Kurzfassung der Beiträge

7. Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 20. bis 22. Oktober 1994

Tagungsort
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Kommunikationszentrum

Organisatoren
K.-J. Hutter, S. Meuer, M. Stöhr, M. Trendelenburg

Vorträge

Immunphänotypische Parameter als Basis einer HIV-Klassifikation erfassen den natürlichen Verlauf der Erkrankung

Bauer R[1], Böhm I[1], Winkler[2], Kreuter H[2]

[1]Dermatologische Klinik der Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn
[2]Wissenschaftliches Institut der Ärzte Deutschlands (WIAD e.V.)

Das Hauptcharakteristikum der HIV-Infektion ist der progressive Abfall der CD4+ T Zellen. Allerdings sind prognostische Einschätzung und therapeutische Strategien, die nur auf diesem Parameter basieren nicht ausreichend zur Charakterisierung HIV-infizierter Patienten.
Wir versuchten den natürlichen Verlauf der HIV-Infektion auf der Basis flowzytometrisch analysierter T Lymphozyten bei insgesamt 191 HIV-Patienten in verschiedenen Stadien ihrer Erkrankung zu ermitteln. Zusätzlich registrierten wir die absolute Zahl der Granulozyten und Leukozyten. Die statistische Analyse wurde mit dem Wilcoxon Test durchgeführt. Der Vergleich zwischen klinischem Status und immunologischen Befunden ermöglichte es uns, die Patienten in vier immunologisch signifikant unterschiedliche Kategorien zu klassifizieren ($p<0,05$):

	CD4/CD8	CD4+/µl	Leukozyten/µl
Stadium I	> 1,0	> 400	> 4000
Stadium II	< 1,0	> 400	> 4000
Stadium III	< 1,0	< 400	> 4000
Stadium IV	< 1,0	< 400	< 4000

Die Progression von der asymptomatischen HIV-Positivität bis zum Vollbild AIDS entwickelt sich graduell in charakteristischer Weise: Anstieg der CD8+ Lymphozyten, Abfall der CD4+ Zellen begleitet von einem parallelen Rückgang der CD8+ Lymphozyten und schließlich Abfall der Granulozyten, nachdem die CD4+ Zellen unter 50/µl abgesunken waren und die CD8+ Lymphozyten bei 350/µl lagen. Da der immunologische Status durch die flowzytometrische Analyse gut mit dem klinischen Bild korreliert, war es möglich, den klinischen Verlauf durch vier immunologische Stadien zu quantifizieren.
Durch Einsatz weiterer Oberflächenmarker erhielten wir zusätzlich Einblick in das pathogenetische Geschehen der HIV-Infektion. Im Gegensatz zu HIV-negativen Probanden waren CD3+ HLA-DR+ Zellen in allen Stadien vermehrt, mit einem Peak dieses Wertes im Stadium II. HLA-DR wurde hauptsächlich auf CD8+ T Zellen exprimiert, interessanterweise sogar vor der zahlenmäßigen Vermehrung dieser Population im peripheren Blut. Außerdem kam die Expansion von CD8+ durch einen Anstieg des CD3+ CD8+ CD11b- Subsets zustande. Teilweise trugen die CD8+ Zellen δTCS1+ γδTCR auf der Oberfläche.
Bei CD4+ T Lymphozyten kam es zuerst zur Reduktion der CD4+ CD7+ Subpopulation. Obwohl die CD4+ Zellzahl anfangs noch normal war, zeigte sich eine enorme Verminderung von CD4+ CD45RO+, dagegen waren CD4+ CD45RA+ Zellen vermehrt.
Neben der immunologischen Klassifizierung erbrachte die flowzytometrische Analyse den Hinweis, daß parallel zur CD4-Defizienz die Krankheit durch eine chronische Immunproliferation über lange Zeit getragen wird.

Supported by grant of Bundesgesundheitsministerium Bonn

Monitoring von zustandsabhängigen Leistungen mikrobieller Populationen in Bioreaktoren

Bley, Th., Müller, S., Lösche, A.

Universität Leipzig
Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
Abteilung Biotechnologie
Permoserstraße 15, D-04318 Leipzig

Flußzytometrische Untersuchungen der mikrobiellen Populationsdynamik in Bioreaktoren gewinnen zunehmend an Bedeutung für die Steuerung von Prozessen zur Synthese von ökologisch unbedenklichen Produkten in der Biotechnologie.
Es wird gezeigt, daß die Flußzytometrie ein vorzügliches Monitoringsystem ist, das Daten mit einem hohen Informationsgehalt liefert und damit eine Systemanalyse erlaubt, die auf einem strukturierten, segregierten Modellkonzept beruht.

Es wird nachgewiesen, daß die gewünschten mikrobiellen Leistungen an bestimmte Zellzustände gekoppelt sind. Eine optimale Steuerung dieser Prozesse muß also ausgehend von zytometrischen Messungen für diese Zellzustände günstige Wachstumsbedingungen schaffen.
Der Zugang zur mathematische Modellierung auf der Grundlage von Delay-Differentialgleichungen wird diskutiert.

HIV-assoziiertes Kaposi-Sarkom: flowzytometrische Analyse immunbiologischer Effekte von Interferon α

Böhm I, Bauer R
Dermatologische Klinik der Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn, Germany

Obwohl Interferon α (IFNα) häufig zur Behandlung des HIV-assoziierten Kaposi-Sarkom (KS) verwendet wird, sind die pharmakologischen Mechanismen der Regressionsinduktion weitgehend unbekannt. Erstaunlicherweise werden die immunologischen Veränderungen, die bei KS-Patienten unter einer Therapie mit IFNα auftreten, wenig beachtet. Dieses ist in der Tat erstaunlich, da IFN u.a. aufgrund seiner immun-modulatorischen Eigenschaften beim AIDS-assoziierten KS eingesetzt wurde.

Vor dem Hintergrund früherer Berichte, die auf die Bedeutung immunologischer Parameter bei KS-Patienten hingewiesen haben, führten wir ein Monitoring verschiedener hämatologischer und immunologischer Parameter unter besonderer Berücksichtigung der CD3+ HLA-DR+ Zellen als follow-up über einen langen Zeitraum zusätzlich zur klinischen Beobachtung beim IFNα-behandelten HIV- KS durch. 3 bis 18 x 10^6 IU rekombinantes humanes IFNα 2a wurde in verschiedenen Regimen appliziert. Wir registrierten Leukozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, CD4+ T Zellen, CD8+ Lymphozyten und CD3+ HLA-DR+ Zellen während der Therapiephasen und in Therapie-freien Intervallen. Unter der IFN-Behandlung kam es zum Absinken der meisten gemessenen Absolutwerte der o.g. Parameter. Der stärkste Abfall konnte unter IFN-Therapie bei Granulozyten und CD3+ HLA-DR+ Zellen beobachtet werden. Der klinische Aspekt des KS zeigte Verbesserung während der IFN-Applikation und Verschlechterung nach Absetzen dieser Behandlung. In gleicher Weise verhielten sich die Granulozyten und aktivierten T-Lymphozyten, die in den Absolutwerten abfielen, wenn das KS zurückging, und anstiegen, wenn das KS exazerbierte.

Diese Beobachtung läßt vermuten, daß CD3+ HLA-DR+ Zellen ein geeigneter Parameter für das Monitoring des HIV-assoziierten KS unter IFNα–Behandlung ist. Außerdem scheinen aktivierte T Lymphozyten für die KS-Proliferation *in vivo* ebenfalls verantwortlich zu sein wie *in vitro*, was kürzlich gezeigt werden konnte (Barillari et al 1992, J Immunol 149, 372). Der Abfall der Granulozyten könnte möglicherweise durch Beeinflussung desselben hämatopoietischen Wachstumsfaktors erklärt werden, der nicht nur die Anzahl zirkulierender Neutrophile sondern auch die KS-bedingte Angiogenese bei HIV steuert.

Wirkungsmechanismus von Methotrexat: Experimenteller Hinweis für eine Blockade der Bindung von Interleukin 1β mit dem Interleukin 1 Rezeptor auf Zielzellen

BRODY M, BÖHM I, BAUER R

Dermatologische Klinik der Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn

Methotrexat (MTX) erzielt ausgezeichnete therapeutische Erfolge in der Behandlung verschiedener inflammatorischer und autoimmunologischer Erkrankungen. Dabei ist bekannt, daß viele dieser Krankheiten mit einer Überproduktion von Interleukin 1 (IL1) einhergehen. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß MTX keinen Einfluß auf die IL1-Synthese besitzt, deshalb konzentrierten wir uns auf die Fähigkeit des MTX mit der Bindung von IL1β zum IL1-Rezeptor zu interferieren. Die Experimente wurden mit Hilfe der FACS-Analyse und einer rekombinanten humanen Zytokin-Sonde auf Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten durchgeführt. MTX führte zu einer erstaunlichen Verminderung der Bindung von IL1β zum IL1-Rezeptor auf peripheren Blutzellen, dagegen kam es mit Methylprednisolon und Indometacin in der Versuchsanordnung zu keiner Inhibition. Die Bindungsstudien ergeben einen direkten experimentellen Hinweis dafür, daß MTX die Bindung von IL1β zu seinem Rezeptor auf den Zielzellen blockiert. Der inhibitorische Effekt des MTX war dosisabhängig. Ein exzessiver Überschuß von IL1β machte die Inhibition der Zytokinbindung durch MTX zunichte. Wir konnten außerdem zeigen, daß MTX weder die Integrität des IL1-Rezeptors noch die der Zielzellen beeinträchtigt. Unsere Resultate demonstrieren, daß MTX die IL1β-IL1-Rezeptor-Interaktion blockiert. Deshalb ist MTX ein weiterer IL1-Inhibitor und ein klinisch wirksames Anticytokin.

DNA-GEHALT IM VERGLEICH ZUR INTRAOPERATIVEN PLEURALAVAGE ALS PROGNOSEFAKTOR BEIM BRONCHIALKARZINOM

J.Buhr[1], R. Deisz[1], K.H. Berghäuser[2], C.Kelm[1], T. Zimmermann[1], T. Dreyer[2]
[1]Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie und [2]Institut für Pathologie der JLU Gießen

In unseren vorherigen Studien zeigten wir die prognostische Bedeutung des zytologischen Tumorzellnachweises in der intraoperative Pleuralavage beim Bronchialkarzinom (1).
Jetzt wollten wir andere Pronosefaktoren beim Bronchialkarzinom feststellen.
Deshalb untersuchten wir 30 Präparate von kurativ resezierten Bronchialkarzinomen, bei denen eine intraoperative Pleuralavavge durchgeführt wurde. Wir untersuchten formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte, die nach Feulgen gefärbt wurden. Der DNA-Gehalt wurde mit dem IBAS-Kontron-System berechnet. 300 Tumorzellen pro Schnitt wurden untersucht, Leukozyten galten als Referenzzellen.
Wir fanden einen diploiden Status in 15 Fällen. Es fand sich ein signifikant höherer diploider Status im Stadium I eines Bronchialkarzinoms (pT1N0, pT2N0) (n=17, diploid n=13), als in den höheren Tumorstadien. ($p<0,01$, Stadium I vs. Stadium II und III). Wir fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen DNA-Gehalt und Histologie, pT-Stadium und Lymphknotenbefall. Wenn der DNA-Gehalt mit dem zytologischen Befund der intraoperativen Pleuralavage verglichen wurde, zeigte sich ein signifikant höherer Anteil von aneuploiden Fällen, wenn die Pleuralavage bei pT1- und pT2-Bronchialkarzinomen positiv war (n=22, $p<0,05$). Aber im Gegensatz zur intraoperativen Pleuralavage fand sich in unserer jetzigen Untersuchung keine signifikante Relevanz für die Prognose abhängig vom Ploidiestatus. Jedoch verstarben die meisten Patienten im Stadium I, wenn ein aneuploider DNA-Status gemessen wurde.
Zusammenfassend kann man sagen, daß die intraoperative Pleuralavage ein guter prognostischer Faktor beim Bronchialkarzinom ist. Die Messung des DNA-Gehaltes scheint ein zusätzlicher Prognosefaktor, besonders in den frühen Tumorstadien, zu sein.

1.: Buhr, J. et al.: Cancer 84 (1990) 1801-1804.

HUMANE B ZELL LYMPHOME: EINGLIEDERUNG IN DIE NORMALE B ZELLDIFFERENZIERUNG DURCH ZYTOMETRISCHE ANALYSE

Max D. Cooper
Universität von Alabama in Birmingham und Howard Hughes Medical Institute
Birmingham, Al 35294

Wir haben eine Kombination von Zelloberflächen- und zytoplasmatischen Markern benutzt, um die Differenzierung menschlicher, hämatopoietischer Stammzellen zu B Lymphozyten in Abhängigkeit des Lebensalters zu untersuchen. Während in der frühen Embryogenese die B Zellentwicklung ein multifokaler Prozeß ist, übernimmt diese Rolle in der späteren Embryogenese das Knochenmark. Unreife und reife B Lymphozyten werden im Knochenmark in jedem Lebensalter gefunden, d.h. B Lymphozyten entstehen das ganze Leben lang. In der Ontogenese akumulieren B Zellen eines bestimmten reifen Phänotyps im Knochenmark bis sie im Erwachsenen die vorherrschende Population werden. Zellen aller Differenzierungsstadien können durch Zellsortierung isoliert werden, um die Lymphozyten-spezifische Genexpression und die Zusammensetzung und Funktion der Immunglobulin- und anderer Membranrezeptoren zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sprechen für ein Modell der menschlichen B Zellentwicklung bei dem die frühen Stadien durch andere Rezeptoren als Immunglobuline regulliert werden, preB-Immunglobulne eine späte aber wichtige Rolle spielen, und eine große Zahl Antigen-erfahrener B Zellen zum Knochenmark zurückkehrt. Unsere Untersuchungen tragen dazu bei, B Zell Lymphome in den Verlauf der B Zelldifferenzierung einzuordnen und Rückschlüsse auf ihre Pathgenese zu ziehen.

Hochauflösende Weitfeld-Lichtmikroskopie: Ihr Potential für die Erforschung der Kernstruktur

C. Cremer
Institut für Angewandte Physik der Universität Heidelberg,
Albert-Überle-Str. 3-5, D-69120 Heidelberg

Experimentelle Beobachtungen und theoretische Überlegungen weisen darauf hin, daß die individuellen Chromosomenterritorien in menschlichen Zellkernen spezifische dreidimensionale Strukturen ausbilden[1,2,3]. Um die vorausgesagte, nichtzufällige, geordnete Verteilung von aktiven und inaktiven Genen in einem Chromosomenterritorium im Einzelnen zu testen, wird selbst die beste mit einem konventionellen konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop erreichbare Auflösung nicht ausreichen. Diese Grenze kann jedoch überwunden werden, indem zum Beispiel die implizite Voraussetzung der Abbe-Theorie eliminiert wird, daß nur ein einziges Mikroskopobjektiv verwendet wird für die punktweise, kohärente Beleuchtung und Detektion des Objektes (4,5). Eine erhöhte räumliche, dreidimensionale Auflösung in allen Richtungen kann durch zusätzliches Drehen des Objekts um geeignete Winkel erzielt werden (6). Es wird erwartet, daß derartige neue Ansätze eine Weitfeldmikroskopie dicker Objekte (Zellkerne) mit einer 3D-Auflösung bis hinunter zu etwa 1/10 der einfallenden Wellenlänge ermöglichen.

References

1) T. Cremer et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 58 (1993), in press. 2) Zirbel et al, Chromosome Research 1: 92 (1993). 3) C. Cremer et al., submitted (1994). 3) S. Hell et al., Optics Lett. 19: 222 (1994). 4) S. Hell et al., Appl. Phys. Lett. 64: 1335 (1994). 6) J. Bradl et al., J. Microsc. 168: 147 (1992).

Farbstoffauschlußtest und elektrisches Widerstandsmeßverfahren: äquivalente Verfahren zur Bestimmung toter Zellen?

Elmar Endl, Pia Steinbach, Jürgen Schärfe, Sonja Fickweiler, Klaus Wörle und Ferdinand Hofstädter
Institut für Pathologie, Universität Regensburg, D-93042 Regensburg, Schärfe System, D-72760 Reutlingen

Der Zelltod ist gewöhnlich mit einem Integritätsverlust der Zellmembran verbunden. Der Ausschluß polarer Farbstoffe wie Propidiumjodid (PI) ermöglicht so die Unterscheidung lebender von toten Zellen. In ähnlicher Art und Weise erlaubt eine Zellvolumenbestimmung mittels elektrischem Widerstandsmeßverfahren die Differenzierung vitaler von toten Zellen. Das Meßverfahren basiert auf der Bestimmung des Elektrolytvolumens das von einer Zelle verdrängt wird. Dieses wiederum ist von der Integrität der Plasmamembran abhängig. In dieser Arbeit zeigen wir, daß beide Methoden, trotz des prinzipiell ähnlichen Ansatzes zur Detektion toter Zellen, zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Eine Permeabilisierung der Zellmembranen zweier verschiedener Blasenkarzinom-Zellinien, RT4 und J82, wurde durch die Anwendung von Ultraschallstoßwellen erzielt. Die Anteile initial vitaler Zellen wurden sowohl durchflußzytometrisch mittels PI - Fluorescein-Diazetat - Doppelfärbung als auch mit dem CASY I - Zellanalysegerät bestimmt. Die CASY-Messungen beschallter RT4 Zellen (Suspension) ergaben eine im Vergleich zu den durchflußzytometrischen Ergebnissen statistisch signifikant kleinere Fraktion von Zellen mit verringerter Membranintegrität. Zellsortierung und mikroskopische Analyse zeigten, daß die PI positiven RT4 Zellen morphologisch intakt waren. Im Gegensatz hierzu handelte es sich bei PI positiven J82 "Zellen" um nackte Kerne, teilweise mit deutlichen Anzeichen nukleärer Schädigung. Hier fand sich eine gute Übereinstimmung der CASY Messungen mit der durchflußzytometrischen Auswertung. Um die Anzahl der endgültig überlebenden Zellen zu ermitteln wurden Wachstumskurven erstellt und mit den Ergebnissen der Vitalitätstests verglichen. Die Anzahl der überlebenden Zellen war noch deutlich geringer als die mit dem PI Ausschlußtest bestimmte Fraktion initial vitaler Zellen.

