selbst in der Lage sein, das als Proliferationsmarker oder Radiosensitizer eingesetzte BrdU zu desaktivieren.

Vergleichende Beurteilung von Spermienmorphologie nach der konventionellen WHO-Methode mit morphometrischen Kriterien

Dereser MM, Engels K, Rudareanu D, Ochsendorf F, Taubert HD, Schnürch H-G
Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Zentrum für Dermatologie; Frankfurt a. Main; Theodor-Stern-Kai 7;

Für die assistierte Reproduktionsmedizin ist es erforderlich, bestimmte Kriterien für die Infertilität des Mannes zu definieren und zu nutzen.
Diese Kriterien sollen unter anderem dazu hinführen, daß durch den "männlichen Faktor" prospektive Aussagen über das IVF-Outcome getroffen werden können. Die strengen Kriterien an normomorphe Spermatozoen(strictly normal sperm criteria-SNSC) werden von Kruger, Acosta und Menkveld(92) als hilfreicher Prognosefaktor für die Fertilisationsrate im IVF-Progamm angesehen. Ziele unserer Studie waren :
1. Vergleichende morphologische Beurteilung von normomorphen Spermatozoen
a) gemäß der WHO-Methode mittels Mikrometerschraube(3-5µm Länge, 2-3µm Breite des Spermienkopfes; akrosomale Kappe ein Drittel der Kopfoberfläche bedeckend.)
b) gemäß den SNSC mittels morphometrischer Messung über das interaktive Bildanalysesystem(IBAS)(4-6µm Länge, 2,4-3,5µm Breite des Spermienkopfes; Akrosom 40-70% des Spermienkopfes bedeckend, Borderline-Formen werden als pathomorph klassifiziert.
2. Vergleich des Prozentanteils an normalen Spermatozoen vor und nach der swim-up Aufbereitung des Spermas bei Anwendung beider obengenannten Beurteilungsmethoden.
3. Beurteilung der interindividuellen Variabilität bei Anwendung der beiden Methoden durch zwei Untersucher.
4. Vergleich der zwei Morphologiebeurteilungen in Relation zu ihrer Prognosekapazität im IVF-Programm.
Material und Methoden: Die prozentuale Anzahl an normalen Spermatozoen von 44 Spermiogrammen unterschiedlicher Probanden wurden in HE-gefärbten Ausstrichen ausgewertet.
Die Beurteilung fand per Lichtmikroskop zum einen nach der üblichen WHO-Methode (100 fache Vergrößerung), zum anderen nach den SNSC (63 fache Vergrößerung) statt. Bei der letzteren Technik wurde durch eine entsprechende Video-Kamera eine Gesamtvergrößerung von 3660 erzielt.
Ergebnisse: Die Zahl der normalen Spermatozoen waren bei Anwendung der strengen Kriterien signifikant niedriger als bei der herkömmlichen WHO-Methode. Die interindividuelle Variation war signifikant niedriger nach den SNSC.($p<0.01$) Nach dem Fisher-Test war nur bei den SNSC, nicht nach den WHO-Kriterien ein Zusammenhang zwischen prozentualer Anzahl der Spermien und der Fertilisatonsrate im IVF-Programm festzustellen.($p<0.01$).
Zusammenfassung: Im vorliegenden Testverfahren erlauben nur die SNSC, nicht aber die WHO-Methode, prädiktiv Aussagen über die Fertilisationschancen im IVF-Programm zu machen.

G-CSF INDUCED ALTERATIONS OF NEUTROPHILS FROM PATIENTS UNDER CHEMOTHERAPY OR FROM HEALTHY TEST SUBJECTS.

A. Emmendörffer, J. Roesler, J. Elsner, M. Freund, H. Link, K. Welte, M.-L- Lohmann-Matthes, and K. Spiekermann.

Fraunhofer Institute, Dept. of Immunobiology, Nikolai-Fuchs-Str. 1, 30625 Hannover, Germany, Fax: 0049/511/5350-155.

Recently, we demonstrated that rhG-CSF induced neutrophils in patients with severe congenital neutropenia showed an altered surface marker expression (increased CD14, CD64 and decreased CD16 antigens) and a reduced chemotaxis to a variety of chemoattractants.

To separate the effects of rhG-CSF treatment from that of the underlying disease, we investigated neutrophils from patients receiving cytotoxic chemotherapy and healthy adults after administration of rhG-CSF. Performing kinetic studies, a continous increase in CD14, CD54 (ICAM-1) and CD64 (FcγRI) and a decrease in CD 16 (FcγRIII) antigen expression on neutrophils could be found in patients under rhG-CSF treatment. In parallel, a reduced chemotaxis was observed. Three to five days after cessation of rhG-CSF treatment, neutrophil characteristics returned to levels like found before therapy. Administration of a single dose of rhG-CSF (Neupogen^{R}, 300μg s.c.) to five healthy adults induced similar changes in neutrophil patterns.

These results indicate that neither the underlying disease nor chemotherapy, but rhG-CSF induced the profound alterations of Fcγ receptor and CD 14 antigen expression and chemotaxis in neutrophils in vivo.

Proliferation inhibition in fetal thymocyte subsets ($CD4^{-}CD8^{-}$ and $CD4^{-}CD8^{+}$) by environmental contaminant 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl

Charlotte Esser, Zhiwei Lai, and Joachim Kremer

Dept. of Immunology, Medical Institute of Environmental Hygiene, University of Düsseldorf, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf, Germany

3,3',4,4'tetrachlorobiphenyl (TCB) belongs to a chemical class of toxic substances that also includes dioxins. After exposure to dioxins and biphenyls (like TCB) severe thymus atrophy and systemic immunesuppression is generally found, the former possibly causing the latter. The drastic decrease in thymocyte number after in vivo exposure has been attributed to inhibited thymocyte proliferation or increased intrathymic cell death by apoptosis. We showed earlier that TCB and dioxin exposure of fetal thymi eventually leads to skewed proportions of the different thymocyte subpopulations, i.e. to an accumulation of $CD4^{-}CD8^{+}$ mature thymic T-cells. We analysed the DNA content of thymocyte subsets in fetal thymic organ cultures exposed to TCB for up to one week. The percentage of cycling cells within subsets defined by CD4 and CD8 surface staining was determined by DNA staining with 7-actinomycin D and flow cytometric analysis. Treatment with 3.3 μM TCB reduced the total number of thymocytes in fetal thymi, and significantly fewer thymocytes were in S/G2M phase. The inhibition of cell proliferation induced by TCB affected mainly the $CD4^{-}CD8^{-}$ and $CD4^{-}CD8^{+}$ subsets, whereas no effect of TCB on $CD4^{+}CD8^{+}$ or $CD4^{+}CD8^{-}$ cell proliferative activity was observed. The skewed pattern of thymocyte subsets after TCB exposure together with the observed reduction in proliferative activity suggests that TCB accelerates thymocyte maturation.

Rezeptorexpression insulinähnlicher Wachstumsfaktoren und Zellproliferation bei kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zellinien: Einfluß von Insulin, IGF-1 und IGF-2

A. Gerstner, J. Heymanns, C. Schardt, M. Rotsch, K. Havemann

Klinikum der Philipps-Universität, Zentrum für Innere Medizin, Abt. Hämatologie/Onkologie/Immunologie, Baldingerstraße, 35033 Marburg

Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC) werden dem "dispersed neuroendocrine system" zugerechnet. Aus ihnen hervorgegangene Zellinien weisen ebenfalls die entsprechenden neuroendokrinen Marker auf (Neuronenspezifische Enolase, Bombesin, L-DOPA-Decarboxylase). Untersuchungen an diesen Zellinien zeigten, daß SCLC in der Lage sind, sowohl verschiedene Wachstumsfaktoren - wie Bombesin/GRP, Insulin, Insulin-like growth factor(IGF)-1 und IGF-2 - zu sezernieren, als auch die entsprechenden Rezeptoren zu exprimieren (Havemann, K., et al (1990) J Steroid Biochem Molec Biol 37:877-882). IGF-1 und IGF-2 sind für die Steuerung der Ontogenese von entscheidender Bedeutung. SCLC produzieren nicht nur IGF-1 und IGF-2 sondern auch Proteine der IGF-Bindungsprotein(IGFBP)-Familie. Mittels H^3-Thymidineinbau und MTT-Assay wurde eine Wachtumsregulation durch Insulin, IGF-1 und IGF-2 nachgewiesen (Jaques, G., et al (1988) Exp Cell Res 176:336-343).

Um den Einfluß von Insulin, IGF-1 und IGF-2 auf den Zellzyklus und die Expression der entsprechenden Rezeptoren zu untersuchen, haben wir modifizierte durchflußzytometrische Assays zur Analyse von drei SCLC Zellinien eingesetzt. Die Bestimmung des S-Phase-Anteils erfolgte mit einem BrdU/PI-Assay. Für die Korrelation des DNA-Gehaltes mit der Rezeptorexpression (zytoplasmatisch und membranständig) wurde 7-AAD als DNA-spezifischer Farbstoff gewählt und PE- oder FITC-konjugierte monoklonale Antikörper verwendet. Drei Zellinien, die sich durch serumfreies Medium gut synchronisieren ließen, wurden mit den Peptiden unter serumfreien Bedingungen stimuliert.

Die Wirkungen der Peptide entwickelten sich konzentrations- und zeitabhängig. Bei zwei Zellinien waren sie in der Lage, die DNA-Synthese zu stimulieren; der Anteil von Zellen in der S-Phase betrug unter Stimulation nach 24-48h 110-120% des Wertes unter Kontrollbedingungen. Bei einer Zellinie wurde durch IGF-2 (10^{-12}M) der Anteil von Zellen, deren Oberfläche positiv für den Typ-1-IGF-Rezeptor (IGF-1-R) und den Insulin-Rezeptor (I-R) war, von 88% auf 48% bzw. von 48% auf 7% reduziert. Bei einer anderen Zellinie hatte Insulin (10^{-8}M) umgekehrte Effekte auf den Anteil der IGF-1-R- und I-R-positiven Zellen: von 11% auf 22% bzw. von 4% auf 11%. Die Expression des Typ-2-IGF-Rezeptors wurde durch die verschiedenen Kulturbedingungen kaum beeinflußt.

Das Verhalten der Zellinien ist nach Stimulation mit insulinähnlichen Wachstumsfaktoren im Hinblick sowohl auf die Proliferation als auch auf die Regulation der Rezeptorexpression unterschiedlich. Diese Differenzen könnten teilweise durch die jeweils unterschiedliche Sekretion von verschiedenen IGFBP erklärt werden.

Durchflußzytometrie zur Kontrolle von Prostataprimärkulturanzuchten

Daniela Grimm, Ferdinand Hofstädter, Pia Steinbach, Wolf Wieland, Eckhard P. Kromer, Günter A. J. Riegger und Johann Bauer

Dr. med. Daniela Grimm
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II
Klinikum der Universität
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
8400 Regensburg

Primärkulturen können sehr nützliche Modelle sein, um organspezifische Fragestellungen in biochemischer oder auch pharmakologischer Hinsicht zu untersuchen. In vielen Fällen ist es dabei von Interesse zu überprüfen, inwiefern die zelluläre Zusammensetzung einer Primärkultur dem zytologischen Aufbau des Primärtumors entspricht. In Studien an humanen Prostatakarzinomen erschien eine derartige Überprüfung aus folgenden Gründen sinnvoll zu sein: 1. Prostatakrebszellen sind im Anfangsstadium der Tumorentwicklung weitgehend von wachstumsfördernden Einflüssen der umgebenden gesunden Zellen abhängig. 2. Bisher sind Antikörper, die humane Prostatakarzinomzellen zuverlässig identifizieren, kommerziell noch nicht erhältlich. Außerdem ist im noch operablen Anfangsstadium der Anteil der Tumoren mit aneuploiden Karzinomzellen sehr gering. Karzinomzellhaltige Organareale können häufig also nur mit klassischen mikroskopischen Methoden identifiziert werden. Ob in einer Prostataprimärkultur auch maligne Zellen vorhanden sind, kann oft nur vermutet werden. Solche Vermutungen erscheinen begründet, wenn während der Inkubation eines Gewebsstückes, das karzinomhaltige Areale enthält, der Anteil der epithelialen Zellen konstant geblieben ist. Wir haben 12 Prostatatumoren, die noch vor Überschreiten der Organgrenze chirurgisch entfernt wurden, charakterisiert und etabliert. Es wurden zytokeratin- und vimentinpositive Zellen sowie simultan deren DNA-Gehalt bestimmt.

Durch wiederholte durchflußzytometrische Charakterisierung von Primärtumoren und Kulturen wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, Kurzzeitkulturen so anzuzüchten, daß deren Gehalt an epithelialen und fibroblastären Zellen vergleichbar mit der in vivo Situation im Primärtumor ist.

Detection of small differences in DNA content like aneuploidy in plant species.

E.J.M.Huis in't Veld *, W. Göhde **,
* Iribov, Enkhiuzen, Nederland
** University of Münster, Germany

Ploidy analysis by flow cytometry is a generally accepted technique in plant breeding and plant tissue culture.

When ploidy level is analyzed differences of 100% in DNA content must be recognized. For the analysis of aneuploidy however smaller DNA differences must be detected, depending on the number of chromosomes and the variation in chromosome lengths. In most cases DNA amount differences below 3% has to be detected.

By using a two step nuclei isolation and staining protocol(*) which gives high resolution DNA histograms (CV around 1%), and by applying an internal DNA standard, very reproducible results could be obtained. DNA content differences down to 1% could be detected, which is in most plant species enough for the detection of aneuploidy. This accuracy is sufficient to detect one chromosome difference or less, depending on the total chromosome number.

The method was tested on several plant species (shugar beet, iris, potato and others), in all cases with good results. Applications of this technique in plant breeding and plant tissue culture are discussed.

(*) Partec high resolution DNA kit

Breaking the interspecific-hybrid sterility in the bulbous Iris: In vitro chromosome doubling and subsequent flow cytometric analysis.

E.J.M. Huis in't Veld, E.J. Boon, and C.R.Boon
Iribov, Enkhuizen, Nederland

Most major bulb-Iris cultivated varieties are derived from crosses between I. xiphium (2n=34) and I. tingitana (2n=28). The hybrids (2n=31) are sterile and can therefore not be used for further breeding.

An in vitro method was developed in which the ploidy level of Irisses was doubled by colchicine treatment. Flow cytometric analyses allowed efficient ploidy screening in a very early stage.
The obtained plants flowering so far showed all restored fertility.

Between the Iris species differences in nuclear DNA content were observed. Several parental combinations (different species, different ploidy levels) were examined. In all cases progeny had intermediate DNA amount. This allowed the determination of the genetic background of several Iris cultivars from unknown origin.

Charakterisierung von Saccharomyces-Hefen mit Hilfe der Flußzytometrie

Hutter, Karl-Josef

DKFZ Heidelberg, Institut für angewandte Immunologie,
Im Neuenheimer Feld 280

69120 Heidelberg

Saccharomyces-Hefen werden sehr häufig bei biotechnologischen Prozessen eingesetzt, weil sie sich im haploidem und diploidem Zustand problemlos vermehren lassen, ein kleines Genom besitzen und eine kurze Generationszeit haben. Die Untersuchungen der Hefe während der Gärung beschränken sich auf wenige indirekte Verfahren, z.B. der Zunahme des Alkoholgehaltes, der CO_2-Konzentration, der Bestimmung des Extraktgehaltes oder der Temperaturerhöhung. Veränderungen dieser Parameter, die als Streßfaktoren der Hefe gelten, können zu negativen Begleiterscheinungen während des Gärprozesses führen.
Es fehlen direkte Untersuchungsmethoden (Proliferations- und Enzymaktivitätanalysen), die sofort eine Funktionsänderung der Zellpopulation anzeigen. Erfahrungen über Funktionsänderungen bei Hefen liegen z.Z. nur begrenzt vor. Es wurde daher untersucht, ob es unter ähnlichen Färbebedingungen wie bei Säugetierzellen möglich ist:

- Proliferationsanalysen, als Maß für die Gäraktivität und/oder Gärgeschwindigkeit,
- DNS-Analysen, zur Überprüfung der genetischen Stabilität einer Zellkultur und
- Enzymaktivitätsanalysen, zur Bestimmung des zellphysiologischen Zustandes einer Population, durchzuführen.