Vergleich proliferationskinetischer Parameter an Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes

Gilbertz, K.-P., *Sendler, A., *Fink, U. & D. van Beuningen

Institut für Radiobiologie, Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr, München; *Chirurgische Klinik und Poliklinik, Technische Universität München

Die Kenntnis der proliferationskinetischen Eigenschaften von Tumoren erlangt immer größere Bedeutung für Prognose und Therapie. Wir haben deshalb begonnen, die Proliferationskinetik von Oesophagus- und Magentumoren durch Messung verschiedener Parameter zu bestimmen. Durch den Einbau von Bromdesoxyuridin in die DNA *in vivo* kann, neben den üblichen Parametern der DNA-Messung, durch 2-Parameter-Analyse die Größe der S-Phase-Fraktion (labeling index: LI), die Länge der S-Phase (T_S) und daraus die potentielle Tumorverdoppelungszeit (T_{pot}) nach Begg (1985) berechnet werden, während durch Markierung des PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und des Ki-67-Proteins Zellen im aktiven Zellzyklus (G_1, S, G_2/M) erkannt werden können. Alle drei Parameter geben somit ein Maß für die Größe der Wachstumsfraktion in einem Tumor.

Zur BrdU-Injektion, Excision des Tumors und klinische Parameter siehe Sendler et al. (dieses Symposium). Die Messung erfolgte durchflußzytometrisch nach Gegenfärbung der DNA. Die Ergebnisse der 2-Parameter-Analysen (LI von BrdU, PCNA und Ki-67; T_{pot}), aber auch Probleme bei der BrdU/DNA-Analyse mit unerwartet hohen LI bei diploiden G_1-Zellen und sehr niedrigen Werten für T_S, sowie bei der Messung sehr langsam wachsender Zellpopulationen oder bei sehr kleinem BrdU-LI werden vorgestellt. Unterschiede in den verschiedenen LI werden diskutiert.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE VON S-PHASE UND PLOIDITÄT BEIM NODAL-NEGATIVEN MAMMMAKARZINOM

N. Harbeck, E. Schüren, P. Ziffer, L. Pache, M. Schmitt, Ch. Thomssen, F. Jänicke, P. Dettmar*, W. Nathrath* und H. Graeff.
Frauenklinik und *Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technische Universität München.

Die Evaluierung neuer Prognosefaktoren für die Gruppe der nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen stößt auf großes klinisches Interesse. Die prognostische Bedeutung der durchflußzytometrischen Bestimmung von Ploidität und Höhe der S-Phase für dieses Patientinnenkollektiv ist jedoch nicht unumstritten. Untereinander nicht standardisierte Methoden bei Gewebeaufarbeitung und Datenauswertung erschweren den Vergleich der Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen.

Basierend auf Hedley's Methode (1983) haben wir eine verbesserte Technik zur Extraktion reiner Zellkerne aus formalinfixierten Paraffinschnitten für die DNA-Durchflußzytometrie entwickelt: Nach der Entparaffinierung in Rotihistol und einer absteigenden Alkoholreihe, wurden die Schnitte in 0,5 % Pepsin (pH 1,5, 37 °C, 2 Std) inkubiert. Anschließend wurden die ausgelösten Zellkerne in PBS-EDTA, das 100 U/ml RNAse enthielt, resuspendiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid gefärbt. Parallel verarbeitete Zellkerne peripherer humaner Blutlymphozyten dienten als interne Qualitätskontrolle. Die durchflußzytometrische Messung erfolgte auf einem FACScan (Becton & Dickinson, Heidelberg) und die computergestützte Datenauswertung mit dem "Modfit" Programm (Verity Software House, Maine, USA). Dieses Programm ermöglichte auch bei aneuploiden Tumoren die genaue Auswertung der S-Phase und berücksichtigte bei der Berechnung von Debris und Aggregaten die Besonderheiten von Paraffinmaterial.

Bei 99 nodal-negativen Mammakarzinomen wurden S-Phase und Ploidität aus Paraffinschnitten bestimmt: 47 (47 %) Tumoren waren diploid und 52 (53 %) aneuploid. Mit dem CART Verfahren konnte ein optimaler "cut-off" von 11,4 % für die S-Phase berechnet werden: 76 Tumoren (77 %) hatten eine niedrige (≤ 11,4 %) und 23 (23 %) eine hohe (> 11,4 %) S-Phase. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 40 Monate (10-72 Monate). Zwischen Ploidität, S-Phase und den "klassischen" Prognosefaktoren (Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus, Menopausenstatus, Grading) bestand keine signifikante Korrelation. Einzige Ausnahme war hierbei die Korrelation ($p = 0,01$) zwischen Menopausenstatus und Ploidität: 79 % aller postmenopausalen Patientinnen hatten aneuploide Tumoren gegenüber nur 55 % der prämenopausalen Patientinnen. Die Ploidität hatte keinen signifikanten Einfluß auf die rezidivfreie Überlebenszeit der Patientinnen. Die Höhe der S-Phase hingegen erwies sich als signifikanter Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben: Patientinnen mit niedriger S-Phase im Primärtumor hatten eine signifikant längere rezidivfreie Überlebenszeit als solche mit hoher S-Phase ($p = 0,0033$).

In der multivariaten Auswertung erwies sich die Höhe der S-Phase als zweitstärkster Prognosefaktor ($p = 0,0644$), vor "klassischen" Prognosekriterien wie Menopausen- oder Hormonrezeptorstatus oder Grading und auch vor MIB-1 (Ki-67), einem immunhistochemischen Proliferationsmarker. Als stärkster Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben ($p = 0,0295$) erwies sich in dieser Multivarianzanalyse PAI-1 (Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1), ein neuer und wichtiger Invasions- und Metastasierungsmarker.

PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN VON HEPARIN MIT HILFE BESCHICHTETER LATEXPARTIKEL UND DER DURCHFLUßZYTOMETRIE

J. Harenberg, L. Piazolo, R. Malsch und D. L. Heene

I. Medizinische Klinik, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer, 68167 Mannheim

Um näheren Aufschluß über die Pharmakokinetik von Heparin zu gewinnen, wurde bis jetzt meist mit radioaktiv markierten Heparinen gearbeitet. Diese Methode hat den Nachteil der Strahlenbelastung und des großen technischen Aufwands. In dieser Studie wurde ein fluoreszenzmarkiertes niedermolekulares Heparin verwendet. Fluorescein-5-isothiocyanat (Fitc) wurde spezifisch an LMM-Heparin-Tyramin gebunden (LMM-Heparin-Tyr-Fitc). LMM-Heparin-Tyr-Fitc besitzt eine Anti-Thrombin Aktivität von 5 E/mg und eine Anti-Faktor Xa Aktivität von 66 E/mg. In dieser Studie wurde nun die durchflußzytometrische Bestimmung der Konzentration von Heparin in Plasma und Blut mit den pharmakodynamischen Daten verglichen. Latexpartikel wurden mit Protamin beschichtet. Das LMM-Heparin-Tyr-Fitc band sich im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 µg/ml und 30 µg/ml dosisabhängig an das Protamin der Latexpartikel. Die so an der Oberfläche der Latexpartikel gebundene Fluoreszenz wurde mit der Durchflußzytometrie bestimmt. Mit Hilfe von Standardkurven konnte die Konzentration der Plasmaproben bestimmt werden.

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die Differenzierung der Rattenleukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. LMM-Heparin-Tyr-Fitc band sich dosisabhängig an die Leukozyten, so daß mit der Durchflußzytometrie die relative Fluoreszenz jeder Leukozytenpopulation bestimmt und die Blutkonzentration errechnet werden konnte.

150 aXa E/kg Körpergewicht des markierten Heparines wurden acht Ratten intravenös injiziert. Die Blutproben wurden im Zeitraum zwischen 0 und 360 Minuten nach der Injektion gewonnen. Die Anti-Thrombin Aktivitäten und die Anti-Faktor Xa Aktivitäten wurden mit chromogenen Testen (S 2238, S 2222) bestimmt. Die Elimination zeigte einen biphasischen Verlauf. Die Halbwertszeiten in der α-Phase lagen für die Blutkonzentration und die Anti-Thrombin Aktivität im Bereich zwischen 30 und 45 Minuten, für die Plasmakonzentration und die Anti-Faktor Xa Aktivität zwischen 70 und 78 Minuten. Die ß-Halbwertszeiten bewegten sich für die Plasmakonzentration und die Anti-Thrombin Aktivität zwischen 66 und 78 Minuten, für die Blutkonzentration und die Anti-Faktor Xa Aktivität betrugen sie 118 bis 143 Minuten.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Durchflußzytometrie neue Möglichkeiten eröffnet, Heparinkonzentrationen direkt im Blut und Plasma zu bestimmen.

Untersuchungen zur Bindung von Heparin an Leukozyten mittels Fluorescein-5-Isothiocyanat-gekoppeltem Heparinfragment

J. Harenberg, R. Malsch, L. Piazolo und D.L. Heene
I. Medizinische Klinik, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer, 69167 Mannheim

Die Bindung von Heparin und anderen sulfatierten Polysacchariden an menschliche Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wurde mittels Fluoreszenz-gekoppeltem niedermolekularem Heparin (LMMH) untersucht. FITC war kovalent an Tyramin gebunden, das an LMMH über Endpoint-attachement synthetisiert wurde (LMMH-Tyr-FITC, Anal Biochem 1994, 217:255-264). Die Bindung von LMMH-Tyr-FITC an Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wurde mittels Durchflußzytometrie untersucht. Zwei Arten von Heparinbindungsstellen konnten auf Granulozyten verifiziert werden, während eine Klasse von Bindungsstellen auf Monozyten und Lymphozyten nachweisbar waren. Die niedrigste Menge von LMMH-Tyr-FITC betrug 1 ng pro Granulozyt, 0,18 ng je Monozyt und 0,01 ng auf Lymphozyten. Die Bindung war nicht abhängig von Calcium. Mit fallendem Molekulargewicht fand sich eine Zunahme der Bindung an alle Leukozyten (r=-0,77). Der Sulfatierungsgrad der Glycosaminoglycane beeinflußte die Bindung an Leukozyten. Mit fallendem Sulfatierungsgrad nahm die Bindung ab. Das Heparin-Pentasaccharid zeigte keine stärkere Bindung an Leukozyten als die überigen Oligosaccharide. Antithrombin III Antikörper änderten die Heparinbindung nicht, was zusammen mit der schwachen Bindung des Pentasaccharid auf einen Antithrombin III-unabhängigen Mechanismus schließen läßt. Heparin, LMMH und LMMH-Tyr-FITC waren funktionell nach Bindung an die Leukozyten biologisch aktiv, gemessen anhand der Antifaktor Xa Aktivität. Die Daten zeigen, daß Heparin und andere sulfatierte Oligosaccharide an Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten binden und auf diese Weise einen wichtigen Einfluß auf die Pharmakokinetik und die biologische Wirkung bei der Thrombose, Arteriosklerose und der Entzündung ausüben.

Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
Ha 1164/3-2

CIMS (Continuous Immuno Magnetic Sorter)
ein leistungsfähiges Gerät zur Sortierung biologischer Partikeln

Hartig R., Hausmann M., Kraus M., Cremer C.
Institut für Angewandte Physik der Universität Heidelberg
Albert-Ueberlestr.3-5, 69120 Heidelberg

Die Kopplung biologischer Patikeln an antikörperbeschichtete magnetische Beads ermöglicht deren Sortierung in einem Magnetfeld. Mit Hilfe des hier vorgestellten Gerätes können stark magnetisierbare Partikeln, die Durchmesser im µm-Bereich besitzen, mittels der Ablenkungs-Offen-Gradient-Methode magnetisch fraktioniert werden. Magnetisch markierte Zellen oder auch Zellbestandteile werden in einen kontinuierlich strömenden Puffer injiziert und durchströmen als feine Bande ein inhomogenes Magnetfeld. Entsprechend der induzierten magnetischen Momente werden die stark magnetisierbaren Partikeln abgelenkt, während die schwach magnetisierbaren Teilchen das Magnetfeld mit vernachlässigbarer Wechselwirkung passieren, ohne abgelenkt zu werden. Die abgelenkten Partikeln werden auf eine Spur fokussiert, die gänzlich von der Spur der nichtabgelenkten Partikeln getrennt ist. Die Partikelspuren werden anschließend über eine Gegenstromfraktionierung in unterschiedlichen Fraktionen aufgefangen. Bei der Sortierung von Zellen, Zellorganellen und Chromosomen konnte eine hohe Sortierreinheit erzielt werden. Der Probendurchsatz betrug bei diesen Experimenten bis zu 10^9 Partikeln pro Stunde. Vitalsortierung von Zellen konnten unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden, da der Puffer ganz den Erfordernissen des Sortierguts angepaßt werden konnte. Die magnetische Sortierung mit CIMS bietet sich daher als eine leistungsfähige Trenntechnik an, die eine hohe Sortierreinheit ermöglicht und die primär nur durch die Spezifität der verwendeten Antikörper begrenzt wird. Die Vorteile der hier vorgestellten Trenntechnik könnten neue Anwendungen der magnetischen Sortierung in Biologie und Medizin erschließen.

Karyotypische Progression und Prognose bei Oralkarzinomen

Hemmer J, Bartkowiak B

Universität Ulm, Sektion für Tumorbiologie, 89070 Ulm

Von 1986 bis 1994 wurden 435 Patienten mit primären Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle DNA-durchflußzytophotometrisch untersucht. Nahezu alle Patienten mit histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen bei Erst-OP (96%) hatten einen aneuploiden Primärtumor. Das Risiko einer verzögerten Metastasierung betrugt 7% bei N0-Patienten mit diploiden Tumoren, aber 33% im aneuploiden N0-Kollektiv. Das Risiko einer Rezidivierung nach radikaler Entfernung des Primärtumors betrug 11% bei Patienten mit diploiden, aber 52% bei Patienten mit aneuploiden Tumoren. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 90% bei Patienten mit diploiden Tumoren, 54% bei N0-Patienten mit aneuploiden Primärtumoren und 18% bei aneuploiden N+-Fällen. Da die Entstehung aneuploider Tumorzellen aus diploiden Vorläuferzellen ein ultimatives Ereignis bei ungestörter Progression darstellt, kann die maligne Progression bei diploiden Oralkarzinomen durch Entfernung des Primärtumors offensichtlich nahezu immer vollständig unterbunden werden. Aneuploide Tumoren können durch lokale Intervention nur selten kurativ behandelt werden, weil in vielen Fällen bereits eine klinisch und histologisch unerkannte Invasion von Nachbargewebe und Lymphknoten erfolgt ist. Die Aneuploidisierung stellt offensichtlich eine wesentliche Voraussetzung für die Expression des hoch-malignen zellulären Phänotyps dar. Da sich das Rezidivierungsverhalten aneuploider N0-Tumoren aber nicht von dem aneuploider N+-Tumoren unterscheidet, scheint die Expression des invasionsfähigen Phänotyps in einem engeren zeitlichen Zusammenhang mit der Aneuploidisierung zu stehen als die Expression des metastasierenden Phänotyps, wofür offensichtlich zusätzliche zytogenetische Veränderungen erforderlich sind. Wir konnten mit Hilfe von FISH mit Chromosomen-spezifischen DNA-Proben feststellen, daß die Entstehung des aneuploiden Genotyps wesentlich auf numerischen Chromosomenanomalien beruht. Ein Einfluß von Gen-Dosis-Effekten auf die maligne Progression solider Tumoren ist daher wahrscheinlich.

SEMIQUANTITATIVE MORPHOLOGISCHE, IMMUNHISTOCHEMISCHE UND FLOWZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN HUMANER SPERMATOGENESE

Hittmair A, Rogatsch H, Feichtinger H, Hobisch A*, Bale R, Mikuz G,
Institut für Pathologie, *Klinik für Urologie,
Universität Innsbruck, Müllerstr.44, ÖSTERREICH

Quantitative Untersuchungen der Spermatogenese stellen eine wichtige Methode im Rahmen der Abklärung der männlichen Unfruchtbarkeit dar. In den letzten Jahren hat sich die DNA Flowzytometrie von Hodengewebe als mögliche Alternative zu den herkömmlichen semiquantitativen morphologischen Ansätzen gezeigt. Ziel unserer Studie war ein Vergleich zwischen der semiquantitativen morphologischen Methode nach Johnsen und dem flowzytometrisch bestimmten Anteil verschiedener Zellpopulationen des Hodens. Hierzu wurden bei 52 männlichen Leichen Feinnadelaspiration und chirurgische Biopsie an einem unauffälligen Hoden durchgeführt. Die Proben wurden nach Vindelov präpariert und flowzytometrisch analysiert. Es konnte ein statistisch hochsignifikanter Bezug zwischen dem histologisch bestimmten mittleren Punktewert nach Johnsen und dem Anteil haploider Zellen im Aspirat nachgewiesen werden. In einem weiteren Ansatz wurde durch die Darstellung des Intermediärfilaments Vimentin mittels indirekter Immunfluoreszenz neben der Ploidie eine zusätzliche Diskriminante zur Unterscheidung Vimentin negativer Keimzellen von Vimentin positiven stromalen Zellen eingeführt. An chirurgischen Biopsaten wurden mittels Immunhistochemie die Lokalisation und Immunreaktivität der Vimentinfärbung überprüft. Es konnten für verschiedene Spermatogenesestörungen charakteristische quantitative Verhältnisse zwischen Keimepithel und Stroma dargestellt werden. Die Flowzytometrie des Hodens könnte sich somit in Kombination mit der Feinnadelaspiration sowohl für die Klärung wissenschaftlicher als auch klinischer Fragestellungen bewähren.

Untersuchung von Liposomen vermittelter zellulärer Aufnahme von Antisenseoligonukleotiden mittels Durchflußzytometrie und Laser Mikroskopie.