CIRCADIANE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN HORMONSPIEGELN UND LYMPHOZYTENSUBPOPULATIONEN IM PERIPHEREN MENSCHLICHEN BLUT

T.O. Kleine[1], R. Hackler[1,2], K. Ehlenz[2], P. Zöfel[3], J. Albrecht[4]

[1]Med. Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie, der Universität Marburg a.d. Lahn
[2]Med. Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechsel, der Universität Marburg a.d. Lahn
[3]Hochschulrechenzentrum, Abteilung Anwendung, der Universität Marburg a.d. Lahn
[4]Becton Dickinson, Heidelberg

Der Einfluß des endokrinen Systems auf Immunzellen wurde hier wie folgt untersucht: Von drei gesunden Männern wurde in vierstündigen Intervallen über 48 h venöses EDTA-Blut entnommen, der Blutspiegel von vier Hormonen gemessen und Leukozyten, insbesondere Lymphozyten und deren Subpopulationen im Durchflußzytometer bestimmt (vgl. 1).
Hormonanalyse: Adrenocorticotropin (ACTH) (ng/l) mittels Immunoluminometrie (Henning, Berlin); Cortisol (µg/l) mittels Enzymimmunoassay TDx (EIA) (Abbot, Wiesbaden); Humanes Wachstumshormon (hGH) (ng/l) mittels Immunoradiometrie (IRMA) (Medgenix, Ratingen); Prolactin (µg/l) mittels IRMA (Serono, Freiburg).
Zellanalyse: Leukozyten-, Erythrozyten-, Thrombozyten-Zahl, Hämatokrit und Hämoglobin wurden im Cell-Dyn 1600 (Sequoia Turner Corp., Mountain View, USA) gemessen. Leukozytendifferenzierung und Lymphozytensubpopulationen wurden im FACScan nach Doppelmarkierung mit monoklonalen Reagenzien (Becton Dickinson) untersucht. Die Signifikanz circadianer Rhythmen wurden statistisch mit dem Verfahren von NELSON et al. (2) evaluiert.
Ergebnisse und Diskussion:
Die Plasmaspiegel (mit peak time) von ACTH (9.00-10.00 h) und Cortisol (6.00-8.00 h) wiesen signifikante circadiane Schwankungen auf, gering signifikante dagegen hGH (7.00-8.00 h) und Prolactin (2.00-3.00 h). Von den Lymphozytensubpopulationen zeigten signifikante circadiane Veränderungen (mit peak time): T-Lymphozyten (23.30 h), $CD4^+3^+$ (23-24 h), $CD4^+45R^+$ (00.30 h), $CD8^+3^+$ (00 h), $TCR\alpha\beta^+$ (00 h), $TCR\gamma\delta^+$ (23-24 h), $CD19^+$ B-Zellen (21 h). Dagegen erwiesen sich tageszeitliche Abweichungen von NK-Zellen, $CD15^+56^+3^+$ T-Zellen, $CD19^+5^+$ B-Zellen und aktivierten T-Zellen ($CD69^+$, $HLA\text{-}DR^+$) als nicht signifikant. Diese Veränderungen wurden nicht durch tageszeitliche Schwankungen des Hämatokritwertes hervorgerufen (11.00-12.00 h). Diese Befunde zeigen eine inverse Beziehung an zwischen Plasma-Cortisol- (und ACTH-)Spiegel und der Zahl von T-Lymphozyten und ihren Subpopulationen. Inwieweit Prolactin- bzw. hGH-Plasmaspiegel die $CD69^+$-Aktivierung der $CD3^+$ T-Lymphozyten bzw. die Zahl der NK-Zellen im venösen Blut beeinflussen können, muß in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

1) T.O. KLEINE, R. HACKLER, K. EHLENZ, P. ZÖFEL, J. ALBRECHT (1993) In: Biological Rhythms: from cell to man. (J. BEAU, J.F. VIBERT eds.) Polytechnica, Paris, pp. 219-229.
2) W. NELSON, Y.L. TONG, F. HALBERG (1979) Chronobiologia 6: 305-323.

Einfluß der Streulichtkorrektur auf die DNA-Bildzytometrie verschiedener Knochenmarkzellen

Lakner, V. *, H. Auer**, A. Böcking **, B. Sommer***

*) Abteilung Hämatologie/Onkologie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Medizinische Fakultät der Universität Rostock, E.-Heydemann-Straße, 18057 Rostock
**) Institut für Pathologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule, Pauwelsstraße 30, 52057 Aachen
***) ABOS, Freisinger Straße, 85386 Eching

Ein seit langem bekannter Störfaktor der Mikroskop-Photometrie - das durch Geräteeigenschaften des Mikroskops verursachte Streulicht (glare) - ist auch bei optimierter Mikroskopeinrichtung nicht völlig zu vermeiden. Insbesondere bei sehr kleinen Meßobjekten kann dieser Meßfehler zu falsch erhöhten Transmissionswerten beträchtlichen Grades führen. In der DNA-Bildzytometrie von nach Feulgen gefärbten Zellkernen gewinnt dieses Phänomen vor allem dann an Bedeutung, wenn die Kernflächen von Referenz- und Analysezellen erheblich voneinander abweichen. In der Software der modernen Videomikroskopie kann eine Streulichtkorrektur vorgenommen werden, deren Optimum allerdings im jeweiligen Meßsystem ermittelt werden sollte.
Um den Einfluß von Streulicht und seiner Korrektur auf die Ergebnisse der DNA-Zytometrie zu bestimmen, wurden nach Feulgen gefärbte Knochenmarkausstriche wiederholt bei verschiedenen Glarekorrekturen (von 0 % bis 6,3 %) an einem TV-Cytometer vom Typ CM1 der Firma HUND untersucht. Analysiert wurden a) myelische mononukleäre Zellen (MZ) und b) Erythroblasten (EB) im Vergleich zu polymorphkernigen Granulozyten bzw. Lymphozyten aus denselben Präparaten als interne Referenzzellen. Ergebnisse:
1. Die Meßwerte von EB, die einen hohen Anteil kleiner Kerne aufweisen (Kernflächen < 25 um^2), werden am stärksten beeinflußt. Die im Idealfall vertikale Anordnung der Wertepaare Kernfläche vs. DNA-Gehalt von diploiden Kernen weicht bei Messung ohne Glarekorrektur im Bereich kleiner Kerne (< 20 um^2) deutlich nach links ab, dh. kleine Kerne werden mit falsch zu niedrigen Absorptionswerten gemessen.
2. Insgesamt verschiebt sich die Stammlinie der EB außerdem nach links . Die Stammlinienverschiebung wird durch Elimination von Kernen < 15 um^2 nicht aufgehoben.
3. Bei den viel größeren Kernen der MZ (Mittelwert > 65 um^2) ist die Stammlinie ohne Glarekorrektur etwas nach rechts verschoben.
4.Bei Einsatz der Glarekorrektur werden in Abhängigkeit von der Farbintensität und Fläche der Kerne die DNA-Werte von Knochenmarkzellen unterschiedlich stark korrigiert (etwa : kleine EB > große EB > Lymphozyten > Polymorphkernige > MZ).
5. Bei Einsatz einer Glarekorrektur von 3,0 % bis 4,0 % hebt sich die gegensinnige Stammlinienverschiebung der EB und MZ annähernd auf, die diploide EB-Population stellt sich im Diagramm Kernfläche vs. DNA-Gehalt ebenfalls annähernd als Vertikale dar.
6. Glarekorrekturen von > 4 % erwiesen sich als zu hoch. Mit zunehmender Glarekorrektur kommt es zu einer erheblichen Stammlinienverschiebung der EB nach rechts und zunehmend zu falsch positiven "aneuploid events" in der EB-Population.
7. Polymorphkernige Granulozyten aus demselben Präparat ergeben bei einer Glarekorrektur von 3,0 bis 3,5 % mit beiden Analysezellpopulationen die beste Übereinstimmung.