S. Höhl, O. Wilhelm, E. Schueren, M. Schmitt, H. Graeff.
Frauenklinik der Technischen Universität München

Die Rolle des Urokinase-Typ Plasminogenaktivators (uPA) für Tumorzellinvasion und Ausbreitung des Ovarialkarzinoms wurde mittels Phosphorothioat-modifizierten Antisenseoligonukleotiden (PS-ODNs), die die uPA Expression unterdrücken, untersucht. Der Einsatz von Antisenseoligonukleotiden stellt eine neue Möglichkeit dar, die Expression von Proteinen zu inhibieren. Ein kritischer Punkt für den Einsatz von PS-ODNs ist die limitierte Fähigkeit, in die Zelle einzudringen. Die gegenwärtige Studie untersuchte die zelluläre Aufnahme von Fluoreszenz-markierten PS-ODNs mittels Durchflußzytometrie und Laser Mikroskopie. Ein Antisenseoligonukleotid (AS-1), welches gegen die Translationsinitiationstelle der uPA-mRNA gerichtet ist, inihibiert die Expression von uPA dosisabhängig bis zu 80 % wohingegen Kontrolloligonukleotide keinen Effekt zeigten. Eine AS-1-vermittelte Inhibierung konnte jedoch nur in Gegenwart von Liposomen nachgewiesen werden. Um herauszufinden, ob dieses Phänomen verursacht wurde, weil AS-1 nicht von Zellen in der Abwesenheit von Liposomen aufgenommen werden konnte, wurden Fluoreszenz markierte PS-ODNs hergestellt. In der Abwesenheit von Liposomen konnte nur geringe zellassozierte Fluoreszenz mittels Laser Mikroskopie nachgewiesen werden, in der Anwesenheit von Liposomen fand sich jedoch eine erhebliche Fluoreszenz auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma. PS-ODNs wurden zeitabhängig mit einem Maximum nach vier Stunden von den Zellen aufgenommen. Effektive intrazelluläre Anreicherung von PS-ODNs wurde jedoch nur in Anwesenheit von Liposomen beobachtet. Dies wurde durch Säurezugabebedingter Auslöschung extrazellulärer Fluoreszenz mittels Durchflußzytometrie quantifiziert. Unsere Ergebnisse zeigen, daß Liposomen für die zelluläre Aufnahme von Antisense-PS-ODNs notwendig ist.

Makro-Flow-Zytometer für Mikrobildaufnahme und Sortierung

M. Höreth, W. Runge, E. Gloßner, K. Enzensberger, C. Steiner, V. Kachel

Max-Planck-Institut für Biochemie, 82152 Martinsried bei München

Seit langem wird die Vielfalt von Zellen und Organismen im Meer und in Binnengewässern mikroskopisch untersucht. Die klassische Arbeitsweise, die Zählung und Klassifizierung der Organismen unter dem Mikroskop, erfordert das Wissen und die Fähigkeiten eines erfahrenen Untersuchers. Gerade Routineuntersuchungen werden dadurch aber langwierig, teuer und anstrengend. Zudem wird das Ergebnis abhängig von den Fähigkeiten und der Motivation der ausführenden Person.

Eine neue Methode, die Durchflußzytometrie, wird immer häufiger für schnelle und objektive Planktonanalyse eingesetzt, sie vermag jedoch kaum taxonomische Aussagen zu liefern.

Im folgenden wird ein System beschrieben, das die Vorteile der Durchflußzytometrie mit denen der Mikroskopie verbindet und gleichzeitig eine Sortierung besonders interessierender Spezies vornehmen kann. Die Sortierung kann dabei präparativen Zwecken dienen, aber auch einer über die Auswertung der gewonnenen Bilder hinausgehenden Analyse der aussortierten Gruppe.

Der analytische Teil der Anlage entspricht dem Makro-Flow-Planktometer, wie es auf dem Heidelberger Zytometrie-Symposium 1993 vorgestellt wurde. Das neue Sortiermodul liegt unterhalb des Bildfensters. Der Partikelstrom wird dabei von einem zweiten Hüllstrom eingefaßt und durch eine Düse zu einem fallenden Freistrahl geformt. Um diesen herum sind vier Röhrchen angeordnet, die durch Magnetspulen in den Strahl eingeschwenkt werden können. Diese Spulen werden über eine Steuerelektronik vom Rechner betätigt. Ihre maximale Betätigungsfrequenz beträgt ca. 30 Hz. In der PC-gesteuerten Datenerfassungssoftware können bis zu vier Sortierfenster in einem ein- oder zweidimensionalen Datenraum definiert werden. Durch das Einschwenken wird der Strahl in einen von vier Sammelbehälter gelenkt, und zwar genau dann, wenn das zu sortierende Teilchen die Sortierstelle passiert. Davon unabhängig findet die mikroskopische Bildaufnahme statt.

Das gesamte System wird vorgestellt und Beispiele von Analysedaten, Sortierergebnissen und Bildern werden gezeigt.

Isolierung und Analyse von Lymphozyten aus humoralen allergischen Immunantworten.

Johannes Irsch, Enrico Maggi*, Anna Ruffilli§ and Andreas Radbruch
Institute for Genetics, University Cologne, 50931 Cologne
* Institute for clinical Immunology, 50134 Florence, Italy
§ Int. Institute of Genetics, 80125 Naples, Italy

Mit Hilfe der magnetischen Hochgradienten -Zellsortierung haben wir seltene Zellen, die in der allergischen Immunantwort involviert sind, aus dem peripheren Blut von gesunden und atopischen Donoren isoliert. Zu diesen Zellen gehören vornehmlich IgE oder IgG4 exprimierende Zellen.
Die phänotypische Charakterisierung dieser Zellen ergab, daß IgE und IgG4 positive Zellen, neben den verschiedenen Isotypen, unterschiedliche phänotypische Merkmale aufweisen. Besonders wichtig ist hierbei, daß IgE positive Zellen kein CD21 exprimieren. Als Ligand für CD23 (FcεRII) könnte diesem Molekül eine wichtige Rolle in der Regulation von IgE dominierten Immunantworten zukommen.

Wir haben allergen-bindende Lymphozyten von normalen sowie von atopischen Donoren isoliert.
Als Allergene benutzten wir ParOI, das Hauptallergen aus parietaria officinalis und Phospholipase A2, das Hauptallergen aus Bienengift. Wir sind jetzt dabei den Phänotyp und das Differenzierungspotential solcher Zellen zu analysieren.

Neben der Bedeutung dieser Analysen für das Grundverständnis allergischer Immunantworten, zeigen diese Experimente eine effiziente Technologie für molekulare und zelluläre Diagnosen.

STRAHLENEMPFINDLICHKEIT VON SIGNALÜBERTRAGUNGSWEGEN ZUR AKTIVIERUNG DER NADPH-OXIDASE

Walter Kaffenberger, Klaus-Peter Gilbertz und Dirk van Beuningen

Institut für Radiobiologie, Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr, München

Die Promyelozytenleukämie-Zellinie HL-60 kann entlang der granulozytären Reihe ausdifferenziert werden und entwickelt dabei funktionelle Eigenschaften, wie die Expression von spezifischen Rezeptoren und die Fähigkeit zum "respiratory burst" (RB). In diesem Modell wurden Strahleneffekte auf Signaltransduktionswege zur Aktivierung des Schlüsselenzyms der NADPH- oder RB-Oxidase untersucht.
HL-60-Zellen wurden am Tag 0 mit 1 Gy bestrahlt und mit 1.25% DMSO zur granulozytären Differenzierung induziert. Mittels Durchflußcytometrie und FITC-konjugiertem Hexapeptid (formyl-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys) wurde die Expression des Formylpeptid-Rezeptors (FPR) über 7 Tage nach Bestrahlung/Induktion verfolgt sowie mit Dihydrorhodamin 123 als Indikator für H_2O_2 die Entwicklung der RB-Funktion auf die in vitro-Stimuli PMA und f-MLP.
Undifferenzierte HL-60-Zellen besitzen weder FPR noch die Fähigkeit zur RB-Reaktion. Induktion der Differenzierung mit DMSO geht mit der Ausprägung von FPR auf bis zu 85% der Zellen am Tag 7 einher. Am 2. Tag nach Induktion/Bestrahlung werden funktionell unreife FPR beobachtet, über die ab dem 3. Tag eine strahlenresistente (1 Gy) NADPH-Oxidase-Aktivität ausgelöst werden kann. Bestrahlung mit 0.5 Gy oder 1 Gy reduziert die PMA-vermittelte RB-Reaktion einheitlich um ca. 50% zwischen Tag 3 und Tag 7.
Unsere Ergebnisse deuten auf Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit der Signalübertragungskaskaden hin, die als gemeinsamen Endpunkt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führen. Strahlenschäden können auf dem Niveau strahlenempfindlicher Proteinkinase C (PKC)-Subspezies sowie auf nachfolgenden Signalübertragungsschritten postuliert werden, während alternative Transduktionswege über nicht Phospholipase C_1-vermittelte Übertragung, d.h. ohne PKC-Beteiligung, strahlenresistent zu sein scheinen.

Zell-Zellverbindungen vom Adhaerens-Typ: Ultrastruktur und molekularer Aufbau

Jürgen Kartenbeck
Abt. für Zellbiologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, FRG

Die Ausbildung von Zellverbindungsstrukturen ist Voraussetzung für den Aufbau eines funktionalen epithelialen Gewebeverbandes. Zu diesen Strukturen gehören die Zell-Zellkontakte vom Adhaerens-Typ, die Zonula occludens, die Nexus und Zell-Matrix-Kontakte. Die Adhaerens-Typ-Verbindungen untergliedern sich in die Zonula (Fascia, Puncta) adhaerens (Intermediate Junction) und Macula adhaerens (Desmosome). Beide Zell-Kontaktstrukturen zeigen gewisse morphologische Gemeinsamkeiten in Form eines dichten cytoplasmatischen Plaques und Assoziation mit dem Cytoskelett, sind jedoch in ihrem molekularen Aufbau unterschiedlich.

Bei den Intermediate Junctions werden die Zellkontakte durch das Transmembran-Glycoprotein E-Cadherin (Synonyme: Uvomorulin, L-CAM) vermittelt, das über die cytoplasmatisch assoziierten Plaque-bildenden Proteine α-, β-, γ-Catenin, α-Actinin, Vinculin die aktinhaltigen Mikrofilamente bindet. Bei den Desmosomen werden benachbarte Zellen durch die integralen Membranproteine Desmoglein und Desmocollin stabilisiert. Beide Proteine kommen in mehreren Isoformen und unterschiedlicher gewebsspezifischer Expression vor und gehören zusammen mit E-Cadherin zur Familie der Kalzium-abhängigen Adhäsionsmoleküle (Cadherine). Die Assoziation mit den Intermediär-Filamenten wird bei den desmosomalen Membranproteinen durch die cytosolischen Proteine Desmoplakin (I & II) und Plakoglobin vermittelt.

Während bei der Embryonalentwicklung die Umorientierung der Gewebe mit Zelltranslokationen verbunden ist, die ein dynamisches Verhalten der Cadherin-vermittelten Adhaesion erfordern, ist nach Etablierung von Geweben eine relativ stabile/statische Ausbildung der Zellverbindungsstrukturen erforderlich. Ereignisse wie Zellabschilferungen und Zellinvasionen zeigen jedoch, daß auch bei differenzierten Epithelien temporäre Entkopplungen von Einzelzellen möglich sind. Eine Regulation derartiger Vorgänge ist nachgewiesen nach Zugabe extrazellulärer Faktoren mit intrazellulärer Signalwirkung, durch extrazelluläre Bindung von Antikörpern, durch Ca^{2+}-Entzug und durch intrazelluläre Phosphorylierung bestimmter Plaque-aufbauender Komponenten.

Dioxin (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) verändert die T-Zell Differenzierung im Thymus: Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen

Joachim Kremer und Charlotte Esser

Medizinisches Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf

Das Umweltgift Dioxin (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) verursacht Thymusatrophie und Immunsuppression. Tierexperimente zeigten, daß TCDD die Proliferation von Thymozyten hemmt, die Reifung beschleunigt und die Differenzierung der Zellen zu $CD4^-CD8^+$ Thymozyten begünstigt. Die $CD4^-CD8^+$ Zellen sind reife Thymozyten, sie exprimieren den αß-T-Zellrezeptor und weisen normale zytotoxische Aktivität in CTL-Experimenten auf. Durch selektive Behandlung von entweder dem Thymusstroma oder der Thymozyten konnten wir zeigen, daß nur das Thymusstroma die Zielzellen für TCDD enthält. In TCDD-behandeltem Stroma können Thymozyten zwar differenzieren, proliferieren aber nur noch eingeschränkt.
Das Thymusstroma wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen gebildet. Diese beeinflussen die Thymozytenentwicklung mittels unterschiedlicher Signale, die entweder lösliche Faktoren oder Adhäsionsmoleküle sein können. Wir haben die Stromazellen des Thymus isoliert und durchflußzytometrisch analysiert. Die Ausprägung der Oberflächenmarker MHC Klasse I, Klasse II, Mac-1, TSA-1, CD44, ICAM-1 und CDR1 wird durch TCDD nicht beeinflußt, während auf Thymozyten CD44 und MHC Klasse I aufreguliert werden. Etwa die Hälfte der $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^-CD8^-$ prägt MHC Klasse I aus, $CD4^+CD8^+$ Thymozyten sind normalerweise negativ für diesen Marker. In Gegenwart von TCDD sind etwa 70% der erstgenannten Zellen positiv, $CD4^+CD8^+$ Zellen zu etwa 20%. CD44 wird in den unreifen $CD4^-CD8^-$ Thymozyten aufreguliert. Die Interaktion zwischen MHC und T-Zellrezeptor ist für die Selektion und Reifung von Thymozyten wichtig. Kompetitive Wechselwirkung zwischen Thymozyten verursacht durch die Modulation der MHC Klasse I Moleküle könnten die normale Kontaktfrequenz von Thymozyten und Stromazellen ändern. Von MHC Klasse I defizienten Mäusen ist bekannt, daß die CD8 Ausprägung von MHC Klasse I Molekülen abhängt. Es wird daher interessant sein, weiter zu untersuchen, inwiefern die Frequenzverschiebung zugunsten von CD8 positiven Zellen im Thymus mit der Modulation des MHC zusammenhängt.

PLOIDIE-VERTEILUNGEN IN KARZINOMTRAGENDEN NIEREN *

Herbert Leyh, Antonie Lehmer, Rudolf Hartung
Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Voraussetzung für eine organerhaltende Nierentumorchirurgie ist ein möglichst geringes Risiko einer Tumormanifestation im verbleibenden Nierengewebe. Es ist deshalb zu klären, inwieweit sich in histologisch unauffälligen Anteilen karzinomtragender Nieren pathologische Ploidiemuster im Sinne prämaligner Zellveränderungen nachweisen lassen.
Material und Methodik: In einer prospektiven Studie wurden hierzu je 2 repräsentative Gewebeproben aus dem tumortragenden und dem tumorfreien Nierenanteil von Patienten mit einem histologisch gesicherten Nierenzellkarzinom (n = 264) durchflußzytometrisch untersucht. Alle Zellproben wurden nach Gefriertrocknung und entsprechender Weiterverarbeitung zu einer gleichmäßigen Zellsuspension mit mehreren Zentrifugations- und Filtrierschritten mit dem DNS-Farbstoff Propidium Jodid angefärbt. Aus jeder Probe wurden mindestens 5000 Zellen mit einem FACScan der Fa. Becton Dickinson analysiert.
Ergebnisse: Bei einer Einstufung maligner Zellveränderungen auf der Basis aneuploider und tetraploider Gipfel sowie einer erhöhten Zellproliferationsrate von mehr als 20 % konnten 64 % der Karzinomproben als aneuploid identifiziert werden (hyperproliferativ 1 %, hypodiploid aneuploid 1 %, hyperdiploid aneuploid 3 %, triploid 20 %, tetraploid 38 %, pentaploid 1 %). Heterogene Ploidiemuster fanden sich bei 9 % der untersuchten Tumoren. Die Proliferationsrate war in den aneuploiden Proben mit 34,2 % deutlich höher als in den diploiden Tumorproben und dem normalen Nierengewebe mit 9,1 % bzw. 8,2 %. Andererseits konnten jedoch auch in den tumorfernen, makroskopisch tumorfreien Nierenanteilen in 9 % aneuploide Zellmuster nachgewiesen werden (1 hyperproliferatives, 4 hyperdiploid aneuploide, 1 triploides und 17 tetraploide Histogramme).
Schlußfolgerung: Obwohl dieser Befund eine mögliche spätere Tumormanifestation im zum Untersuchungszeitpunkt histologisch normalen Nierengewebe nicht vorherbestimmen kann, so konnte doch zumindest ein erhöhtes malignes Potential in einigen der untersuchten Proben gefunden werden. Dies sollte allzu großzügige Entscheidungen zu einer organerhaltenden Nierenchirurgie beeinflussen.

* Mit Unterstützung durch die Wilhelm-Vaillant-Stiftung

PLOIDIEMUSTER BEI DER BENIGNEN PROSTATAHYPERPLASIE *

Herbert Leyh, Antonie Lehmer, Rudolf Hartung
Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Die Analyse des Ploidieverhaltens von Prostatakarzinomzellen erlangt zunehmende Bedeutung für prognoseorientierte Therapieentscheidungen. Der Wert der DNS-Analyse für die Entdeckung des Prostatakarzinoms und die Überprüfung des Behandlungsverlaufes hängt jedoch in erster Linie davon ab, ausreichende Unterschiede in den DNS-Histogrammstrukturen zwischen benignen und malignen Zellen zu erkennen. Gibt es jedoch auch eine Aneuploidie in histologisch normalem Prostatagewebe bzw. bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH)? Wenn ja, wie ist der Stellenwert derartiger pathologischer Ploidiemuster in BPH-Proben einzuordnen? Ist eine Erfassung histologisch noch nicht verifizierbarer prämaligner Zellveränderungen der Prostata bzw. der frühzeitigere Nachweis eines inzidentellen Karzinoms mit Hilfe der Durchflußzytometrie möglich?

Material und Methodik: In einer prospektiven Studie wurden hierzu mindestens 3 repräsentative Gewebeproben aus transurethralem Resektionsmaterial von Patienten mit einem histologisch gesicherten Prostatakarzinom (n = 103) bzw. einer BPH (n = 162) durchflußzytometrisch untersucht.

Alle Zellproben wurden nach Gefriertrocknung und entsprechender Weiterverarbeitung zu einer gleichmäßigen Zellsuspension mit mehreren Zentrifugations- und Filtrierschritten mit dem DNS-Farbstoff Propidium Jodid angefärbt. Die durchflußzytometrische Zellanalyse erfolgte mit einem FACScan der Fa. Becton Dickinson. Aus jeder Probe wurden mindestens 5000 Zellen analysiert.

Ergebnisse: Bei einer Einstufung maligner Zellveränderungen auf der Basis aneuploider und tetraploider Gipfel sowie einer erhöhten Zellproliferationsrate von mehr als 20 % konnten 56 % der Prostatakarzinomproben als eindeutig aneuploid identifiziert werden (hyperproliferativ 2 %, hyperdiploid aneuploid 2 %, triploid 8 % und tetraploid 44 %). Auffallend ist, daß jedoch auch 7 % der BPH-Proben als malignitätsverdächtig gewertet werden müssen (4 hyperproliferative, 1 hyperdiploid aneuploides, 1 triploides und 5 tetraploide Histogramme).

Diskussion: Aneuploide DNS-Verteilungen sind bei histologisch als benigne eingestuften Prostatageweben nachzuweisen und bedürfen einer strengen Überwachung, da erst Langzeitbeobachtungen klären können, inwieweit sie histologisch eventuell noch nicht verifizierbare oder verifizierte maligne Zellveränderungen darstellen.

* Mit Unterstützung durch die Wilhelm-Vaillant-Stiftung

VERBESSERUNG DER IDENTIFIKATION VON HARNBLASENKARZINOMEN DURCH KOMBINIERTE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE VON PLOIDIE UND 486 P ANTIGEN *

Herbert Leyh, Antonie Lehmer, Rudolf Hartung
Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Aufgrund der hohen Rate diploider Tumoren ist der Wert der durchflußzytometrischen DNS-Analyse zur Identifikation von Blasentumorzellen limitiert. Wir untersuchten deshalb, inwieweit sich durch die simultane durchflußzytometrische Messung des 486 P 3/12 Antigens eine Verbesserung in der Tumorerkennung erreichen läßt.

Material und Methodik: In einer prospektiven Studie wurden 116 Blasenspülflüssigkeiten von Patienten mit histologisch nachgewiesenem Harnblasenkarzinom und 32 Kontrollproben durchflußzytometrisch analysiert. Der Nachweis einer Aneuploidie war erbracht bei Vorhandensein aneuploider oder tetraploider Gipfel oder bei einer Zellproliferationsrate von mehr als 20 %. Außerdem wurden maligne Zellveränderungen klassifiziert auf der Basis von mehr als 30 % positiven Urothelzellen nach Färbung mit dem monoklonalen Antikörper 486 P 3/12.

Ergebnisse: 1) Während alle Kontrollproben ein diploides Zellmuster aufwiesen, wurden 48 % der Tumorproben als aneuploid identifiziert (Aneuploidie im Stadium pTA (n=46) 30 %, pT1 (n=36) 54 %, pT2-4 (n=34) 79 %; G1 (n=14) 20 %, G2 (n=54) 40 %, G3-4 (n=48) 70 %).

2) Durch die immunzytologische Bestimmung wurden 56 % der Tumorproben identifiziert bei einer Spezifität von 97 % für die Kontrollproben. (Anteil der 486 P positiven Proben im Stadium pTA 57 %, pT1 64 %, pT2-4 45 %; G1 69 %, G2 59 %, G3 48 %)

3) Bei kombinierter Wertung von DNS-Analyse und Antigenverteilung wurden 78 % der Tumorproben korrekt erkannt bei einer Spezifität von 97 %. (Identifikationsrate für pTA 68 %, pT1 90 %, pT2-4 85 %; G1 82 %, G2 76 %, G3 82 %)

Diskussion: Verglichen mit einer alleinigen DNS-Bestimmung kann die Mehrparameter-Durchflußzytometrie mit Analyse der zellulären Determinanten des 486 P Antigens die Identifikationsrate von Blasentumorzellen signifikant erhöhen. Verbesserungen in der Tumorerkennung konnten hauptsächlich bei pTA (pT1)- und bei G1 (G2)-Tumoren beobachtet werden. Keine zusätzliche Information erbrachte die Methodik bei muskelinfiltrierenden bzw. schlecht differenzierten Tumoren.

* Mit Unterstützung durch die Wilhelm-Vaillant-Stiftung

Confocal theta microscopy and 4Pi-confocal theta microscopy

Steffen Lindek and Ernst H. K. Stelzer

European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Light Microscopy Group,
Postfach 102209, D-69012 Heidelberg, Germany

ABSTRACT

Confocal theta microscopy is a novel method by which the axial resolution in confocal fluorescence microscopy can be substantially improved. The basic idea is to observe the sample with two or more objective lenses and to detect the emission light at an angle theta to the illumination axis. The observation volume is considerably decreased when the detection axis is rotated by 90° relative to the illumination axis. This leads to an almost spherical observation volume, which is three times smaller than in a comparable confocal fluorescence microscope.

Confocal theta microscopy can be combined with 4Pi-confocal microscopy and is the first viable method proposed for fully exploiting the resolution increase achievable with 4Pi-techniques. The axial side lobes of the 4Pi-point spread function are suppressed, and the observation volume is reduced by a factor of 4.

The resolution properties of confocal theta fluorescence microscopies are investigated for single- and two-photon absorption. Evaluations of confocal theta point spread functions are presented and the resolution improvement achieved by theta observation is discussed.

Synthese und Analyse von oberflächengebundenem Heparin und Protamin auf Polystyrol - Mikropartikeln

R. Malsch, L. Piazolo, M. Schäfer, C. Giese und J Harenberg

1. Medizinische Klinik, Fakultät für klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg, Theodor Kutzer Ufer, 68167 Mannheim

Immunologische Assays von Heparin stehen immer wieder vor dem Hindernis, daß Heparin nicht reproduzierbar auf inerde Plastikmaterialien aufzutragen ist. Wir beschreiben hier ein einfaches Verfahren für diese direkten und indirekten Messungen von Heparin.

Polystyrol Mikropartikel wurden dazu verwendet Heparin an deren Oberfläche kovalent zu binden (Heparin-Latexpartikel). Ein Phosphat Puffersystem (pH 3.0 bis 9.0, Temperatur 25°C bis 60°C, Reaktionszeit 10 bis 240 Minuten) wurde optimiert. 5 parallele Ansätze zeigten, daß die funktionellen Gruppen zur antikoagulanten Wirkung von Heparin durch die Reaktion unbeeinflußt blieben. Der Heptest zeigte 776 $\pm$ 109 Antifactor Xa Einheiten/ mg, der chromogene S2222 Test 589 $\pm$ 97.2 Antifactor Xa Einheiten/ mg und der S 2238 Test 798 $\pm$ 138 Antithrombin Einheiten /mg. 0.8 mg Heparin-Latexpartikel wurden zu einer effektiven Hemmung der Blutgerinnung benötigt. Im Thrombin Antithrombin-Antikörperkomplex Test (TAT) waren 6.6 bis 23 ng/ml TAT in menschlichem Blut zwischen 10 und 120 Minuten meßbar. Die Heparin-Latexpartikel bilden Komplexe mit humanem Antithrombin III und Rinder Heparin Kofaktor II. Diese wurden mit der Flow Zytometrie identifiziert und verdeutlichten die spezifische Bindung der Proteine an Heparin.

In einem zweiten Ansatz wurde Protamin (100 µg/mg Latex) an die Latexpartikel (Protamin-Latexpartikel) kovalent gebunden: Heparin wurde mit hoher Affinität von den polykationischen Protamin-Latexpatikeln gebunden. Die Wirkung von 0.5 bis 1.0 aXa Einheiten/ml Heparin wurde von 0.1 mg Protamin-Latexpartikel neutralisiert. Die Protamin-Latexpartikel banden fluoreszenzgelabeltes niedermolekulares Heparin (LMMH-tyr-fitc) im Plasma. Auf diese Weise konnte ein kompetetiver Bindungsassay für Heparin mit Hilfe der Flow Zytometrie entwickelt werden.

Heparin-Latexpartikel und Protamin-Latexpartikel eignen sich für den Einsatz zur qualitativen und quantitativen Analyse. Diese Testsysteme werden zur Analyse der Bindung von Heparin an Leukozyten verwendet und können möglicherweise zur ihrer Trennung beitragen.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft freundlicherweise unterstützt: Projekt Ha: 1164/3-2.

Trennung von Mesophyll- und Leitbündelscheiden-Chloroplasten aus Pflanzen des C4-Photosynthesetyps mit Hilfe der Durchfluß-Zytometrie.

A. Meister und E. Pfündel

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
Gatersleben / Sachsen-Anhalt

Mesophyll- und Leitbündelscheiden-Chloroplasten von Pflanzen des C4-Photosynthesetyps unterscheiden sich unter anderem im Anteil der Photosysteme I und II und damit in ihren Fluoreszenzeigenschaften. Das ermöglicht ihre Trennung mit Hilfe der Durchfluß-Zytometrie auf der Grundlage eines unterschiedlichen Fluoreszenzverhältnisses F685/F735.

Chloroplasten von Zea mays wurden auf diese Weise sortiert und mit Hilfe von Tieftemperatur-Fluoreszenzmessungen bei -196 °C und durch Bestimmung des Chlorophyll a/Chlorophyll b-Verhältnisses charakterisiert.

Möglichkeiten und Grenzen der Feulgen-Zytophotometrie an Paraffin-eingebettetem Gewebe

W. Mellin

Institut für Pathologie der Universität Magdeburg

Die Feulgen-Zytometrie an Paraffinmaterial ist im Vergleich zur Analyse luftgetrockneter zytologischer Präparate mit größeren meßtechnischen Problemen behaftet. Während die durch eine geeignete Schnittdicke und sorgfältiges Fokussieren durchaus vermeidbaren Kernanschnitte und Kernüberlappungen augenscheinliche und typische Fehlerquellen bei Schnittmessungen darstellen, sind die mit den Zellvereinzelungsverfahren einhergehenden Zellveränderungen weniger offensichtlich. Hierbei besteht immer die Gefahr, daß bestimmte Zellpopulationen (meist solche mit großen und vulnerablen Zellkernen) oder Zellen einer bestimmten Zellzyklusphase durch die Präparation selektiv eliminiert werden. Aus diesem Grunde und wegen der subjektiven Zellauswahl sind zuverlässige Zellzyklusanalysen an Paraffinmaterial feulgenzytometrisch nicht möglich.

Hinsichtlich des DNA-Stammlinienindex ist sowohl bei Schnittpräparaten, als auch bei Zellvereinzelungspräparaten ein Proportionalitätsfehler zwischen Referenzlymphozyten und Tumorzellen zu berücksichtigen, der u.a. vom Ausmaß der Streustrahlung innerhalb des Präparates (Glare) abhängt. Dabei spielen auch die Zellkerngröße und Chromatinverteilung eine entscheidende Rolle. Da die Zellkerne nach Zellvereinzelung ihre Größe und (sphärische) Form nicht mehr wesentlich verändern, entsprechen die hiermit im Zusammenhang stehenden Meßungenauigkeiten grundsätzlich denen bei Schnittpräparaten. Der Vorteil der Schnittpräparate liegt aber in der wesentlich leichteren Zellidentifizierung, die eine gezielte Analyse erlaubt. Diese erleichtert die Beurteilung der DNA-Ploidie insofern, als das Ausmaß des Proportionalitätsfehlers durch den Vergleich von Lymphozyten mit einem für den Einzelfall optimal geeigneten Referenzzelltypen kalkulierbar wird und eine absolute Fehlbeurteilung der DNA-Stammlinienploidie schon durch die maximal sichere Tumorzellidentifikation weitgehend vermieden werden kann. Derartig differenzierte Schnittmessungen erfordern allerdings eine längere Meßdauer, die aber angesichts des geringen präparativen Aufwandes in Kauf genommen werden kann. Die bei Schnittpräparaten auftretenden Artefaktmöglichkeiten werden anhand von typischen Beispielen illustriert und Möglichkeiten ihrer Vermeidung vorgeschlagen.

Prognostische Bedeutung der Proliferation beim residualtumorfrei resezierten Adenokarzinom des Ösophagus

H. Nekarda[1], T. Nakamura[3], K. Becker[2], A. Hölscher[1], J.R. Siewert[1]
[1] Chirurgische Klinik rechts der Isar der TU München, [2] Institut für Pathologie, Ismaninger Str. 22, 81675 München, [3] Tokyo Women's Medical College, Tokyo, Japan

Kürzlich konnten wir in einer retrospektiven Studie zeigen, daß neben der Tumorinvasionstiefe (pT) und der lymphogenen Metastasierung im Truncus coeliacus (pM1), die Überexpression von c_erbB2 Onkoprotein eine unabhängige prognostische Variable für das Überleben von tumorfrei resezierten Adenokarzinomen des Ösophagus ist. In der nodal negativen Untergruppe war die DNA-Ploidie die einzige unabhängige Variable (Cancer 1994; 73:1785).
An dem gleichen Kollektiv (N=80) haben wir die S-Phase mit Hilfe der Durchflußcytometrie (Hedley-Methode; Multicycle-Auswertung) und das Proliferation assoziierte Antigen Ki-67 immunhistologisch (N=78) mit Hilfe der Mikrowellen-APAAP-Methode (MIB-1) bestimmt. Es wurde semiquantitativ der Anteil Antigen-positiver Zellen in 10 % Schritten an der Invasionsfront bezogen auf 500 Tumorzellen von zwei Untersuchern (H.N. u. K.B) ermittelt.
Der Median der S-Phase lag bei 10% (2 - 32), der für Ki-67 bei 30% (10 - 60). Es fand sich eine schwache Korrelation zwischen der S-Phase und Ki-67. Die S-Phase war signifikant korreliert mit der Ploidie und tendentiell mit der lymphogenen Fermetastasierung, während sich eine stark signifikante Korrelation zwischen der Expression des Ki-67 Antigens und einer lymphogenen regionalen Metastasierung und des Tumordurchmessers fand. Ein signifikant kürzeres Überleben (N=62, R0-UICC, 1987) wurde ab S-Phasenwerten über 10 % beobachtet; als optimaler "cutoff" Wert wurde 14 % ermittelt, wobei 17 Patienten (27%) mit einer medianen Überlebenszeit von 18 Monaten gegenüber 45 Patienten mit mehr als 60 Monaten identifiziert wurden. Für das Ki-67 Antigen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen <30 %, 30 - 40 % und > 40 %. Die Patienten (n=6) mit mehr als 40 % hatten sogar tendentiell eine bessere Prognose als weniger expremierende Tumoren.
In der univariaten Cox-Regressionsanalyse waren die pTNM-Kategorien, WHO-Klassifikation, Lymphangiosis carcinomatosa, S-Phase und die C_erbB2 Überexpression alle signifikant mit dem Überleben korreliert.
Unabhängige Parameter waren die S-Phase (cutoff 14 %), lymphogene Metastasierung im Truncus coeliacus (pM1) und die Tumorinvasionstiefe (T1,2/3,4). Das relative Sterberisiko war 3,8-fach, 8,4-fach und 4,1-fach.

Zusammenfassend ist die S-Phasenbestimmung an Paraffinmaterial beim Adenokarzinom des Ösophagus ein valider Prognoseparameter im Vergleich zu dem Ki-67 Antigen, wobei es indirekte Hinweise gibt, daß das Ki-67 Antigen offensichtlich überexpremiert werden kann.

PAS-IIIi: - das Flow Zytometer für die Routine-Immunologie.

Dr. V. Ost, Partec GmbH, Münster

Die moderne klinische Diagnostik verlangt nach zuverlässigen, routinemäßig zu betreibenden und doch dabei präzisen Untersuchungsmethoden.

Zur Immunphänotypisierung wurde von der Partec GmbH ein Flow Zytometer, das PAS-IIIi, entwickelt, das alle Anforderungen der Immunologie erfüllt und wegen seines günstigen Preises auch für das kleinere Labor attraktiv ist.

Das PAS-IIIi entbindet den Anwender von jedweder Justierarbeit: Das Flüssigkeitssystem, Probenzufuhr und Spülvorgang sind vollautomatisch. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgt durch die Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes. Die simultane Messung von bis zu 3 Fluoreszenzmarkern erfolgt durch Photomultiplier, die den jeweiligen Spektralbereichen angepaßt sind. Das Gerät zeichnet sich durch eine für kommerzielle Geräte besonders hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenzlichtmessung und eine bemerkenswert gute Differenzierbarkeit von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aus.

Darüber hinaus weist das PAS-IIIi einige Besonderheiten auf: Die integrierte Quecksilberhochdrucklampe erlaubt hochpräzise Messungen bei UV-Anregung nach Markierung der Zellen mit DAPI, Hoechst etc. Die gleichzeitige Verfügbarkeit des Lichtes des eingebauten 40 mW Argon-Ionen Lasers und der Quecksilberlampe wird interessante neue Anwendungen durch die Kombination der UV- und 488 nm-Anregung erschließen, die hier erstmals in einem preiswerten Routinegerät angeboten wird.

Die zweite Besonderheit des PAS-IIIi ist, daß dieses Gerät (wie alle Partec-Geräte) die Absolutzählung von Zellen erlaubt (Zellanzahl bzw. Zahl der Zellen, die bestimmte Marker tragen, pro ml Suspensionsvolumen).

Das für die immunologische Diagnostik erforderliche Lymphozytengating kann sowohl in Echtzeit während der Messung als auch nachträglich anhand der gespeicherten 12 bit listmode files erfolgen. Der eingebaute VME-Bus Motorola Computer ist für jedweden Datentransfer auf andere Computer vorbereitet. So läßt sich neben der eingebauten Auswertesoftware andere intelligente Software für die Datenauswertung und Verwaltung (z.B. Classif, Professor Valet) problemlos verwenden.