Die Aneuploidie als unabhängiger prognostischer Parameter: Veränderung der Therapiestrategie beim Prostatakarzinom

Th. Liedl[1], H. Gullmann[2], F. Meisse[2], B. Liedl[2], A. Hofstetter[2], K. Schrott[1]

[1]Urologische Universitätsklinik der Friedrich-Alexander-Universität Maximilianspatz, 91054 Erlangen
[2]Urologische Universitätsklinik der Ludwig-Maximilians-Universität Klinikum Großhadern, Marchioninistraße 15, 81377 München

Das Prostatakarzinom gehört bei steigender Inzidenz zu den häufigsten Tumorformen männlicher Patienten. Der Auftrag an die Klinik besteht darin, den Prostatakrebs frühzeitig zu finden und bei Nachweis dem richtigen individuellen Therapieschema zuzuordnen.
Die Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts hat in den letzten Jahren wegen der erkennbaren prognostischen Relevanz und den vertretbaren Präparationsaufwand den Nachweis einer klinischen Einsatzmöglichkeit erbracht. Als optimale Präparationsmethode hat sich die DNA/Cytokeratin-Doppelmarkierung intakter Zellen zur Ausgrenzung störender Subpopulationen bewährt. Aufgrund einer spezifischen Tumorbiologie der Prostatatumoren ist bei einem Überwiegen der tetraploiden Klone mit 41% der Anteil aneuploider Karzinome mit knapp 10% sehr klein.
Der konsequente klinische Routineeinsatz der DNA-Flowzytometrie als **diagnostische** Screeningmethode scheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht sinnvoll zu sein, da die flowzytometrische DNA-Analyse von Feinnadelbiopsien nicht die Sensitivität und Spezifität der Zyto- und Histologie als der bewährten Gewebediagnostik erreicht.
Die Indikation zur DNA-Analyse mit **prognostischer** Fragestellung wird aber in der großen Gruppe der bereits gesicherten mitteldifferenzierten Prostatakarzinome gesehen, die sich bei Diagnosestellung in der intakten Prostatakapsel befinden. Es läßt sich mit der sicheren Erfassung von DNA-aneuploiden Karzinomen eine Hochrisikogruppe bestimmen. Durch die Voraussage, welche der Patienten am Tumor selbst sterben und welche wahrscheinlich sterben, bevor ihr Tumor sie tötet, wird die Entscheidung zwischen aggressiver und abwartender Behandlung auf eine objektivere Grundlage gestellt. Da schon kleinere **aneuploide Tumoren im Stadium T1/2** einen schnelleren Progreß aufweisen, sollte in diesen Fällen schon **früher** als bisher zur radikalen Operation geraten werden.
Auch für obere Indikationsgrenze zur Radikaloperation, die kapselüberschreitenden Tumoren im Stadium T3, werden deutliche Unterschiede gesehen: Aneuploide Patienten in dieser Patientengruppe werden von einer OP kaum mehr profitieren, selbst wenn zusätzlich eine Hormon- oder Radiotherapie erfolgen sollte. Daraus ergibt sich die klinisch wichtige Aussage, daß in **aneuploiden T3-Stadien** ein kurativer operativer Therapieansatz **nicht** versucht werden sollte.
Die Indikationsgrenzen der radikalen Prostatektomie können durch DNA-Analyse zu beiden Seiten hin besser definiert werden. Eine **Veränderung der Therapiestrategie** wird bei aneuploiden Tumoren für die invasive Therapie angestrebt, nicht als Einschränkung der Indikationsbreite, sondern im Sinne einer Verschiebung hin zu niedrigeren Tumorstadien als bei euploiden Karzinomen.

Flowzytometrische Diagnose der Plattenepithelmetaplasie in Blasenspülflüssigkeiten

Th. Liedl[1], St. Remboid[2], B. Ganzmann[2], S. Renner[1], A. Hofstetter[2], K. Schrott[1]

[1]Urologische Universitätsklinik der Friedrich-Alexander-Universität
Maximilianspatz, 91054 Erlangen
[2]Urologische Universitätsklinik der Ludwig-Maximilians-Universität
Klinikum Großhadern, Marchioninistraße 15, 81377 München

Seit der Etablierung der flowzytometrischen Analyse des DNA/Cytokeratin-Gehalts ganzer Zellen im Jahr 1988 wurden an unseren Kliniken über 1000 Blasenspülflüssigkeiten standardisiert gemessen und die klinischen Anwendungen dieser Methode untersucht. Im Vergleich zur Zytologie besteht die klinische Wertigkeit dieser früher experimentellen Methode in der Auftrennung zytologisch gesicherter Blasenkarzinome in zwei prognostisch bedeutsame Untergruppen, sowie in der Verlaufsbeobachtung von Blasentumorpatienten zur verbesserten Rezidiverkennung.

Die verschiedenen Subpopulationen wie Entzündungszellen und Debris in den Proben können aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften im standardisierten Meßaufbau identifiziert werden. Bei der Auswertung großer Patientenkollektive sollten aber auch seltene Diagnosen sicher erfaßt werden. Durch die Wahl des Antikörpers gegen ausgewählte Cytokeratinsubgruppen des Moll-Schemas gelingt es zusätzlich, zwischen den Urothelien (mit einer starken Färbung für 8,18,19) und den Plattenepithelien (die nur 19 exprimieren) zu unterscheiden.
Plattenepithelmetaplasien als Sonderform dieser Zellgruppe grenzen sich ebenfalls im Fluoreszenzbild eindeutig von Entzündungs- und Urothelzellen ab. Sie sind darüberhinaus die einzigen von uns bisher aufgefundenen, klinisch gutartigen Veränderungen, die flowzytometrisch das Bild einer Aneuploidie zeigen. Diese entstehen möglicherweise durch nicht-stöchiometrische DNA-Farbstoffbindung oder durch Anfärbung ihrer vermehrt vorhandenen zytoplasmatischen RNA. Der Metaplasie selbst können keine Chromosomenveränderungen zugeordnet werden. An einer eigenen Verlaufsuntersuchung der kleinen Patientengruppe mit reiner Plattenepithelmetaplasie, die sich jahrelang in unserer Überwachung befand, konnte auch klinisch und zytologisch kein Übergang in ein Karzinom festgestellt werden.

Mit der standardisierten flowzytometrischen Mehrparameteranalyse konnte eine wichtige Fehlerquelle der Einparametermessung eliminiert werden, die zu einer falsch hohen Aneuploidierate geführt hatte. Die erreichte sehr hohe Spezifität und Sensitivität für den Parameter Aneuploidie läßt nun die Einteilung in verschiedene Prognosegruppen mit der für den klinischen Einsatz erforderlichen Zuverlässigkeit zu.

DNA-Instabilität in humanen Lymphozyten während des Alterns: Apoptose oder Nekrose ?

M.A.Moustafa und W. Sachsse
Institut f. Genetik Uni. Mainz

Die DNA-Instabilität während des Alterns kann man in der jetzigen Zeit nicht mehr übersehen.

Während der letzten 25 Jahre zeigten uns die gerontologischen Untersuchungen eine reproduzierbare, altersabhängige DNA-Instabilität in Form von:

- Chromosomenaberration,
- Schwesterchromatidaustausch,
- DNA-Strangbruch,
- DNA-Aneuploidie,
- Mikrokernfrequenz.

Gemäß der Selbstmord-Hypothese führt die DNA-Instabilität zu einem programmierten Zelltod (Apoptose). Mit ihm erwartet man eine Zunahme der apoptotischen Zellen während des Alterns.

Mit Hilfe von DNA - Entspiralisierungs - Verfahren und dem Komet-Assay konnten wir zeigen, daß die DNA-Fragmentierung während des Alterns zunimmt.

Unerwartet zeigten uns die FCM - Untersuchungen keine altersabhängigen Veränderungen in den Apoptosefrequenzen trotz Anstiegs der DNA-Fragmentierung im hohen Alter.

Dagegen zeigten diese Untersuchungen einen deutlichen Anstieg des nicht-programmierten Zelltodes (Nekrose) mit zunehmenden Alters.

Aus dieser Arbeit stellten wir folgendes fest:

- Das Komet-Verfahren kann keine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose liefern.
- Die Flußzytometrie ist in der Lage, solche Differenzierungen zu erfassen.
- Der nicht-programmierte Zelltod häuft sich im Alter.
- Der Zusammenhang zwischen Selbstmord - Hypothese und Altern ist ein Licht ohne Schatten.

Untersuchungen zur Populationsdynamik von Saccharomyces cerevisiae anhand flowcytometrischer Messung des 3ß-Hydroxysterol- und DNS-Gehaltes

Susann Müller, Andreas Lösche, Thomas Bley

WIP – Arbeitsgruppe Biosignale, Permoserstr. 15, O – 7050 Leipzig

Methoden zur Charakterisierung des physiologischen Zustandes mikrobieller Populationen und dabei insbesondere die Flowcytometrie werden für das Monitoring biotechnischer Prozesse zunehmend unverzichtbar. Die Eigenschaften solcher Populationen werden durch die Eigenschaften der enthaltenen Individuen bestimmt. Insbesondere bei der Kultivierung der Bäckerhefe ist das Wissen um die Möglichkeit einer Steuerung mittels Zytometrie wegen der Vielschichtigkeit der ablaufenden Prozesse von großer Bedeutung.