Ergebnisse des Ringversuchs 1994 zur Qualitätsprüfung der durchflußzytometrischen DNA-Messung.

Friedrich J. Otto
Fachklinik Hornheide, Experimentelle Tumorforschung, 48157 Münster

Der dritte Ringversuch zur Qualitätsprüfung der durchflußzytometrischen DNA-Messung wurde mit Unterstützung der Gesellschaft für Zytometrie im Januar 1994 durchgeführt. 38 Labors erhielten die Testproben zugesandt; 31 Labors führten die Messungen durch und schickten 35 Sätze auswertbarer Daten zurück. Vier Labors setzten zwei unterschiedliche Färbemethoden ein.
Die Proben bestanden aus tierischen und menschlichen Zellen und Zellkulturen, die ohne irgendeine Vorbehandlung in Ethanol fixiert waren.
Durch die Unterschiedlichkeit der in den Labors benutzten Färbemethoden und Meßgeräte wurde die Auswertung der Resultate erschwert. Auch bei diesem Versuch zeigten die Meßwerte und die aus den Histogrammen abgeleiteten Daten eine erhebliche Streuung.
Die durch die CV-Werte charakterisierte Meßgenauigkeit war in den Labors sehr unterschiedlich. Sowohl die höchste Meßgenauigkeit im Durchschnitt als auch die niedrigsten CV-Werte im einzelnen wurden, wie bereits in den vorhergehenden Ringversuchen, mit der DAPI-Färbung und HBO-Lampen-Geräten erreicht. Im Vergleich der Ergebnisse der drei aufeinanderfolgenden Ringversuche zeigte sich eine Tendenz zu steigender Meßgenauigkeit. Die Präzision der DNA-Index-Bestimmung muß jedoch immer noch als unzureichend angesehen werden.
Bei der Ermittlung der S-Phasen-Anteile ergaben sich Abweichungen, die anscheinend mehr durch den Auswerter als durch die Software verursacht werden.
Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Daten in erster Linie von der Färbung, vom Gerätetyp und von der Einstellung des Instruments abhängen. Unsere Bemühungen um eine Qualitätssicherung werden mit der Standardisierung der Färbemethoden und Kontrolle der Geräteeinstellung fortgesetzt werden.

ANALYSE DER BINDUNG VON HEPARIN AN PROTAMIN-BESCHICHTETE LATEXPARTIKEL MIT HILFE DER DURCHFLUßZYTOMETRIE

L. Piazolo, J. Harenberg, R. Malsch und D. L. Heene
I. Medizinische Klinik, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer, 68167 Mannheim

Bis zum heutigen Tag ist es sehr aufwendig, die Konzentration von Heparin in Plasmaproben zu bestimmen, wohingegen viele Methoden zur Aktivitätsbestimmung zur Verfügung stehen. Wir wollten in dieser Studie eine neue, praktikable in-vitro-Methode zur Bestimmung von Heparinkonzentrationen beschreiben.
Die Durchflußzytometrie ermöglicht nicht nur die Messung von Zellen, sondern auch die Messung von homogenen Partikeln in Suspension. Wir verwendeten magnetische Latexpartikel, deren Oberfläche kovalent mit Protamin beschichtet wurde. Uns stand weiterhin ein fluoreszenzmarkiertes Heparin zu Verfügung. Fluorescein-5-isothiocyanat (Fitc) wurde spezifisch an LMM-Heparin-Tyramin gebunden (LMM-Heparin-Tyr-Fitc). Das LMM-Heparin-Tyr-Fitc band im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 µg/ml und 30 µg/ml dosisabhängig an die mit Protamin beschichteten Latexpartikel. Die so an die Latexpartikel gebundene Fluoreszenz wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie gemessen. Bei dem zweidimensionalen Streulichthistogramm, beide Achsen waren logarithmisch eingeteilt, stellten sich die Partikel als homogene Population dar. Der Median der Fluoreszenz von den Latexpartikeln (n = 5000) korrelierte mit der eingesetzten Konzentration des Heparins (r=0,99). Es wurde kein Unterschied zwischen den Verdünnungskurven in Puffer, Human- und Rattenplasma beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß mögliche Interferenzen zwischen Heparin und Plasmaproteinen keinen Einfluß auf die Bindung an die Protamin-Latexpartikeln haben.
Weiterhin konnten wir in dieser Studie zeigen, daß sich das LMM-Heparin-Tyr-Fitc durch andere Heparine kompetitiv aus der Bindung mit den Protamin-Latexpartikeln verdrängen läßt. Hierzu wurde sowohl ein unfraktioniertes als auch ein niedermolekulares Heparin in einer Konzentration zwischen 0,005 E/ml und 2 E/ml eingesetzt. Die relative Fluoreszenzintensität bestimmten wir wiederum mit der Durchflußzytometrie. Mit Hilfe von Standardkurven konnten wir die Konzentration von unmarkiertem Heparin in Plasma oder Puffer bestimmen.
Die Durchflußzytometrie von Latexpartikeln mit oberflächenexponierten Liganden stellt ein neues analytisches Verfahren zur spezifischen Konzentrationsbestimmung von pharmakologisch aktiven Substanzen im Plasma dar.

MULTIWAVELENGHT 3D IMAGING OF IMMUNOLOGICAL AND GENETICAL MARKERS IN THE CELL NUCLEUS BY CONFOCAL MICROSCOPY AND IMAGE RECONSTRUCTION.

Michel ROBERT-NICOUD
Dynamique de l'Organisation du Génome, "DyOGen", Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, 38706 La Tronche Cedex, France.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) has several advantages over conventional fluorescence microscopy for three-dimensional microscopic imaging of fluorescently labeled specimens: (i) rejection of fluorescence signals emanating from out-of-focus planes and from neighboring structures, (ii) improvement of both lateral and axial resolutions, (iii) electronic adjustement of contrast, brightness and magnification, (iv) simultaneous visualization of the specimen by using optical phenomena based on incident, scattered, emitted and transmitted light, (v) simultaneous use of different fluorescent probes, (vi) acquisition of serial optical sections for generation of 3D reconstructions without time consuming deconvolution procedures.

CLSM has therefore proved to be a powerful technique for multiparametric and three-dimensional studies on intact cells and tissues. In the cell nucleus, several levels of the structural and functional organization of the DNA can be investigated by CLSM and digital image analysis : (i) the conformational state of the DNA, (ii) the distribution of eu- and heterochromatic regions, (iii) the distribution of chromosomal and nucleolar proteins, (iv) the spatial organization and state of condensation of chromosomal domains, (v) the position of unique and repetitive DNA sequences, (vi) the distribution of DNA replication sites, and (vii) the localization of active genes and of their products.

Probes used in studies on the internal organization of the cell nucleus include : (i) DNA and RNA fluorescent dyes, (ii) chemical reagents revealed by immunofluorescence, (iii) mono- and polyclonal antibodies directed against structural and enzymatic proteins, DNA conformation, and modified DNA bases, (iv) markers of the cell cycle and proliferation, (v) chemically or enzymatically modified DNA probes for non isotopic *in situ* hybridization (FISH). These probes can be used either individually or in various combinations with each other, in order to search for possible correlations between the spatial organization of the genome, the structural state of the chromatin and the functional state of genes in cycling and in differentiated cells.

Qualitative analysis of the distribution of nuclear components can be effectively performed by visual inspection of reconstructed digital images using stereo projection. For quantitative evaluation of 3D distributions surface and volume reconstructions must be undertaken. The surface rendering (well suited for the observation of morphology) starts with a 3D segmentation step where the surface voxels are extracted using a grey level thresholding combined with a neighboring rule. Vector representation of these voxels makes it possible to quickly process them and the result of their rotation is projected in a Z-buffer on which a simple illumination model can be applied to obtain realistic rendering. In contrast to surface rendering, ray-tracing volume rendering intends to preserve all the information contained in the 3D-cube (photometric information). A virtual ray is sent through each pixel of the display screen and the information encountered (i.e. voxel fluorescence intensities) along the path of the ray is accumulated using a transparency rule and displayed at the current pixel location. Depth cue feeling can be obtained by calculating two separate 3D reconstructions of the same scene to generate a final stereo pair.

Karyometrie an zytologischen Abstrichen der Cervix uteri

M.Ruhnke und W. Kühn

Frauenklinik am Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin

Der densitometrisch bestimmte DNA-Gehalt von Dysplasie- oder Karzinomzellen ist ein relevanter Prognoseparameter. Die prognostische Bedeutung karyomtrischer Daten ist unklar. An 233 Cervixabstrichen von Patientinen unserer Präneoplasiesprechstunde wurde neben dem DNA-Gehalt Kernfläche, Formfaktor, Entropie und Blobness bestimmt und überprüft, ob damit zusätzliche Information bei der Differenzierung von "low-" und "high-risk" Kollektiven gewonnen werden können.

Die gemittelten Werte der karyometrischen Messungen sind in Tab. 1. zusammengefasst.

Tab 1:

PAP	n	Blobness	Entropie	Formf.	Kernfl.	Dichte
II	73	0,395±0,02	1,493±0,022	15,14±0,77	83,54±23,53	110,18±25,36
III	28	0,421±0,032	1,483±0,028	18,13±1,94	109,83±27,43	151,40±66,34
IIId	92	0,423±0,027	1,480±0,027	15,93±1,19	109,54±26,99	167,03±47,85
IV	34	0,444±0,030	1,456±0029	16,65±1,31	124,25±35,50	223,00±83,79
V	6	0,458±0,019	1,447±0,032	18,10±2,17	151,45±23,09	283,04±47,76

Die statistische Auswertung zeigt, daß sich alle Parameter in den Gruppen PAP II und IIId sowie zwischen IIId und IV signifikant unterscheiden. Zwischen PAP IV und V trennen nur Kernfläche und Dichte. Ein signifikanter Unterschied zwischen PAP III und IIId besteht für den Formfaktor. PAP III und PAP IV unterscheiden sich signifikant in allen Parametern mit Ausnahme der Kernfläche.

In Tabelle 2 ist die Korrelationsmatrix der untersuchten Parameter aller Messungen angegeben.

TAB 2:

	Blobness	Entropie	Formf	Kernfl.	Dichte
Blobness	1,0000	-0.8570	0.3002	0,5802	0,7147
Entropie	-0,8576	1,0000	-0,1808	-0,2590	-0,5308
Formf.	0.3002	-0,1808	1,0000	0,2862	0,2845
Kernfl.	0,5802	-0,2590	0,2862	1,0000	0,8189
Dichte	0,7147	-0,5308	0,2845	0,8189	1,0000

Die Korrelationsmatrix zeigt die starke Korrelation von Dichte und Kernfläche. Blobness und Entropie zeigen die erwartete negative Korrelation. Die schwache Korrelation von Formfaktor zur Dichte bzw. Kernfläche zeigt, daß hier ein zusätzlicher Parameter zur Differenzierung verschiedener Patientengruppen vorliegt, dessen prognostische Bedeutung in weiteren Studien untersucht werden muß.

Fluoreszenzsignalverstärkung und Nachweis seltener Zelloberflächenantigene mit Hilfe magnetofluoreszenter Liposomen

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

Wir haben eine empfindliche Methode entwickelt, die die parallele fluoreszente und magnetische Markierung von Zelloberflächenantigenen mittels magnetofluoreszenter Liposomen ermöglicht. Durch eine Kombination von Membranextrusion und magnetischer Filtration konnten wir Liposomen herstellen, die eine enge Größenverteilung aufweisen und große Mengen an Fluoreszein sowie magnetischen Mikropartikeln enthalten.
Mittels dieser Liposomen kann die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu herkömmlichen Färbetechniken ohne Zunahme der Hintergrundfärbung 100-1000 fach erhöht werden. Diese Signalverstärkung ermöglicht die Färbung von seltenen Oberflächenepitopen in verschiedenen Modellsystemen. Durch die gleichzeitige magnetische Markierung können die markierten Zellen zudem effizient abgetrennt werden.
Zum Beispiel konnten wir CD25 (hochaffiner IL2-Rezeptor) auf der Oberläche von ruhenden Lymphozyten des peripheren Blutes nachweisen. Durch die hohe Empfindlichkeit des Färbesystems kann gezeigt werden das CD25 nur auf einer Subpopulation der B- bzw. T-Zellen exprimiert wird. CD25 positive und negative Zellen gehören zu zwei deutlich getrennten Populationen, die spezifische phänotypische sowie funktionelle Charakteristika aufweisen.

Nachweis der Bromdesoxyuridin (BrdU) "*in vivo*" Incorporation bei Oesophagus- und Magencarcinomen.

A. Sendler, K.-P. Gilbertz*, D. van Beuningen*, U.Fink, J. D. Roder, G. Pohlmann, H. Höfler+, J. R Siewert

Chirurgische Klinik und Poliklinik der TU München und +Institut für allgem. Pathologie u. pathologische Anatomie, Klinikum "rechts der Isar", 81644 München
*Institut für Radiobiologie, Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr, 80901 München.

Bromdesoxyuridin (BrdU) wird in der S-Phase in die DNA anstelle von Thymidin eingelagert. In der Durchflußzytometrie kann der Einbau von BrdU in die DNA mit Hilfe eines monoclonalen Antikörpers simultan mit dem DNA Gehalt einer Zelle dargestellt werden. Dabei wurde der DNA-Index, die DNA S-Phase und die DNA G_2-Phase bestimmt. Neben dem BrdU labeling index (L. I.) berechneten wir die Dauer der S-Phase (T_S) und die potientielle Verdopplungszeit der Tumoren (Begg et. al. 1985).
10 Patienten (Pat.) mit einem fortgeschrittenem Plattenepithelcarcinom (SCC) des Oesophagus (T 3, N 1) und 20 Pat. mit einem fortgeschr. (T 3, N+) Adenocarcinom (AdCA) des Magens erhielten 5 - 8 Std. präoperativ 200 mg BrdU in 20 ml 0.9 % Nacl als Bolusinjektion. Der Anteil der Tumorzellen im Excidat aus dem Randbereich des Tumors wurde durch eine Referenzhistologie bestimmt (>30%). Nebenwirkungen traten bei und nach der BrdU Injektion nicht auf.
Jeweils 50 % der Carcinome waren aneuploid, mit 29 % - 91 % aneuploiden Zellen im DNA Histogramm. Der Anteil der S-Phase Zellen schwankte zwischen 3.6 % - 27 % (Median 17.7) [SCC] und zwischen 7.2 % - 22 % (Median 11.7 %) [AdCa]. S+G_2-Phase: SCC: 16 % - 42 % (Median 32.8 %); AdCa: 9 % - 46 % (Median 32.8 %). Der BrdU L. I. lag zwischen 6.6 % - 25.7 % (Median 22.2 %; SCC) und zwischen 7.5 % - 39.2 % (Median 18 %; AdCA). Die Schwankungsbreite von T_S lag bei bei den SCC zwischen 7.7 - 13.3 h (Median 9.6 h), bei den AdCa zwischen 5.7 - 16 h (Median 10.5 h). Die Tpot lag zwischen 24 - 108 h (SCC) und zwischen 5.1 - 122 h (AdCA).
Die erhobenen Daten zeigen eine hohe Variabilität, vor allem bei T_S und dem BrdU L.I.. Beide Parameter spielen eine Rolle bei der Beurteilung der Proliferationskinetik eines Tumors. Eine Korrelation zur Ploidie oder zur S (+G_2)-Phase fand sich nicht. Obgleich wir eine außerordentliche Schwankung von Tpot bei beiden Tumorentitäten festgestellt haben, sind die entsprechenden Mediane überraschend niedrig: SCC: 35.4 h, AdenoCa: 51 h. Die Tpot beider Tumorentitäten sind kürzer, als bisher in der Literatur angegeben. Es wird diskutiert, welchen Einfluß diese kurzen potentiellen Verdopplungszeiten auf die Planung von neoadjuvanten (präoperativen) Chemo- und/oder Strahlentherapien haben könnten.

Quality Control in Flow Cytometry through Multiparameter Data Analysis

Erik Smet, Becton Dickinson Immunocytometry Systems Europe, Erembodegem, Belgium

We are proposing a new and improved lymphocyte discriminator, based on multiparameter light-scatter and fluorescence properties of human leucocytes using Attractors software. Lymphocyte gating in the CD45 FITC versus orthogonal light scatter (SSC) space is robust for both standard lysed whole blood cell preparations and lysed no-wash cell preparations.

Attractors are cluster seeking objects, one assigned to each population, specified graphically through a mouse interface so as to capture expectations about a population's shape and approximate multispace location. An attractor set represents a reusable, application-specific analysis protocol which runs on a generic engine, reducing multiparameter list-mode files into population statistics and colored dotplots.

Populations may be cascaded hierarchically using subattractors, i.e., a cell can belong to several populations drawn at different levels of biospecificity. Major advantages of attractors are adaptivity to preparative and biological variation among samples, stability with rare of missing populations, freedom in selecting which subset of parameters best defines each population, and ease of adding new populations to an existing method.

The multiparameter techniques used in this algorithm will provide a very accurate discriminator for cells in peripheral blood and assure high quality in lymphocyte gating.

Analyse der Invasion von Lungentumorzellen in Gelmatrizes mit Hilfe des Laserscanmikroskops

Strohmaier A.-R., Spring H., Spiess E.

Biomedizinsche Strukturforschung, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Ein entscheidender Schritt beim Prozeß der Metastasierung ist die Invasion der endothelialen Basalmembran durch Tumorzellen. Dieser Prozeß wird wesentlich durch die Aktivität von Proteinasen bestimmt. Neben dem Plasminogenaktivatorsystem und den Kollagenasen wird angenommen, daß Kathepsine eine Schlüsselrolle spielen.

Zur Untersuchung der Invasion wurde Matrigel als Modell für die Basalmembran und Kollagen G stellvertretend für interstitielle Matrix eingesetzt. Matrigel ist ein Extrakt aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom, Collagen G besteht zu 90 % aus Kollagen I und zu 10 % aus Kollagen III. Als Trägermaterial für die rekonstituierte Matrix dienten Membranfilter. Zur Detektion wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff $DIOC_6(3)$ angefärbt. Die Rolle der Cysteinproteinase Kathepsin B bei diesen Invasionsprozessen wurde mit einem fluorogenen cytochemischen Nachweis der Enzymaktivität untersucht. Die Morphologie und das Invasionsverhalten menschlicher Lungentumorzellinien wurde mit einem inversen Laserscanmikroskop untersucht.
Die lichtoptische Schnittechnik verbunden mit der Möglichkeit der Bildrekonstruktion erlaubte die dreidimensionale Erfassung der Invasion, die durch Stereobilder und Tiefencodierung eindeutig dokumentierbar wird.

Die auf den Gelen ausgesäten Zellen zeigen ein von der Matrix abhängiges Verhalten. Auf Matrigel sammeln sich die Zellen zunächst in einer netzförmigen Struktur, wobei die einzelnen Netzstränge aus mehren Zellagen bestehen. Im Laufe der weiteren Inkubation bildet sich eine mehrzellige Schicht in der Mitte des Filters. Bereits aus den netzförmigen Strukturen invadieren Zellen in das Gel hinein. Im Gegensatz zum Matrigel bilden die Zellen auf dem Collagen G-Gel Kontakte über Filopodien aus, akkumulieren aber nicht. Einzelne Zellen penetrieren unabhängig voneinander in die Matrix. Die intrazelluläre Kathepsin B-Aktivität wurde bei diesen Adhäsions- und Invasionsprozessen untersucht. Bei bestimmten Zellinien kommt es zu einer Akkumulation dieser Enzymaktivität am basalen Pol der Zellen. Dies deutet auf eine Beteiligung dieses Enzyms an proteolytischen Prozessen hin.

Monoklonale Antikörper gegen aus peripherem Blut isolierte humane CD34+Zellen

Andreas Thiel, Andreas Radbruch, Gertrud von Hesberg und Stefan Miltenyi*
Institut für Genetik, Universität zu Köln, 50931 Köln, *Miltenyi BiotecGmbH, 51429 Bergisch Gladbach

Durch eine Kombination von klassischer Hybridoma-Technologie und Anreicherung seltener Zellen durch magnetische Hochgradienten-Zellsortierung haben wir neue monoklonale Antikörper gegen humane periphere $CD34^+$ Zellen gewonnen. Für die Isolierung CD34 exprimierender Zellen wurde das MiniMACS-Separationssystem benutzt. Ausgehend von peripheren mononukleären Blutzellen mit Prozentanteilen von $CD34^+$ Zellen bei 0.1% (+/- 0.05%) wurden $CD34^+$ Zellen zu einer Reinheit von 95% (+/- 3%) aufgereinigt. Im Durchschnitt wurden $5 \cdot 10^5$ CD34 Zellen, isoliert aus zwei 500ml Blutspenden, für eine Immunisierung verwendet. Die Mäuse wurden jeweils 8 mal alle 5-6 Wochen immunisiert.

Sich entwicklende Hybridome wurden zuerst auf die Sekretion von Immuglobulinen der IgG1 und IgG2ab Klassen getestet. In einem zweiten Schritt wurden durch FACScan Analysen solche Hybridome identifiziert, die für Zelloberflächenmoleküle von PBMC´s spezifische Antikörper produzierten. Neben Antikörpern, die gegen bereits bekannte Antigene gerichtet sind, konnten so monoklonale Antikörper gegen auf humanen $CD34^+$ Zellen noch nicht weiter charakterisierte Oberflächenstrukturen gewonnen werden.

Mit der Kombination der Anreicherung seltener Zellen und Hybridoma-Technologie wird es nun auch möglich sein gegen andere seltene Zellpopulationen (fötale Zellen, Gedächtnis-B-Zellen) Antikörper herzustellen, die dann eine bessere Charakterisierung dieser Zellen ermöglichen.

Quantitative Analyse transkriptionell aktiver rRNA Gen-Cluster in intakten Nukleolen: Eine Laser Scan Mikroskopie Untersuchung.

Trendelenburg, M.F., Zatsepina, O.V*., Spring, H.

Biomedizinische Strukturforschung, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

* A.N. Belozersky Institute, Moscow State University, Russia

Für Untersuchungen zur Struktur und Funktion transkriptionell aktiver Gen-Cluster wurden bisher vorwiegend elektronenmikroskopische Verfahren eingesetzt. Obwohl durch Untersuchungen an Ultra-Dünnschnitten eine Fülle von Informationen bezüglich der Feinstruktur erarbeitet wurde, speziell wenn die Ultradünnschnitt-Technik mit geeigneten hoch-spezifischen cytochemischen und Immun-cytochemischen Verfahren gekoppelt wurde, ist eine eindeutige Quantifizierung schwierig, da die interessierenden Präparatstellen nur auf einer begrenzten Zahl von Ultradünnschnitten identifiziert werden können.
Eine weitere, häufig verwendete Untersuchungstechnik ist das Miller Chromatin Spreitungs-Verfahren. Einerseits können durch diese Technik die transkriptionell aktiven rRNA Gene direkt elektronenmikroskopisch untersucht werden, andererseits geht im Verlauf der Präparation die strukturelle Integrität des Nukleolus verloren. Bis heute hat es sich als überaus schwierig erwiesen, die Daten dieser beiden Untersuchungstechniken zu korrelieren.
Um in intakten Nukleolen die aktiven rRNA Gencluster sichtbar zu machen haben wir einen Antikörper verwendet, der gegen den Polymerase-I-spezifischen Transkriptions-Imitations-Faktor UBF spezifisch ist (Zatsepina et al., 1993; Trendelenburg et al., 1994) und das Markierungsmuster an HeLa, PtK2 und Schweine Nierenzellen untersucht. Für die konfokale Mikroskopie wurde ein Zeiss LSM 310 eingesetzt, welches mit einem Argon Laser (488 nm) für Epifluoreszenz ausgerüstet ist (Spring et al., 1995): Unsere Resultate zeigen, daß transkriptionell aktive rRNA Gen-Bereiche klar von inaktiven rRNA Gen-clustern unterschieden werden können. Hierbei treten in individuellen Nukleolen einer Zellkultur extrem unterschiedliche Verteilungsmuster auf.

Zatsepina, O.V., Voit, R., Grummt, I, Spring, H., Semenov, M.V., Trendelenburg, M.F.: Chromosoma 102, (1993) 599

Trendelenburg, M.F., Waschek, T., Schlegel, W., Zatsepina, O.V., Spring, H.: Int. Congr.-Electron Microsc. Paris 13, (1994) 433

Spring, H., Meissner, B., Fischer, R., Trendelenburg, M.F.: Int. J. Dev. Biol. in press (1995)

Quantifizierung intrazellulärer Cathepsinaktivitäten in humanen Lungen-Tumor-Zellinien mittels Durchflußzytometrie

Bettina Ulbricht[1], Eberhard Spiess[1] und Werner Ebert[2]

[1]Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, AG Biomedizinische Strukturforschung, INF 280, 69120 Heidelberg
[2]Thoraxklinik der LVA Baden, Amalienstr. 5, 69126 Heidelberg

Die Cysteinproteinasen Cathepsin B und L scheinen bei der Tumorausbreitung durch Beteiligung an invasiven Prozessen und der Metastasierung eine bedeutende Rolle zu spielen. Bei der Untersuchung der Enzyme in Lysaten von Tumorgewebe und aus Tumorzellen konnten erhöhte Spiegel der Cathepsine B und L, im Vergleich zu Normalgewebe bzw.-zellen, festgestellt werden. Es ist daher interessant, die Enzymaktivität intrazellulär mittels Durchflußzytometrie zu bestimmen. Dadurch könnte man eine große Anzahl verschiedener Tumorzellen auf ihre Cathepsinaktivität untersuchen und eine Differenzierung der Tumorzellen und der Stromazellen eines Tumors anhand ihrer Enzymaktivität vornehmen. Dies würde wichtige Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen zwischen Tumor und Wirt erlauben.

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität der Cathepsine B und L wird im allgemeinen in Zellextrakten durchgeführt. Dabei müssen Substrate verwendet werden, deren Spezifität oft ungenügend ist. Dies gilt vor allem für die Bestimmung von Cathepsin L, neben der von Cathepsin B.
Mit Hilfe von fluorogenen Rhodamin 110-Substraten (G.Valet, MPI für Biochemie, Martinsried) und einem Naphthylamid-Derivat konjugiertem Substrat wurden die Enzymaktivitäten intrazellulär mittels Durchflußzytometrie in verschiedenen humanen Lungen-Tumor-Zellinien bestimmt. Neben der Ermittlung der Enzymaktivität wurde die Spezifität der verwendeten Substrate mit einer Reihe von Inhibitoren untersucht.
Bei der Untersuchung der Enzymaktivität mit dem Naphthylamid-Derivat konjugierten Substrat Z-Arg-Arg-4MβNA zeigte sich, daß dieses Substrat absolut spezifisch für die Bestimmung von Cathepsin B ist, da die Substratreaktion nur mit einem allgemeinen Cysteinproteinaseinhibitor (E-64) und einem für Cathepsin B spezifischen Inhibitor vollständig inhibiert werden konnte.
Als fluorogene Rhodamin 110-Substrate wurden $(Z\text{-}Arg\text{-}Arg)_2$-R110 und $(Z\text{-}Phe\text{-}Arg)_2$-R110 verwendet. Von diesen war bekannt, daß sie sowohl von Cathepsin B als auch von Cathepsin L hydrolysiert werden. Mit dem spezifischen Inhibitor war es möglich, die Aktivität von Cathepsin B zu unterdrücken, so daß die "Restaktivität" Cathepsin L-Aktivität darstellt. Es ergab sich dabei, daß auch bei niedrigen Cathepsin L Spiegeln, im Vergleich zu Cathepsin B (etwa 1:100), in den Zellen die Rhodamin-Substrate etwa 300 fach stärker von Cathepsin L als von Cathepsin B umgesetzt werden. Der Vergleich der verschiedenen fluorogenen Substrate zeigt, daß die Reaktion weit weniger vom spezifischen Peptidyl-Rest als von der fluorogenen "leaving group" bestimmt wird und nur durch die Verwendung von spezifischen Inhibitoren eine eindeutige Aussage über die verschiedenen Enzymaktivitäten möglich ist.

Charakterisierung und Signaltransduktion des Kopfaktivator-Rezeptors in der neuralen Zellinie NH15-CA2

Henning Ulrich und Attila Tarnok
ZMNH, Zentrum für molekulare Neurobiologie, UKE, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, BRD

Das Undekapeptid Kopfaktivator (KA) stimuliert die Zellproliferation im G2/Mitose Übergang bei der neuralen Zellinie NH15-CA2, der Hypophysen Zellinie AtT20 sowie der Pheochromocytoma Zellinie PC12. Die Signaltransduktion wird durch membrangebundene KA-Rezeptoren vermittelt.
In Rezeptor-Ligand-Binde-Tests zeigten diese Zellen eine spezifische Bindung eines radioaktiv markierten KA-Derivates an ihre Zellmembran mit einer Bindungskonstante im nanomolaren Bereich. In Quervernetzungsexperimenten mit Carbodiimid wurde ein 65 kDa-Protein spezifisch markiert.
KA induzierte Veränderungen des zytosolischen, freien Kalziums $[Ca^{2+}]_i$ wurden mit dem fluoreszierenden Farbstoff Indo 1 am Fluoreszenz aktivierten Durchflußzytometer gemessen. NH15-CA2, PC12 und AtT20 Zellen reagierten mit einer Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$-Spiegels; P19, COS, GH3 und NIH/3T3 Zellen zeigten dagegen keine Antwort.
Nur in einer Subpopulation (10 - 30 %) der reagierenden Zellen wurde eine transiente, ca. 60 sec dauernde Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+}-Gehalts festgestellt. Stimulierungen konnten ab einer 10^{-11}M Ligandenkonzentration gemessen werden. Maximale Antworten wurden bei 10^{-10}M erreicht. Eine Präinkubation der Zellen mit KA hemmte die KA induzierte Stimulierung.
Verschiedene Signaltransduktionswege wurden blockiert und der Einfluß dieser Inhibierungen auf den KA induzierten Effekt untersucht. Die Ca^{2+}-Antwort wurde durch Pertussis Toxin völlig unterdrückt, blieb aber durch Cholera Toxin unberührt. Diese Ergebnisse lassen auf eine G-Protein (G_0 oder G_i) vermittelte Signaltransduktion schließen.
Die intrazelluläre Kalzium-Erhöhung resultiert nicht aus einer Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, da sie nicht durch Thapsigargin gehemmt wurde. Durch die Hemmung der spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanäle mit Ω-Conotoxin oder Verapamil oder durch die Bockierung des extrazellulären Ca^{2+} mit EGTA wurde die Antwort inhibiert. Der KA induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Anstieg stammt damit aus der Aktivierung von Ca^{2+}-Kanälen aus der Plasmamembran.

Kriterien der hochauflösenden DNA Durchflußzytometrie bei eukaryontischen Zellen

**W. Ulrich, Flow Cytometric Service Center (FCSC Drs. Ulrich), Hauptstr. 87
D-72667 Schlaitdorf**

Hochauflösende DNA-Durchflußzytometrie ist an einer Vielzahl isolierter tierischer und pflanzlicher Zellen oder Zellkernen durchgeführt worden. Diese Methode wird überwiegend im biologischen und medizinischen Bereich eingesetzt, um genetische Veränderungen zu ermitteln, wie z.B. Aneuploidien. Für die Diagnose der Malignität von menschlichem Biopsiematerial ist die hochauflösende DNA-Durchflußzytometrie von außerordentlicher Bedeutung. Einige Kriterien sind notwendig, um hochauflösende DNA-Verteilungskurven mit CV-Werten unter 2% zu erzielen:
a) Die Verwendung bestehender Präparations- und Färbeprotokolle ohne eigene Modifikationen. Derartige Veränderungen der Protokolle führen in den meisten Fällen zu Verschlechterungen der CV-Werte.
b) Der Einsatz optimaler durchflußzytometrischer Systeme zur DNA-Bestimmung. Die besten Durchflußzytometer für DNA-Messungen sind die Geräte, die mit einer Hochdruck Bogenlampe ausgestattet sind, meistens mit einer Quecksilberdampfdrucklampe.
c) Eichung und Einstellung der Durchflußzytometer sollte mit kernhaltigen Erythrozyten durchgeführt werden, wie z.B. Hühner- oder Forellenerythrozyten. Die CV-Werte dieser externen Standards sollten mindestens 1,5% oder geringer sein. Zur Kontrolle genauer Messungen sollte die Trennung von weiblichen und männlichen menschlichen Lymphozyten oder die Trennung von X-und Y-Chromosome tragenden tierischen Spermien durchgeführt werden. Diese Untersuchungen garantieren, daß Unterschiede im DNA-Gehalt bis zu 2% genau ermittelt werden können.
d) Ein vollausgebildeter und erfahrener Operator sollte die Messungen durchführen, der selbst die Präparationstechniken und den Umgang mit einem Gerät beherscht.
Sollten diese Minimalkriterien für hoch-auflösende DNA-Durchflußzytomtrie erfüllt sein, müßten zufriedenstellende Ergebnisse vorliegen, und noch immer auftretende Fehldiagnosen bei der Malignitätsbestimmung von menschlichem Biopsiematerialien würden drastisch reduziert.

3D RECONSTRUCTION AND IMAGE ANALYSIS TECHNIQUES FOR CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

Y. Usson and M. Robert-Nicoud

DyOGen, Institut Albert Bonniot, Univ. Joseph Fourier, Grenoble, France.

The interpretation of fluorescence microscopical images is made difficult by the lack of information about the third dimension. Confocal laser scanning microscopy makes it possible to obtain high resolution optical sections. With such microscopes it is possible to visualize the third dimension and to extract 3D features. Different methods of imaging are available to reconstruct the 3D structure of specimens. The surface rendering (well suited for the observation of morphology) starts with a 3D segmentation step where the surface voxels are extracted using a grey level thresholding combined with a neighboring rule. Vector representation of these voxels makes it possible to quickly process them and the result of their rotation is projected in a Z-buffer on which a simple illumination model can be applied to obtain realistic rendering. In contrast to sur-ace rendering, ray-tracing volume rendering intends to preserve all the information contained in the 3D-cube (photometric information). A virtual ray is sent through each pixel of the display screen and the information encountered (i.e. voxel fluorescence intensities) along the path of the ray is accumulated using a transparency rule and displayed at the current pixel location. Depth cue feeling can be obtained by calculating two separate 3D reconstructions of the same scene as if they were viewed by the left eye and right eye, respectively. The final stereo pair can be observed using different techniques: polarized slide projectors and glasses, stereo viewers, red and green anaglyphs.
Prior to the analysis of confocal series it is necessary to correct these for some limitations such as the fading of fluorophores and the intensity decrease of the excitation and emission light by the specimen as a function of depth. The anisotropical nature of the voxels (brick shaped) must be compensated for by digital deconvolution. Once these steps have been fulfilled parameters of morphometry, densitometry, anisotropy and topography may be extracted. Some examples of analyses are presented : intranuclear distribution of replication sites, intranuclear colocalisation of proteins, distribution of AgNORs and anisotropical organisation of myocardial cell nuclei.

Unterschiedliche prognostische Bedeutung invasionsassoziierter Proteasen, der Ploidie und der S-Phasenfraktion bei Patienten mit colorektalem Karzinom

H. Vogelsang, H. Nekarda, W. Schröder, F. Huber, J.R. Siewert
Chirurgische Klinik rechts der Isar der TU München, Ismaninger Str. 22, 81675 München

Die invasionsassoziierten Proteasen uPA und PAI-1 sind bei colorektalen Karzinomen in unserem Patientengut unabhängige prognostische Parameter (J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120: R45, 1994). Kürzlich wurden Euploidie und eine niedrige S-Phasenfraktion mit einem besseren Überleben bei colorektalen Karzinompatienten assoziiert (Diagn. Oncol. 3: 121, 1993). Für Mammakarzinome konnte eine Korrelation zwischen hohen PAI-1-Werten und hohen S-Phasenfraktionen gezeigt werden (Breast Cancer Res. Treat. 24: 195, 1993).