Mit dieser Methode können die wesentlichen, Qualität und Quantität der Backhefe beeinflussenden intrazellulären Parameter charakterisiert werden.

Dazu zählen, ebenso wie der DNS-Gehalt, der Gehalt an membrangebundenen 3ß-Hydroxysterolen. Diese übernehmen im Metabolismus der Hefezelle neben ihrer Aufgabe, den Zellzyklus zu initiieren, eine Schutzfunktion durch Kondensation der Phospholipide der Membran.

Die Methodik zur Markierung der 3ß-Hydroxysterole für flowcytometrische Messungen wurde erarbeitet und ihre Aussagefähikeit an verschiedenen Hefestämmen aufgezeigt. Das an FITC gekoppelte Polyen-Macrolid-Antibiotikum Nystatin erwies sich auf Grund seiner strukturellen Eigenschaften als idealer Marker für Membransterole sowohl in Hefezellen als auch in menschlichen Zellsystemen.

Flowcytometrische Messungen wurden sowohl an batch- als auch an fed-batch-Kulturen vorgenommen. Zu Beginn der Proliferation war in beiden Fällen eine rapide Zunahme des 3ß-Hydroxysterolgehaltes zu verzeichnen. Gegen Ende traten bimodale Verteilungen auf, die auf differenzierte Stoffwechselaktivitäten der Zellen hinweisen. Ein hoher Sterolgehalt zu Beginn einer Fermentation gewährleistet durch die schnelle Initiierung der Proliferation eine höhere quantitative Ausbeute an Zellmaterial.
Ein hoher Sterolgehalt gegen Ende einer industriellen fed-batch-Kultivierung, vorausgesetzt, die Zellen befinden sich in der G1-Phase des Zellzyklus, garantieren eine Backhefe mit ausgezeichneter Triebkraft und langer Lagerfähigkeit. Streßfaktoren, wie die Zugabe von hohen Konzentrationen Glucose, werden durch den Einbau der 3ß-Hydroxysterole in die Membran kompensiert. Sauerstoffmangel erniedrigt den intrazellulären Gehalt an 3ß-Hydroxysterolen.

Weitere Informationen über den metabolischen Zustand der Hefepopulation wurden durch Charakterisierung der Zellen bezüglich ihres Neutrallipidgehaltes (Streß- und Reservestoff) und mittels Vorwärts- und Rechtwinkelstreuung gewonnen, wobei letztere hinsichtlich zellzyklusabhängiger Änderungen in der Membrankonsistenz der Zellen beim On – line – Monitoring biotechnischer Prozesse zur Anwendung gebracht werden kann.

Untersuchungen zur Integrinexpression und zum Zellzyklus bei immortalisierten Hepatozyten in der Zell-Matrix-Wechselwirkung

[1]Barbara Nebe, [1]Agnes Knopp, [1]Joachim Rychly, [2]Wolfgang Bohn, [3]Michael Strauss

[1]Universität Rostock, Klinik für Innere Medizin; [2]Heinrich-Pette-Institut Hamburg; [3]Max-Delbrück-Institut für Molekularbiologie Berlin-Buch

Integrine spielen eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Mit der Durchflußcytometrie wurde die Expression der Integrinsubeinheit β1, sowie der für die Spezifität gegenüber Matrixproteinen zuständigen α-Ketten 2 ,4, 5, 6 bei immortalisierten Hepatocyten unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht.
Verschiedene Methoden zum Ablösen der adhärenten Zellen für die durchflußcytometrische Analyse in der Suspension beeinflußten nicht die ermittelte Integrinexpression. Die Beurteilung des FSC/SSC zeigte, daß Trypsinierung anderen enzymatischen Methoden, wie Dispase- und Kollagenasebehandlung vorzuziehen ist.
Mit der DNA Cytometrie wurde nachgewiesen, daß subkonfluente Kulturen einen Anteil von 30% der Zellen im Zellzyklus aufwiesen, während konfluente Kulturen nur wenig proliferierende Zellen enthielten.
Sowohl in konfluenten als auch in subkonfluenten Kulturen zeigen die Zellen eine besonders starke und stabile Expression von α2. A4 wurde in konfluenten Kulturen exprimiert und war in vergleichbaren subkonfluenten Kulturen negativ.
Kultivierung der Zellen auf Matrixproteinen, wie Kollagen IV und Laminin, die von den Hepatozyten selbst nicht produziert wurden, zeigten, daß α2 und β1 bei konfluenten Kulturen auf Kollagen IV verstärkt exprimiert wurden.
Durch Doppelmarkierung von Integrin (FITC) und DNA (PI) ließ sich zeigen, daß proliferierende Zellen eine leicht erhöhte Expression von α2 aufwiesen.
Die Untersuchungen zeigen, daß in Abhängigkeit von der Konfluenz der Kultur Integrine unterschiedlich exprimiert werden können, möglicherweise entweder durch Zell-Zell-Kontakt oder durch veränderte Proliferation.
Matrixproteine, wie Kollagen IV beeinflussen die Integrinexpression ebenfalls in Abhängigkeit von der Konfluenz.

Nachweis von Aneuploidien bei hämatologischen Erkrankungen mittels Durchfluß-Zytometrie und zytogenetischer Chromosomenanalyse - Methodenvergleich

Uta Oelschlägel, Brigitte Mohr und Ralf Nowak

Medizinische Akademie Dresden; Klinik für Innere Medizin; Abt. Hämatologie/Onkologie
Fetscherstr. 74; 01307 Dresden

Bei malignen hämatologischen Erkrankungen treten neben strukturellen auch gehäuft numerische Abweichungen vom normalen Chromosomensatz, d.h. Aneuploidien, auf. Diese werden mittels zytogenetischer Chromosomenanalyse erfaßt . Der Nachweis von Aneuploidien kann auch durchflußzytometrisch erfolgen, wobei wir der DNS-Quantifizierung eine Immunphänotypisierung voranstellen, um die malignen Zellen von der normalen Resthämatopoese abzugrenzen.
Mit den genannten Methoden wurden bei uns 1992/93 Myelodysplasien (11 Patienten), NHL (13), Akute Myeloische Leukämien (9) und Akute Lymphatische Leukämien (9) untersucht.
Ein Vorteil der durchflußzytometrischen Methode besteht darin, daß Aneuploidien auch in nicht proliferierenden Zellen, wie häufig bei Erkrankungen der Lymphopoese vorhanden, nachweisbar sind. Zytogenetisch falsch negative Befunde sind möglich, wenn der pathologische Klon nicht ausreichend proliferiert.
Mit der hier aufgeführten durchflußzytometrischen Methode zur Erfassung der Proliferationsrate kann indirekt ermittelt werden, welcher Zellsubpopulation die mittels Zytogenetik analysierten Mitosen zuzuordnen sind.
Andererseits können prozentual geringe Abweichungen im DNS-Gehalt, wie das 5q-Mangel-Syndrom oder die Trisomie 21 bei Myelodysplasien, nur zytogenetisch sicher erfaßt werden.
Durch gezielte Kombination beider zum Nachweis einer Aneuplodie möglichen Methoden kann sich die Validität der Befunde erhöhen lassen.

ATP-ABHÄNGIGE EXPULSION VON MCB-GLUTATHIONE-ADDUKTE IN RATTEN-, MÄUSEN- UND MENSCHLICHEN ZELLEN.

M. Poot, T.J. Kavanagh (+), P.S. Rabinovitch (++), A. Grossmann (*), J. Köhler und H. Höhn.

Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, 97074 Würzburg, und (+) Department of Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, (++) Department of Pathology, (*) Department of Comparative Medicine, University of Washington, Seattle, WA 98195, U.S.A.