Zwischen 1987 und 1992 wurden 81 Patienten mit reseziertem colorektalen Karzinom in eine prospektive Studie eingebracht. DNA-Ploidie und S-Phasenfraktion wurden durchflußzytometrisch an schockgefrorenem Tumorgewebe bestimmt (Methode nach Vindeloev, Multicycle-Auswertung). Die invasionsassoziierten Proteasen uPA und PAI-1 wurden mit der ELISA-Technik an Gewebeextrakten schockgefrorenen Tumorgewebes gemessen.

Die Aneuploidierate betrug 57 %, die mediane S-Phasenfraktion 12,3 % (1-40,5 %). Diploide und tetraploide Tumoren waren signifikant mit der M0-Kategorie und der Dukes-Einteilung korreliert ($p < 0,05$). Weitere Korrelationen zwischen Ploidie oder S-Phasenfraktion und histomorphologischen oder Staging-Parametern bestanden nicht. Es zeigte sich tendenziell eine bessere Überlebensrate für diploide und tetraploide Tumoren. UPA und PAI-1 korrelierten weder mit der Ploidie noch der S-Phasenfraktion, wohl aber waren hohe uPA- und PAI-1-Werte mit einem signifikant schlechteren Überleben korreliert.

Zusammenfassend erweisen sich im Gegensatz zu uPA und PAI-1 Ploidie und S-Phasenfraktion als irrelevante prognostische Marker beim resezierten colorektalen Karzinom. Das Proliferationsverhalten colorektaler Karzinome korreliert nicht mit den Invasionsmarkern uPA und PAI-1.

In vitro Fluoreszenzuntersuchungen des endogenen Photosensibilisators Protoporphyrin IX

H. Weingandt[1], P. Steinbach[1], R. Baumgartner[2], M. Kriegmair[2], F. Hofstädter[1], R. Knüchel[1]

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

5-Aminolävulinsäure (ALA) ist eine natürliche Vorstufe von Protoporphyrin IX (PP IX) im Häm-Biosyntheseweg. In Gegenwart exogenen ALA's wird die genetisch bedingte Rückkopplung der Häm - Biosynthese gestört, so daß der Photosensibilisator PP IX in den Zellen akkumuliert wird. Eine Krebstherapie bzw. Diagnostik kann mittels einer Photodynamischen Behandlung, d. h. einer Laserbestrahlung nach vorheriger Gabe eines Photosensibilisators, durchgeführt werden. Besonders erfolgversprechend im Bereich der Urologie ist hier der endogene Photosensibilisator PP IX. Die Menge des entstehenden PP IX kann durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden und ist vom Zelltyp und weiteren, bisher noch unbekannten Faktoren, abhängig. Die vorliegende Studie befaßt sich daher mit einer quantitativen Analyse ALA induzierter PP IX Fluoreszenz an zwei unterschiedlich differenzierten Harnblasenkarzinomzellinien, an einer normalen Urothelzellinie und an normalen Fibroblasten. Zur Bestimmung der intra- und inter- zellulären PP IX Verteilung wird ein konfokales Laserrastermikroskop mit einem Argon-Laser und ein Fluoreszenzmikroskop benutzt. Es zeigt sich, daß die Fluoreszenz einer isolierten Zelle geringer ist als die in einer Kolonie befindlichen Zelle. Beobachtet man die intrazelluläre PP IX Fluoreszenzverteilung nach einer ALA-Exposition von 4h, so findet man ein distinktes, intrazytoplasmatisches Muster, dessen Korrelation mit Zellorganellen zur Zeit untersucht wird. Nach einer Langzeitinkubation (24h - 48h) mit ALA hingegen tritt die intrazytoplasmatische Komponente gegenüber einer starken Betonung der Plasmamembran zurück. Untersuchungen bezüglich Sättigung und Kinetik der PP IX Fluoreszenz erfolgen mit einem FACScan Durchflußzytometer und einem Fluoreszenzspektrometer. Die Fluoreszenz läßt sich bei den beiden Tumorzellinien durch Erhöhung der ALA-Konzentration in einem weiten Bereich (bis ca. 300 µg/ml ALA) steigern, mit jedoch unterschiedlichen Werten der Fluoreszenzintensität im Sättigungsbereich für die verschiedenen Zellinien. Die Fluoreszenzabnahmekinetik bei Inkubation in ALA freien serumhaltigen Medium zeigt eine Abnahme der Fluoreszenz bis auf den Kontrollwert innerhalb von fünf Stunden. Der Umsatz von ALA zu PP IX führt über einen Zeitraum von 4h zu einem linearen Anstieg der Fluoreszenz, danach tritt Sättigung ein.

Design - Kriterien für die Bildgebende Durchflußzytometrie

J. Wietzorrek, R. Kühn, M. Stadler, V. Kachel

Max-Planck-Institut für Biochemie, 82152 Martinsried bei München

Grundsätzlich lassen sich zwei Methoden zur Zellanalyse unterscheiden. Die optische Analyse mit mikroskopischen Techniken liefert umfangreiche Informationen morphologischer Art, bei denen aber aus praktischen Gründen eine nur begrenzte Anzahl von Zellen berücksichtigt werden kann. Andererseits ermöglichen indirekte Methoden wie die Durchflußzytometrie Messungen von abstrakten Zelleigenschaften an einer hohen Anzahl von Individuen mit einer hohen Erfassungsrate.[1]

Die neue Methode "Bildgebende Durchflußzytometrie" oder "Flow Cytometric Imaging" hat das Potential die Vorteile beider Methoden in einem instrumentellen Aufbau zu vereinigen. Hierzu wird ein Videomikroskop in ein Durchflußzytometer integriert. Die Bildaufnahme wird von den Ergebnissen der durchflußzytometrischen Analyse gesteuert.

Die Strategien zur Überwindung der grundsätzlichen Schwierigkeiten, die sich zwangsläufig aus der Vereinigung der Mikroskopie mit der Durchflußzytometrie ergeben, werden dargestellt. Dies betrifft die inhärent geringe Schärfentiefe der zur Abbildung erforderlichen Mikroskopoptik, die eine höchst präzise dynamische Positionierung der Probe zur Vermeidung unscharfer Bilder voraussetzt. Weiterhin muß beim Design der abbildenden Optik die optische Umgebung der Objekte berücksichtigt werden, die sich signifikant von den Bedingungen unterscheidet, die normalerweise in der Mikroskopie gegeben sind. Die hohe Partikelgeschwindigkeit in Verbindung mit großem Abbildungsmaßstab und hoher Auflösung erfordert im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie eine genau getriggerte Kurzeitbelichtung zur Vermeidung von Bewegungsunschärfen. Der Strahlenfluß, der von hierfür erforderlichen pulsbaren Lichtquellen abgegeben wird, muß auf geeignete Weise an die Köhler'sche Beleuchtungsoptik angepaßt werden. Dies ist eine entscheidende Voraussetzung für eine effiziente und homogene Beleuchtung des Gesichtsfeldes des Videomikroskopes. Bei der Bilddatenerfassung müssen die Konsequenzen der zum internen Kameratiming asynchronen Belichtung berücksichtigt werden.

Schließlich werden die Möglichkeiten der Bildgebenden Zytometrie an Hand von Durchlicht- und Phasenkontrastbildern biologischer Proben aufgezeigt.

DURCHFLUSSZYTOFLUOROMETRISCHE ANALYSE DES REZEPTORS FÜR DEN EPIDERMALEN WACHSTUMSFAKTOR (EGF-R) AUF HUMANEN OVARIALKARZINOMZELLEN

C. Will, A. Schaefer, E. Schüren, S. Schwarze, M. Schmitt, O. Wilhelm, V. Möbus, H. Graeff
Frauenklinik der Technischen Universität München und Frauenklinik der Universität Ulm

Der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-R) ist ein zellmembranständiges Glykoprotein, das sich aus einer extrazellulären Domäne mit der Bindungsstelle für verschiedene mitogene Aktivatoren (z. B. EGF), einer kurzen transmembranären Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität zusammensetzt. EGF-R, ein Protoonkogen der c-*erbB*-Onkogenfamilie, ist an der Proliferation bei einer Vielzahl von normalen Zellen aber auch Tumorzellen beteiligt. Die klinische Bedeutung des EGF-R bei Tumorerkrankungen ist nicht zuletzt aufgrund der widersprüchlichen Daten umstritten, die von verschiedenen, nicht standardisierten Meßmethoden resultieren (siehe Klijn, JGM et al. Endocrine Reviews 13: 3-17, 1992). Ziel unserer FACS-Analysen war es deshalb, die Eignung verschiedener kommerziell erhältlicher Antikörper für die Detektion bzw. Quantifizierung des EGF-R mittels Immunhistochemie oder ELISA zu untersuchen. Als Modellsystem für die Untersuchungen verwendeten wir sechs humane Ovarialkarzinomzellinien. Zuerst wiesen wir den EGF-R auf der Oberfläche dieser Zellen durch die konzentrations- und zeitabhängige Bindung von FITC-markiertem EGF (FITC-EGF) funktionell nach. An einer ausgewählten Zellinie mit hohem EGF-R-Gehalt, OV-MZ-6, wurden anschließend monoklonale und polyklonale Antikörper gegen EGF-R der Firmen Bachem, BioGenex Laboratories, Dianova, Holland biotechnology, Immundiagnostik, Merck, Oncogene Science und Sigma über eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung getestet. Der Antikörper #528 von Oncogene Science wies von allen untersuchten Antikörpern die stärkste Reaktivität auf. Die durch Nachweis mit #528 ermittelte Konzentration an zellständigem EGF-R-Antigen korrelierte bei allen sechs Tumorzellinien mit der detektierten Menge an funktionell aktivem Rezeptor. Die coating-Antikörper aus den kommerziell erhältlichen ELISAs der Firmen Dianova, Immundiagnostik (2) und Oncogene Science wurden zusätzlichen FACS-Analysen unterworfen, um zu untersuchen, inwieweit sie den mit dem Liganden besetzten EGF-Rezeptor nachweisen können. Zu diesem Zweck sättigten wir die EGF-Rezeptoren auf der OV-MZ-6-Zellinie vor der Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern mit humanem EGF ab. Alle untersuchten Antikörper reagierten nur schwach. Um die Bindungsstärke der Antikörper zu bestimmen, wurden OV-MZ-6-Zellen zuerst mit einer optimalen Antikörper-Konzentration inkubiert. Anschließend wurde am FACS die Bindung von FITC-EGF an den EGF-Rezeptor in Abhängigkeit von der Zeit analysiert. Eine rasche Zunahme des Fluoreszenzsignals ist ein Maß für die Verdrängung des jeweiligen Antikörpers aus der Bindung zum EGF-R. Die durch die FACS-Analyse erhaltenen Daten wurden für die verwendeten sechs Zellinien durch Quantifizierung von Triton X-100-Extrakten im ELISA und durch immuncytochemische Anfärbungen bestätigt. Unsere Untersuchungen ergeben, daß durchflußzytofluorometrische Analysemethoden für die Qualitätsbestimmung der in ELISAs und in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper gegen EGF-R sehr gut geeignet sind.

Poster

Die durchflußzytometrische Bestimmung von intrazellulärem Calcium in polymorphkernigen Granulozyten des Menschen unter Verwendung einer neuen Methode zur Datenanalyse

P. Dirscherl[1], I. Beck-Speier[1], W. Beisker[2], W. Grundler[2], K. Maier[1] und W. Stampfl[3]. GSF, Projekt Inhalation[1], AG Zytometrie[2] und Institut für Toxikologie[3], D-85764 Neuherberg

Polymorphkernige Granulozyten (PMN) des Menschen spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr gegen eingedrungene Pathogene. Neben migratorischen, phagozytierenden und sezernierenden Fähigkeiten nimmt die Stimulus abhängige Erzeugung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten, Respiratory Burst (RB) genannt, eine Schlüsselfunktion dieser Zellen ein. In vorangegangenen Studien, unter Verwendung von Chemiluminiszenz und durchflußzytometrischen Methoden, zeigten PMN bei Stimulation mit PMA und FMLP nach Vorinkubation mit Sulfit - einer schädigenden Substanz in gewissen Luftverschmutzungen - gesteigerten RB. Um Interaktionen des Sulfit mit den zum RB führenden Ereignissen der Signaltransduktion zu bestimmen, haben wir eine Methode zur Erfassung intrazellulären Calciums $[Ca^{2+}]_i$ etabliert. Die durchflußzytometrische Erfassung von Indo-1 Signalen wird mit einer neuartigen Auswertung der Daten kombiniert, welche vom Data Analysis System (DAS) ermöglicht wird. Dies erlaubt uns die Bestimmung der Kinetik von $[Ca^{2+}]_i$ in verschiedenen Populationen vitaler Zellen. Zukünftige Versuche werden sich mit der simultanen durchflußzytometrischen Erfassung von $[Ca^{2+}]_i$ und RB in Verbindung mit Analysen auf Einzelzellebene befassen, um eine gesteigerte räumliche und zeitliche Auflösung dieser beiden Vorgänge zu erhalten.

Der Einfluß von Alkohol, Tabakkondensat und Speicheldrüsenfunktion auf orale Epithelien der Ratte.

Hofele Ch.[1], Zöller J.[1], Maier H.[2], Born J.A.[3]

[1] Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Heidelberg (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Mühling), INF 400, 69120 Heidelberg
[2] Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität Heidelberg (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H. Weidauer), INF 400, 69120 Heidelberg
[3] Pathologisches Institut der Universität Heidelberg (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H.F. Otto), INF 220, 69120 Heidelberg

Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung dürfte es sich bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen und deren Präkanzerosen des oberen Aerodigestivtraktes um ein multifaktorielles Geschehen handeln. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, daß im Vordergrund der chronische Tabak- und Alkoholkonsum steht.

Ziel einer tierexperimentellen Untersuchung an 64 Wistarratten war es, den Einfluß von Alkohol und Tabak sowie einer verminderten Speichelsekretion auf das orale Epithel festzustellen.

8 Gruppen von männlichen Wistarratten wurden über 6 Monate mit einer ausgewogenen Flüssignahrung (nach LIEBER und DeCARLI 1968) gefüttert. Gruppe 1a diente als Kontrolle, Gruppe 2a wurde zweimal wöchentlich mit Tabakkondensat behandelt und Gruppe 3a erhielt eine alkoholhaltige Nahrung. Gruppe 4a wurde mit alkoholhaltiger Nahrung und Tabakkondensat behandelt. Den korrespondierenden Gruppen 1b, 2b, 3b und 4b wurden die großen Speicheldrüsen operativ entfernt. Untersucht wurden drei sensitive Proliferationsmarker: Die S-Phase-Fraktion sowie die Mikronuklei- und die AgNOR-Zahl pro Kern.

Es zeigten sich gleichartige, teilweise signifikante Veränderungen der genannten Analyseparameter. Es kam zu einer kontinuierlichen Erhöhung der Werte für die S-Phase-Fraktion sowie der Mikronuklei- und der AgNOR-Zahl in der Reihenfolge: Kontrollgruppe, Tabakkondensatgruppe, Alkoholgruppe bis hin zu der Gruppe, die Alkohol und Tabakkondensat erhielt. Die Reduktion der Speichelsekretion durch Entfernung der Speicheldrüsen verstärkte diese Effekte in den jeweiligen Gruppen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die additiv wirkenden karzinogenen Effekte von Alkohol und Tabak durch eine verminderte Speicheldrüsenfunktion, die beispielsweise auch nach Radiatio auftritt, verstärkt werden.

Der Nachweis von Zelloberflächenrezeptoren für Oxytocin an Luteinzellen vom Rind

Kotwica, J.[1]; Viergutz, T.[2]; Pöhland, R.[2]; Kanitz, W.[2]

Polish Academy of Sciences Olsztyn, Division of Reproductive Endocrinology and Pathology, Polen[1]; Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf, FB Fortpflanzungsbiologie, Germany[2]

Es bestehen Wechselwirkungen zwischen großen (luteinisierten Granulosazellen) und kleinen Luteinzellen (luteinisierten Thekazellen) in der Progesteronsynthese im Gelbkörper. Dabei kann Oxytocin eine Rolle spielen. Ziel war am Tiermodell Rind der Nachweis von Oxytocinrezeptoren an großen oder kleinen Luteinzellen.

Methode: Die Zellen wurden von Tieren am 7. bzw. 16. Zyklustag durch Kastration eines Ovars gewonnen. Die Trennung der Zellen in große und kleine Luteinzellen erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation. Der quantitative Zellanteil wurde im Durchflußzytometer (EPICS, Coulter) durch die Bi-Parameter (FLSxL 90 LS) erhalten. Die Markierung des gebundenen Oxytocins (nach Inkubation von 1,1 IE/ml bzw. 0,55 IE/ml Oxytocin Endkonzentration, Sigma) an der Zelloberfläche, wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen polyklonalen Antikörpern gegen Oxytocin (UCB und Brügmann) und einem polyklonalen Anti-F(ab)$_2$-FITC (Boehringer) durchgeführt. Die Messung erfolgte bei Ex= 488 nm und EM = 525 nm bei 246 mW.

Die quantitative Fluoreszensauswertung erfolgte durch Bitmapanalyse (Bitmap 1 kleine u. Bitmap 2 große Luteinzellen) in dem Bi-Parameter-Histogramm.

Ergebnis: Große Luteinzellen (Tag 16) wiesen eine signifikante Fluoreszenszunahme gegenüber der Kontrolle (Zellprobe ohne pAb gegen Oxytocin) auf. Kleine Luteinzellen am Tag 7 und Tag 16 schienen keine Rezeptoren für Oxytocin zu besitzen.

CIRCADIANE VERÄNDERUNGEN VON LYMPHOZYTENSUBPOPULATIONEN UND EXPRESSION VON CD44, CD11a UND CD2 IM MENSCHLICHEN BLUT

T.O. Kleine[1], R. Hackler[1], P. Zöfel[2], J. Albrecht[2]

[1] Med. Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie, der Universität Marburg a. d. Lahn
[2] Hochschulrechenzentrum, Abteilung Anwendung, der Uuniversität Marburg
[3] Becton Dickinson, Heidelberg.