Mittels kontinuierlicher durchflußzytometrischer Analyse der Fluoreszensintensität nach Anfärbung mit dem Glutathionfarbstoff Mono-Chloro-Bimane (MCB) bei 37 °C wurde versucht die Glutathion-S-Transferase-Aktivität von Ratten-, Mäusen- und menschlichen Zellen zu erfassen. In den ersten zwei Minuten der Analyse in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen von MCB zeigte sich eine steile Zunahme in der Fluoreszensintensität, welche danach in ein Plateau überging. Bei Beobachtungszeiten länger als 10 Minuten konnte jedoch in Fibroblasten aus Ratten und Mäusen ein Abfall der Fluoreszenz vermessen werden. Sowohl die Höhe als auch die Länge des Plateaus waren abhängig von der MCB-Konzentration. Menschliche periphere Blut-Lymphozyten zeigten zwar keinen Verlust der Fluoreszensintensität, jedoch konnte eine Zeit-Abhängige Zunahme der Fluoreszenz im Medium beobachtet werden. Der Verlust der MCB-Fluoreszenz konnte verhindert werden durch Behandlung der Zellen mit Probenicid, ein Hemmstoff der ATP-abhängigen Anionpumpen, während Dicoumarol und Acivicin keine Wirkung zeigten. Die Höhe der Fluoreszensintensität wurde nicht von Probenicid beeinflußt. Aus diesen Beobachtungen ist zu schließen, daß eine ATP-abhängige Membranpumpe Glutathionaddukte aus Zellen herauspumpt. Die Implikationen dieser Beobachtungen für die durchflußzytometrische Erfassung des zellularen Thiolspiegels werden diskutiert.

Die Bedeutung der LDL-Rezeptor-Expression auf Monozyten für den Lipoproteinabfall in der Akute-Phase-Reaktion

Peter Reutter, Thomas Nebe, Karin Hartmann und Reinhard Kattermann

Institut für Klinische Chemie am Klinikum Mannheim
Klinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
Postfach 100023, D-68167 Mannheim

Im Rahmen einer Entzündung steigen in der sogenannten systemischen Phase die Akut-Phase-Proteine (CRP, SAA, Alpha-1-Antitrypsin, u.a.) an, während die Anti-Akut-Phase-Proteine abfallen (Präalbumin, Albumin, Lipoproteine und Transferrin). Hauptverursacher dieser Immunantwort sind vor allem die von aktivierten Monozyten/Makrophagen abgegebenen Zytokine wie Tumornekrosefaktoren und Interleukine. Diese stimulieren einerseits die Synthese der Akut-Phase-Proteine (IL-6), und hemmen andererseits die Synthese der Anti-Akut-Phase-Proteine (TNF-Beta). Im Rahmen einer Studie an Patienten mit akuter Pankreatitis sollte geklärt werden, ob der Lipoproteinabfall in der Akut-Phase mit einer gesteigerten LDL-Rezeptor-Expression auf Leukozyten einhergeht. Mit einem flowzytometrischen Fluoreszenz-Immuno-Assay wurde die LDL-Rezeptor-Expression auf Monozyten, die sich schon im Rahmen der Familiären-Hypercholesterinämie-Diagnostik als geeignete Zellen erwiesen haben, sofort nach der Probenentnahme gemessen. Analysiert wurden die Tage 1, 2, 3, 5 und 8 nach Aufnahme auf die Intensivstation, sowie weiterhin in zwei- bis dreitägigen Abständen bis die Patienten (n=12) auf Normalstation verlegt wurden oder verstorben waren. Neben der LDL-Rezeptor-Expression auf Monozyten wurden Cholesterin, Triglyzeride, Amylase, Elastase, Apo-A1, Apo-B und CRP bestimmt, sowie Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und Differentialblutbild. Trotz der Heterogenität der Patientengruppe zeigte sich zu Beginn der Aufnahme auf die Intensivstation eine Erhöhung der LDL-Rezeptor-Expression auf Monozyten um das 2-4fache der Werte eines Vergleichskollektivs gesunder Probanden (n=16) bei 9 der 12 Patienten. Diese Erhöhung normalisierte sich innerhalb der ersten 7 Tage. Bei 4 Patienten stieg die initiale Rezeptorexpression weiter an, und erreichte Werte von bis zum 5-fachen der Vergleichswerte gesunder Probanden. Die Werte der LDL-Rezeptor-Expression korrelierten nicht oder nur gering mit den Werten von Cholesterin, Triglyzeriden, Alpha-Amylase, Elastase, Apo-A1, Apo-B und CRP. Eine mäßige Korrelation von r = 0,4 zeigte sich mit der absoluten Monozytenzahl. Es ist daher von einer zytokin- und nicht von einer Cholesterin-Spiegel-regulierten LDL-Rezeptor-Expression auszugehen. Diese These muß in weiteren in-vitro Experimenten verifiziert werden.

Strahleninduzierte Mikrokernbildung bei Säuger- und Fischzellinien unter verschiedenen Nährmedienbedingungen

J. Rickert und H.G. Miltenburger

Laboratorium für Mutagenitätsprüfung (LMP), Technische Hochschule Darmstadt, D-64287 Darmstadt

Durchflußzytometrische Messungen zur Bestimmung der strahleninduzierten Mikrokernhäufigkeit bei den Säugerzellinien V79, Balb 3T3 und L929, die an FKS-Anteile des Nährmediums von 2 %, 5 % und 10 % adaptiert waren, wurden mit Messungen an Fischzellinien (D11, RTG-2 und ULF-23HU) verglichen, deren Einsatz als Alternative zu in vivo Toxizitätstests derzeit diskutiert wird. Mit den Fischzellinien gelang eine befriedigende Kultivierung mit FKS-Gehalten unter 10 % allerdings bislang nicht. Als gut dosierbares schädigendes Agens wurde eine Röntgenstrahlendosis von 8 Gy eingesetzt (200 kv, 19mA, 4 mm Al Filter, Dosisleistung 0,7 Gy/Min.). Mikrokerne wurden nach Herstellung einer möglichst reinen Suspension von Kernen/Mikrokernen [Nüsse M. und Kramer J., 1984] mit einem Partec PAS-II Zytometer (DAPI-Anfärbung) erfaßt.

Die V79-Zellen reagierten bei niedrigerem FKS-Gehalt als 10 % mit einer Zunahme der Häufigkeit an Mikrokernen, Balb 3T3-Zellen zeigten in Nährmedien mit unterschiedlichem FKS-Gehalt keine Unterschiede in der Mikrokernhäufigkeit und die L929-Zellen reagierten bei höherem FKS-Gehalt mit der Bildung von deutlich mehr Mikrokernen.

Nach Bestrahlung mit der gleichen Strahlendosis von 8 Gy fanden sich in den Fischzellinien vergleichsweise niedrigere induzierte Mikrokernhäufigkeiten als bei den Säugerzellen. Bei allen drei Zellinien lagen sie z.T. nur geringfügig höher als die Spontanhäufigkeit von ca. 6-14 %.

Die Unterschiede bei der Mikrokern-Induktion in den drei Säugerzellinien zeigen, daß die "geeignete" Zellinie unter "geeigneten" Nährmediumbedingungen eingesetzt werden muß, um relevante Ergebnisse zu erzielen. Die schwache zytogenetische Reaktion der Fischzellen weist auf eine höhere "Resistenz" gegenüber ionisierender Strahlung dieser somatischen Zellen aus aquatischen Vertebraten mit einem der niedrigeren Körpertemperatur angepaßten Stoffwechsel hin. Auch die längeren Zellzykluszeiten der Fischzellen (ca. 50 h) im Vergleich zu denen der Säugerzellen (12-18 h) könnten die Ausprägung des zytogenetischen Schadens beeinflussen.

COMPARISON OF FLOW CYTOMETRIC STUDIES ON DRUG TRANSPORT WITH MDR1 M-RNA LEVEL IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

E. Roller, F. Grünebach, U. Griese, B. Klumpp, J. Krause and K. Schumacher

Robert-Bosch Hospital, Auerbachstr. 110, 70341 Stuttgart

Drug resistance is still the major cause of treatment failure in hematological malignancies. The classical multidrug resistance is associated with an increased drug efflux and mediated by the overexpression of the MDR1 gene which codes for a 170 KD plasma membrane glycoprotein termed P-170.
In gradient-separated peripheral blood samples MDR1 mRNA was quantified using a competitive PCR assay. In the multicolor flow cytometric system we analysed P-170 expression with the mAB MRK16 directed towards an extracellular epitope of P-170 not cross-reacting with MDR2/3 glycoprotein.
Additional we performed functional measurement of the P-170 efflux pump with the fluorescence dye rhodamine 123 (R123).
In our study we identified MRK16 positive cells which failed to efflux R123, nevertheless we found good correlation between quatitative PCR and rhodamine assay.
Detection of MDR1 overexpression may also serve as a marker for minimal residual disease.

Supported by the Robert-Bosch Foundation

Underreplication in the Drosophila ovary

Helmut Zacharias

Windmühlenberg 6, D-24631 Langwedel

Fax: +(0)431-314051, Tel: +(0)4329-1272

Underreplication characterizes the growth of many nuclei in somatic tissues from different Diptera (e.g. 1). The novel karyotype of **Drosophila nasutoides** has the advantage that 62% of the genomic DNA is contained in a single chromosome (2, 3). In the present study, this unusual chromosome 4 was shown to be underrepresented in the nuclei of the follicular epithelium as well as in the 15 nurse cell nuclei of the follicle.

The trigger for permanent underreplication becomes effective with endocycle 1 in epithelium and with cycle 1 or 2 in nurse cells. Nuclei of the latter were investigated as polyneme endometaphases and, later, during multiplication of their polyploid euchromatic elements. The maximum number of endoreplications by euchromatin DNA was 5 in the epithelium and 11 in nurse cells. The extremely high DNA content of the latter is similar to that in larval salivary glands. Data were obtained by 2-parameter records from single nuclei with a scanning microphotometer. Replication analysis was based on the 4C DNA-content of metaphases (4) and supported by our **SIMREP** program (5).

Selective endoreplication demonstrates that nurse cells have lost any generative capacity. They are the ultimate cells to leave the germ line and are subject to terminal differentiation in female ontogeny.

Supported by the DFG and by Helia Richter.

REFERENCES:

(1) Zacharias H 1984, Chromosoma **89**: 263-273.
(2) Zacharias H 1986, Roux's Arch Dev Biol **195**: 378-388.
(3) Zacharias H 1990, Chromosoma **99**: 24-35.
(4) Zacharias H 1993, Genome **36**: 294-301.
(5) Zacharias H & Neumann P 1989, Computer Meth Progr Biomed **28**: 235-242.

Zum Einfluß von ß-Carotin, Vitamin C und E auf orale Dysplasien

J. Zöller[1], M. Flentje[2], H. Maier[3], I.A. Born[4], H. Osswald[5]

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

[2]Radiologische Universität Klinik (Direktor: Prof. Dr. Dr. M. Wannenmacher)

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

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

[5]Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

Erfahrungsgemäß tritt beim Mundhöhlenkarzinom eine hämatogene Fernmetastasierung relativ spät auf. Für die ungünstige Prognose ist meist das loko-regionäre Rezidiv bestimmend. Daneben werden zunehmend Zweitkarzinome beobachtet. Diese Karzinome entstehen in der Regel auf dem Boden von dysplastischen Schleimhautveränderungen.

Ziel der Studie war es, den Einfluß des Provitamins A ß-Carotin sowie der antioxidativ-wirksamen Vitamine C und E auf orale Dysplasien zu untersuchen.

Im Rahmen einer klinischen Pilotstudie an 12 Patienten nach präoperativer Chemotherapie und Operation sowie an 12 Patienten mit Leukoplakien konnte mit einer niedrig dosierten Polyvitaminprävention/therapie mit beta-Carotin, Vitamin C und E ein "Downgrading" von Dysplasien erzielt werden.

Hierbei waren eine Reduktion erhöhter zellkinetischer Parameter, wie des S-Phasenanteils oder der mittleren NOR-Zahl pro Zellkern, eine Abnahme des prozentualen Anteils der Mikronuklei und eine "Normalisierung" der Zytokeratin-Genexpression zu beobachten. Bei Sistieren des Alkohol- und Tabakabusus war der Vitaminneffekt auf eine Redifferenzierung der oralen Schleimhäute ausgeprägter als bei weiterer Zufuhr dieser Noxen.

Firmenbeiträge

Zellzählung mit Koinzidenzkorrektur - Der neue COULTER® Counter Z1

Dipl.-oec. Jörg Stucki

Coulter Electronics GmbH
Europark Fichtenhain B13
47705 Krefeld

Die Zellzahl ist in vielen Bereichen, wie z. B. der Pharmazie, der Zellbiologie, der Medizin- oder auch der Meeresforschung ein wichtiges Beurteilungsmerkmal.

Der neuen COULTER® Counter Z1 ist deshalb speziell für die Anforderungen in der Zellanalytik entwickelt. Exakte Zählung, präzise Ansaugvolumina, automatische Arbeitsabläufe und einfachste Bedienung kennzeichnen das System.

Das Z1 zählt Zellen in einem Größenbereich von 1 - 120 µm. Mit einer Breite von nur 26,5 cm paßt er auch in das kleinste Labor.

Die in das System integrierte Koinzidenzkorrektur garantiert eine exakte Zählung der Zellen und verhindert eine Verfälschung der Zellzahl durch Dublettenmessung z. B. bei hoch konzentrierten Suspensionen. Ein neues quecksilberfreies Meßsystem sorgt für genaueste Ansaugvolumina, die z. B. für exakte Zellkonzentrationsbestimmungen notwendig sind.

Vollautomatische Setup und Kalibrationsroutinen machen das Z1 sehr leicht bedienbar. Der Anwender schaltet ein und das Gerät ist meßbereit. Das Z1 kalibriert sich auch bei Kapillarwechseln automatisch.

Die minimale Ansaugmenge beträgt 0,1 ml, so daß auch geringste Probenmengen für eine Messung ausreichen. Ein geschwindigkeitsvariabler Rührer garantiert z. B. bei größeren Zellen eine homogene Suspension. Der Anwender erhält seine Meßwerte entweder als absolute Zellzahl oder als Zellkonzentration (Zellzahl/ml). Die Datenausgabe erfolgt über ein separates LCD-Display oder automatisch über einen anschließbaren Drucker.

OptiLyse- das neue Lysereagenz von Immunotech

André von Agthoven

Department Anticorps
Immunotech SA, Marseille, France

In heutigen Routinelabors, die moderne Durchflußzytometer und direktkonjugierte monoklonale Antikörper benutzen, ist häufig die Methode, die zur Lyse von Vollblutproben verwandt wird, der Hauptfaktor, der Probleme und Variationen in den Ergebnissen von Blutanalysen bringt. Immunotech hat neue spezielle Lyseverfahren entwickelt, die mehrere Vorteile gegenüber bestehenden Methoden aufweisen. Sie zeigen gut reproduzierbare Ergebnisse, auch bei problematischen Blutproben. Die Leukozytenpopulationen lassen sich sauber voneinander abtrennen und gut konservieren; außerdem sind sie sehr einfach zu benutzen.
Um optimale Ergebnisse zu erzielen, haben wir unterschiedliche Reagenzien für die drei meistbenutzten Durchflußzytometer der großen Hersteller Coulter, Ortho und Becton Dickinson ausgearbeitet, die auf die speziellen technischen Eigenschaften der einzelnen Geräte abgestimmt sind (OptiLyse C für Coulter, OptiLyse B für Becton Dickinson und Ortho).
Beide Lysesysteme können mit IOTest Antikörpern benutzt werden, aber auch in einem zeitsparenden "no-wash" Protokoll. Dies ist ein deutlicher Vorteil, da Waschschritte zum Verlust von Zellen führen und dadurch Analyseergebnisse verfälschen können.
Um Probleme mit unspezifischer Fluoreszenz durch nicht entfernte Antikörper zu vermeiden, hat Immunotech eine neue Produktlinie mit dem Namen OptiClone entwickelt, die auf ein "no-wash" Verfahren abgestimmt ist. Die OptiClone-Linie enthält verschiedene, fertig gemischte Antikörperpaare, die jeweils direkt gekoppelt sind.
OptiLyse und OptiClone werden zusammen als OptiSystem vermarktet.

CARL H. HILGERS Technisches Büro Hauptstraße 82 53639 Königswinter
TEL.: 02223 - 22268 FAX.: 02223 - 27594

Abstrakt über **DNA Zytophotometer CYDOK** für Heidelberger Zytometrie Symposium 1993.

Die Bedeutung des Zellkern-DNA-Gehaltes für die Tumordiagnostik wurde bereits 1936 in der grundlegenden Arbeit von T.Casperson erkannt. Aneuploidie ist heute international als Neoplasie-Marker akzeptiert. (Rosenthal, Analytical and Quant.Cytologie, 1990). Aufgrund nachgewiesener prognostischer Relevanz der DNA Histogramm-Parameter kann die Therapie unter gleichzeitiger Berücksichtigung des Stadium (TNM System) optimiert werden.
CYDOK wurde als interaktives DNA Zytophotometer auf der Basis eines handelsüblichen IBM-kompatiblen PC konzipiert. Das Gerät besteht aus diesem PC sowie einer Schwarz-Weiß Videokamera mit linearer Kennlinie, die auf dem Mikroskop montiert ist. Ein Tintenstrahldrucker oder alternativ ein Laser Drucker dient zur Erstellung des Histogramms und zum Ausdruck von Zellkern-Bildern.
Die Messung erfolgt densitometrisch, wobei nicht nur die Dichte des Feulgen gefärbten Kerns sondern auch seine Größe in einem 2-stufigen Algorithmus erfaßt werden. Die mit der Maus angeklickten Kerne werden markiert und die Meßwerte gespeichert

Das Besondere an CYDOK besteht darin, daß das Gerät einmal gefundene Meßwerte nicht nur in Zahlen umwandelt, sondern für häufig notwendige Nachkontrollen die Zellkernbilder im Speicher behält. Sie können auf Wunsch aufgerufen werden und in diesem Stadium noch gelöscht oder ihre Zuordnung korrigiert werden. Dies wird durch eine relativ aufwendige Bildverarbeitungskarte im PC erreicht.
Diese Bildverarbeitungskarte erlaubt es, sowohl die Messung, als auch in der Routine immer wieder vorkommende Bildbearbeitungen, wie Trennen und Verbinden, im Life-Bild vorzunehmen.
Die Plausibilität einer Messung kann jederzeit durch Aufrufen des Histogramms kontrolliert werden. Zum Abschluß wird das Histogramm mit den dazugehörigen Daten auf dem Bildschirm oder auf dem Drucker dokumentiert, wobei das Bild-Tableau mit den aufgereihten gemessenen Kernen ebenfalls gedruckt werden kann.
CYDOK arbeitet mit einer Bildfrequenz von 60 Herz und liefert ein ruhiges, klares und helles Bild.
Das in Mikroskop-Photometern störende Streulicht wird über Software korrigiert
Die Meßzeit pro Aussstrich beträgt je nach Zustand des Präparates ca 15 - 30 min für 100 Diagnose- und ca 20 Referenzkerne.
Optionell kann CYDOK für morphometrische Messungen, Rezeptoranalyse, AgNOR Quantifizierung oder normale Bildanalyse eingesetzt werden. Auch existiert ein Programm zur Speicherung, Verbesserung, Wiedergabe und Archivierung mikroskopischer- und Makroskopischer Bilder.

medac: News auf dem durchflußzytometrischen Markt

M. Steinbrecher

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandtstr. 3
D-2000 Hamburg 36

Seit 1970 bietet medac Diagnostika polyklonale Antikörper und Lektine für immunologische Methoden an. Seit 2 Jahren bieten wir speziell für die Durchflußzytometrie entwickelte Reagenzien an. Unsere große Palette von direkt konjugierten Antikörpern umfaßt FITC-, PE- und TRI-COLOR-Konjugate.

TRI-COLOR haben wir vor 2 Jahren als Farbstoff für die Dreifarb-Analyse eingeführt. Hierbei handelt es sich um ein Tandem-Konjugat aus Phycoerythrin und Cyanin 5, welches bei 488 nm optimal anregbar ist und bei 670 nm im Rotbereich emittiert. Damit ist TRI-COLOR neben FITC- und PE-Konjugaten zur Dreifarb-Analyse prädestiniert. Die Kompensation zu PE beträgt < 2 %. Hierdurch ist es möglich, seltene Antigene eindeutig zu differenzieren und auch gleichzeitig drei Farbparameter zur eindeutigen Datendiskriminierung zu bestimmen und zu nutzen.

Aktuell bieten wir 5 sekundäre Antikörper und 25 monoklonale Antikörper direkt TRI-COLOR-konjugiert gegen humane und Maus-Antigene an. Diese Palette wird ständig ausgebaut und wir werden einige neue Highlights kurz beleuchten können. Neben diesen Spezialpräparaten bieten wir viele FITC- und R-PE-konjugierte Produkte in hoher Qualität und zu einem fairen Preis an.

medac Diagostika als Gesellschaft für klinische Spezialpräparate wird in Zukunft weiter dazu beitragen, durch günstige Produkte und durch Spezialpräparate die Routine und die Forschung zu fördern und näherzubringen.

Separation and Analysis of Rare Cells by MACS Magnetic Cell Separation in Combination with Flow Cytometry.

Pflüger, Eckhard; Mornhinweg, Markus; and Miltenyi, Stefan

Miltenyi Biotec GmbH, Friedrich-Ebert-Straße 68,
51429 Bergisch Gladbach

The ability to isolate highly purified cell subsets by MACS magnetic cell separation has opened a new field of research for experiments with homogenous cell fractions. We developed a new magnetic staining and separation protocol with MACS for isolating rare cell subsets out of heterogenous populations. The cells are labeled with antibodies and magnetic microbeads and separated in a rare cell separation column. The staining and separation procedure is fast and simple, all reagents and materials are ready for use. The new reagent combination and separation devices for the isolation of rare cells enables us, starting with cell populations with frequencies of 10^{-4} to 10^{-5} positive cells, to enrich cell fractions with purities of 30 to 90% with recoveries of 50 to 70%. Isolated cells are morphologically intact and can further be characterized by flow cytometry or functional biological assays.

ImmunoCount System der flußzytometrischen Analyse

Dr. Detlef Kühne

Ortho Diagnostic Systems, Karl-Landsteiner-Str. 1, D-69141 Neckargemünd

Die durchflußzytometrische Analyse im Bereich der klinischen Routine wirft bisher das Problem der Absicherung der Meßdaten auf. Dazu gehören die korrekte Anzahl der gemessenen Zellen pro µl, deren Fluoreszenzfärbungen sowie die interne Qualitätskontrolle.

Ortho stellt ein neues System vor, das aus folgenden Komponenten besteht: OrthoCount, OrthoTrio Reagents und ImmunoCount Software. Mit dem ImmunoCount Kit kann das Instrument kalibriert und mit 3 verschiedenen Kontrollen auf Präzision und Linearität der Messungen überprüft werden. Die OrthoTrio Reagents enthalten die für die immunologischen Untersuchungen an Lymphozyten notwendigen Antikörper CD3/CD4/CD8/CD16/CD19 und die entsprechenden isotypischen Kontrollen. Durch die Mischung von CD3/4/8 und CD3/16/19 wird eine Meßredundanz erreicht, die als interne Qualitätskontrolle mit verwendet wird. Mit der ImmunoCount Software erfolgt die Steuerung des Ortho Cytoron Absolute sowie die FCS-Daten-Abspeicherung und Dokumentierung. 5 automatische und ein Livegate gestatten eine komfortable Meßdatenverarbeitung von 5 Meßparametern.

Interpretatorische Unsicherheiten bei der Quantifizierung cytotoxischer Effekte in *in vitro* Zellkultursystemen

J. Schärfe

Schärfe System GmbH, D-72760 Reutlingen, Emil-Adolff-Str. 14

Der Einsatz von Zellmodellen in der biomedizinischen Forschung und Routine hat in den letzten Jahren rasant zugenommen. In vitro Testsysteme werden mittlerweile breit eingesetzt, z.B. zum toxikologischen Screening neuer Chemikalien und Pharmaka. Die Unsicherheiten bei der Bewertung von Versuchen auf der Basis von Zellmodellen hat jedoch dazu geführt, daß viele Modelle keine allgemeine toxikologische Anerkennung finden. Ein wesentlicher Grund dafür liegt in der mangelhaften Standardisierung der Systeme. In der Regel sind weder die Zellsysteme (Zellen, Kulturbedingungen, etc.) noch die Versuchsbedingungen, noch die Durchführungsrichtlinien für die unterschiedlichen funktionellen Assays standardisiert. Dies führt dazu, daß beschriebene Tests in verschiedenen Laboratorien nicht reproduziert werden können.
Anhand konkreter Beispiele wird auf die interpretatorischen Unsicherheiten bei der Quantifizierung cytotoxischer Effekte an Zellsystemen (Vitalität, Proliferation) eingegangen. Die Ergebnisse einiger repräsentativer Testsysteme mit unterschiedlichem funktionellen Ansatz (z.B.: Influx von Farbstoffen, metabolische Antwort, DNA-Vermehrung, Zellzählung und Zellanalyse) werden in ihrer Aussage miteinander verglichen. Fehlerquellen und Möglichkeiten zur Standardisierung werden diskutiert.