Mögliche Beziehungen zwischen circadianen Veränderungen und Homing von Blut-Lymphozyten sowie ihren Subpopulationen wurden wie folgt untersucht: Venöses EDTA-Blut wurde von drei gesunden Männern in vierstündigen Intervallen über 48 h entnommen und die folgende Zellanalyse durchgeführt: Im Cell-Dyn 1600 (Sequoia Turner Corp., Mountain View, USA) wurden Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl gemessen sowie Hämatokrit und Hämoglobin. Leukozytendifferenzierung und Lymphozytensubpopulationen wurden im FACSCan nach Doppelmarkierung mit monoklonalen Reagenzien bestimmt (Becton Dickinson, Heidelberg)(1). Die Signifikanz circadianer Rhythmen wurde statistisch evaluiert (2).

Ergebnisse und Diskussion. Signifikante circadiane Veränderungen wurden für T-Lymphozyten und ihre Subpopulationen CD4 $^{+}$3 $^{+}$, CD8 $^{+}$3 $^{+}$ sowie für CD19 $^{+}$ B-Zellen mit peak times zwischen 23 h und 24 h bzw. um 21 h gefunden, wie bereits beschrieben (3). Diese Veränderungen waren unabhängig von Tagesschwankungen der Erythrozytenparameter. Die Markierung mit dem Lymphozyte Homing Rezeptor CD44 (4), dem Leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1α; CD11a) (5) oder dem Rezeptor für Schafserythrozyten CD2 (6) färbte den überwiegenden Anteil (nahezu 100%) der T-Lymphozyten und ihrer Subpopulationen an; sie wies keine circadianen Schwankungen auf. Dies indiziert eine starke Rezeptorexpression von T-Zellen bzw. deren ausgeprägte Aktivierung. CD19^{+} B-Zellen wurden dagegen mit CD44 und/oder CD11a nur teilweise angefärbt; die Färbung wies diskrete circadiane Schwankungen auf. Diese Befunde machen ein unterschiedliches homing Verhalten von B-Zellen wahrscheinlich sowie Unterschiede im ihrem Aktivierungszustand. Diese vorläufigen Ergebnisse müssen durch weitere Untersuchungen abgesichert werden.

1. T.O. Kleine, R. Hackler, A. Raffael. In: Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. (G. Schmitz, G. Rothe Hrsg.) Schattauer Stuttgart 1994, S.217.
2. W. Nelson, Y.L. Tong, F. Halberg (1979) Chronobiologia 6: 305.
3. T.O. Kleine, R. Hackler et al. (1993) J. interdiscipl. Cycle Res. 24: 236.
4. L.J. Picker, J. delos Toyos et al. (1989) J. Immunol. 142: 2046.
5. M.L. Dustin, T.A. Springer (1989) Nature 34: 619.
6. F.D. Howard, J.A. Ledbetter et al. (1981) J. Immunol. 126: 2117.

Oxidative und Membranpotentialreaktionen von zirkulierenden Leukozyten auf Thyroliberin in vivo.

B. Löhrke, M. Derno, W. Jentsch, H.-D. Matthes, G. Dietl
Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf-Rostock, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf

Eine Vernetzung zwischen neurokrinem und Immunsystem tritt bei Streß in Erscheinung. An der Signalisierung der adaptiven Entscheidungen zur Überwindung der Streßsituation sind Hypothalamusaktivitäten beteiligt, u.a. Liberine. Diese und die korrespondierenden endokrinen Signale sind von Leukozyten wahrnehmbar. Hypothese. Da unterschiedliche Verhaltenstypen differente adaptive Entscheidungen treffen, wird deren Signalisierung und die Zellantwort unterschiedlich sein. Vorliegend wird über Untersuchungen der Zellantwort von zirkulierenden Leukozyten auf eine Thyroliberin (TRH)-Infusion berichtet. Methoden. Zwei adaptiv-differente Rindertypen mit unterschiedlicher Dauer der Ruhephasen (+ 40 ± 9 % lang ruhende (L) gegenüber den kurz ruhenden (K) Tieren) wurden als Tiermodell benutzt. Je 4 Tieren wurde TRH (4 µg/kg oder ungefähr 60 ng/ml Blut) und je 2 Tieren wurde 0.9 % NaCl über einen Jugulariskatheter infundiert. Vor, 15 und 60 Min. nach Infusion wurden Blutproben genommen, die monomorphkernigen Leukozyten über einen Ficoll-Diatrizoatgradienten gewonnen und flußfluorozytometrisch (EPICS) die Fluoreszenz (F) von Monozyten (m) und Lymphozyten (l) analysiert. Die oxidative Aktivität, das mitochondriale und Zellmembranpotential wurde mit Dihydrorhodamin (DHR, 0.7 µM), DHR - Phorbolmyristatazetat (PMA, 0.1 µM), Rhodamin (R) 123 (0.6 µM) und $DiBAC_4$ (3) (0.4 µM) bestimmt. Die Fluoreszenz der Zelltypen wurde getrennt nach "bitmapping" von m und l im zweiparametrigen (Durchlicht gegen 90° Streulicht) Histogramm erfaßt. Die Fluoreszenz der Kontrolle (0.9 % NaCl-Infusion) wurde gleich 10±1 % gesetzt, nachdem eine Inkubation bei 37°C für 30 Min. in Anwesenheit der Farbstoffe durchgeführt worden war. Die mit der 10 %igen Vorgabe korrespondierende Fluoreszenzintensität entsprach den Kanälen (Mittelwert und Standardabweichung) 26±4, 64±8 und 22±4 für DHR, R123 und $DiBAC_4(3)$. Die Kanalvariabilität entstand aus den individuellen Unterschieden zwischen den Probanden. Ergebnisse. Die infolge der DHR-Oxidation entstehende F von m und l stieg bei K deutlich (1.4-2.9fach), verringerte sich aber bei L (1.3-2fach) 15 Min. nach der Infusion. Die Differenzen waren nach 60 Min. nicht mehr signifikant. L und K unterschieden sich nicht in der PMA-anregbaren DHR-Oxidation. TRH wirkte auf das mitochondriale Potential wenig. Nur bei L-l stieg die $DiBAC_4(3)$-F nach 15 und 60 Min. signifikant an, so daß die DHR- und $DiBAC_4(3)$-F-Änderungen auf differente Zellreaktionen bei den Verhaltenstypen hinweisen.

B-Zell-Aktivierung im Liquor cerebrospinalis: Vergleich der Expression von IL-2-Rezeptoren, Nachweis intrazellulärer Immunglobuline und oligoklonaler Banden

Eilhard Mix[1], Reinhard Lehmitz[2], Tilmann Otto Kleine[3], Rolf Hackler[3] Hans Meyer-Rienecker[1]

[1]Abteilung Neurologie der Nervenklinik und [2]Zentrallabor für Liquordiagnostik der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock, [3]Funktionsbereich Neurochemie des Medizinischen Zentrums für Nervenheilkunde der Universität Marburg

Humorale Immunreaktionen spielen im Nervensystem für die Abwehr neurotroper Infektionen und die Pathogenese autoimmun-demyelinisierender Erkrankungen eine wichtige Rolle. Informationen über ihren Aktivierungsgrad sind am ehesten über die Analyse des Liquor cerebrospinalis zu gewinnen. Etablierte B-Zell-Aktivierungsmarker sind die Expression von Interleukin-2-Rezeptoren (IL-2R) und das Auftreten intrazellulärer Immunglobuline (i.z.Ig). Lokal synthetisierte Imunglobuline stellen sich bei der isoelektrischen Fokussierung als oligoklonale Banden (OKB) im Liquor und nicht im gleichzeitig untersuchten Serum dar.

Das Ziel der vorliegenden Studie war der Vergleich dieser Aktivierungsmarker in Patientengruppen mit multipler Sklerose (MS, N=12), anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen (AENE, N=6) und anderen nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen (ANE, N=11). Die Expression der IL-2R-α- und -ß-Ketten (CD25 und CD122) auf B-Zellen wurde durchflußzytometrisch mittels 3-Farben-Fluoreszenz bestimmt (N=29). Der Nachweis der i.z.Ig erfolgte immunzytochemisch (N=29) und der OKB mittels isoelektrischer Fokussierung im PhastSystem mit Immunfixation (N=21).

MS-Patienten waren positiv für die IL-2R-Expression auf B-Zellen in 83%, für i.z.Ig in 92% und für OKB in 100% der Fälle. Die entsprechenden Werte waren bei Patienten mit AENE 33%, 17% und 20% und bei Patienten mit ANE 27%, 0% und 0%. 10 von 21 (48%) Patienten aus allen 3 Untersuchungsgruppen wiesen wenigstens einen Aktivierungsmarker auf. Davon waren 6 (60%) gleichzeitig für alle 3 Marker positiv. Im Gegensatz dazu waren in der ANE-Gruppe 6 von 9 Patienten (67%) für alle 3 Aktivierungsmarker negativ. Die beste Korrelation wurde zwischen dem Auftreten von i.z.Ig und OKB gefunden (7x beide positiv, 13x beide negativ, 1x unterschiedlich).

Aus den Ergebnissen wird geschlußfolgert, daß Ig-produzierende B-Zellen im Liquor IL-2R niedriger und mittlerer Affinität exprimieren. Vereinzelt tritt auch IL-2R-Expression ohne Ig-Produktion auf, nicht jedoch umgekehrt. In diagnostischer Hinsicht ist der Nachweis von i.z.Ig und OKB der IL-2R-Expression auf B-Zellen im Liquor überlegen.

Zellzyklus und PHB-Synthese von Methanol verwertenden Bakterien unter limitierenden Wachstumsbedingungen

Müller, S., Ackermann, J.-U., Lösche, A., Babel, W., Bley, Th.

Universität Leipzig
Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
Abteilung Biotechnologie
Permoserstraße 15, D-04318 Leipzig

Flußzytometrische Untersuchungen an Methanol verwertenden Bakterien wurden mit dem Ziel durchgeführt, Informationen zur Synthese des Biopolymers Poly-ß-hydroxybuttersäure (PHB) unter limitierenden Bedingungen zu gewinnen. Dieser biologisch abbaubare Plastwerkstoff gewinnt zunehmend kommerzielle Bedeutung.

Es wurde festgestellt, daß die Zellen unter diesen, das Wachstum hemmenden Bedingungen danach streben, einen verdoppelten DNS-Gehalt zu synthetisieren - vermutlich um beim Eintreten von Milieubedingungen, die wieder ein Wachstum ermöglichen, bessere Chancen für das Überleben und die Vermehrung zu haben. Dieses Verhalten ist korreliert mit einer maximalen Syntheserate des Biopolymers PHB, das den Bakterien als Speicherstoff für das Kohlenstoffsubstrat dient.
Für die von den Prozeßführungsbedingungen abhängigen Übergänge zwischen den physiologische Zuständen, die durch den zellulären DNS-Gehalt und die Zellgröße charakterisiert sind, wurde eine Hypothese aufgestellt und in einem formalen Schema verdeutlicht.

Signaltransduktion durch Integrine in Hepatozyten

B. Nebe, J. Rychly, W. Bohn[1]
Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock; [1]Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg

Die Interaktion mit der extrazellulären Matrix spielt bei verschiedenen Zellarten eine wesentliche Rolle für Differenzierung, Wachstum and Genexpression und wird durch Adhäsionsmoleküle, wie den Integrinen realisiert. Eine Voraussetzung für die funktionelle Bedeutung dieser Integrine ist die Transduktion von Signalen aus der extrazellulären Matrix in die Zelle. An der Hepatozyten-Zellinie mHepR1 untersuchten wir die Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} als Parameter in der Signaltransduktion nach Stimulierung der Zellen mit anti-Integrin Antikörpern und anschließender mechanischer Beeinflussung. Stimulierung der Integrin Untereinheiten $\beta 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 6$ führte zu ähnlichen Erhöhungen des intrazellulären Kalziums mit dem Ca^{2+} Indikator Fluo-3 und Messung im FACScan Durchflußzytometer. Der Anstieg des intrazellulären Kalziums ließ sich auf die Sekretion aus intrazellulären Speichern zuruckführen, während ein Einstrom von extrazellulärem Kalzium keine Rolle spielte.
Um in diesem Zusammenhang Aussagen zur Rolle des Zytoskeletts zu erhalten, wurden Immunfluoreszenzversuche zur Assoziation von Integrinen mit dem Zytoskelett durchgeführt. Bei nicht stimulierten Zellen wurden keine Integrine an den extrahierten Zytoskeletten nachgewiesen. Durch Kreuzvernetzung der Integrine mit anti-Integrin-antikörpern und einem sekundären Antikörper ließ sich eine Assoziation der Integrine mit dem Zytoskelett induzieren.
Diese Befunde sprechen dafür, daß die Stimulierung von Integrinen eine Assoziation mit dem Zytoskelett induziert, die Bedeutung für die Signaltransduktion hat, in der das intrazelluläre Kalzium eine Schlüsselrolle besitzt.

Bestimmung Des DNA-Gehaltes Aus Methanol/Eisessig Fixierten Proben Von Kindlichen Akuten Lymphoblastischen Leukämien (ALL)

K. Romanakis[1], A. Argyriou-Tirita[2], H. Zankl[1], O.A. Haas[2]

[1] Universität Kaiserslautern, Abt. für Humanbiologie und Humangenetik, Erwin-Schrödinger-Strasse, 67663 Kaiserslautern, Germany

[2] Forschungsinstitut, St. Anna Kinderspital, Kinderspitalgasse 6, 1090 Wien, Austria

Die Durchflußzytometrie ist eine technisch einfache und schnelle Methode zur Bestimmung des relativen DNA-Gehaltes und Ploidie-Grades von Leukämie- und Tumorzellen. Durch die Tatsache, daß kindliche akute lymphoblastische Leukämien (ALL) mit einem DNA-Index ≥ 1.16 auf eine normale Therapie sehr gut ansprechen und man deshalb auf intensivere Therapien verzichten kann, gewinnt die Einteilung in prognostische Gruppen anhand des DNA-Gehaltes an Bedeutung (*Trueworthy et al, J Clin Oncol 10:606,1992*). Die Messungen zeigen die besten Ergebnisse bei Verwendung von frischem oder ethanolfixiertem Material. Jedoch ist manchmal auch die retrospektive Untersuchung von vorher nicht untersuchten Fällen anhand von Material notwendig, welches für andere Zwecke verwendet wurde. Aus diesem Grund haben wir eine DAPI-Färbemethode adaptiert, die es erlaubt, Material aus früheren zytogenetischen Studien zu untersuchen. Das Methanol/Eisessig fixierte Pellet wird in einem Puffer aus Zitronensäure gewaschen, in 70% Ethanol resuspendiert, mit DAPI gefärbt und anschließend mit einem PAS III Durchflußzytometer mit einer UV-Lampe gemessen. Wir haben mehr als 50 Proben mit normalem, hypo-, pseudo-, oder hyperdiploidem Karyotyp oder ohne zytogenetischen Befund untersucht. Das Alter der Proben (zwischen zwei und neun Jahren) beeinflußte dabei die Qualität der Ergebnisse nicht. Der Variationskoeffizient der Messungen liegt zwischen 1.8 und 5.2 (nur in einem Fall), mit einem Mittelwert von 3.2 ± 0.89, welcher wesentlich besser als in einer ähnlichen, kürzlich veröffentlichen Studie ist (Lowery et al, Cancer Genet Cytogenet 67:136, 1993). Weitere Vorteile unserer Methode liegen in der sehr kleinen erforderlichen Zellzahl (10^5 Minimum, um 10^4 zu analysieren) und in der Tatsache, daß eine Kalibrierung und ein Vergleich mit diploiden Kontrollzellen nicht notwendig ist.

Durchflusszytometrische Bestimmung von spontan auftretenden apoptotischen Zellen in frischen Tumorgewebsproben

K. Romanakis[1], A. Genzlinger[1], P.K. Gadhia[2], H. Zankl[1]

[1] Universität Kaiserslautern, Abt. für Humanbiologie und Humangenetik, Erwin-Schrödinger-Strasse, 67663 Kaiserslautern, Germany

[2] Dept. of Biosciences, South Gujarat University, Post Box 49, Surat 395 007, India

Apoptose ist durch ein sehr spezifisches morphologisches, biochemisches und molekulares Muster von Änderungen in der Zelle charakterisiert. Das Interesse für die Apoptose ist in der Onkologie stark angestiegen, seit bekannt ist, daß die Wirkung von Cytostatika oft mit ihrer Fähigkeit korreliert ist, Apoptose zu induzieren. Kürzlich entwickelte durchflußzytometrische Techniken erlauben es nun Apoptose in Zellen bezüglich ihrer Position im Zellzyklus zu untersuchen (*Darzynkiewicz et. al, Cytometry 13:795, 1992*).

In der vorliegenden Studie wurden die Zahl der spontan auftretenden apoptotischen Zellen in 50 frischen Tumorgewebsproben von 10 verschiedenen Tumorarten (8 Leukämien, 5 Lymphome, 3 Ovarial-, 5 Hoden-, 8 Brust-, 8 Nieren-, 5 Prostata-, 2 Cervix-, 3 Endometrium- und 3 Lungentumore) von unbehandelten Patienten durchflußzytometrisch bestimmt. Die Zellen aus soliden Tumoren wurden durch mechanische Zerkleinerung in PBS, aus Leukämien durch eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die so erhaltenen Zellen wurden pelletiert und in 80% Ethanol fixiert. 0.5ml der fixierten Zellsuspensionen wurden 3-5min in einer Pepsin/HCL-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, mit einer DAPI/Sulforhodamin101-Lösung zur Analyse des DNA- und Proteingehaltes gefärbt und anschließend mit einem PAS III Durchflußzytometer gemessen. Kontroll-Objektträger der gemessenen Suspensionen wurden hergestellt und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß apoptotische Zellen in über 20% aller Tumorproben spontan auftreten. Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen variiert zwischen 2% und 67%. Bei den diploiden Tumoren finden sich apoptotische Zellen in 17% aller Fälle in einem Bereich von 2%-37%. Die aneuploiden Tumore weisen zu 29% apoptotische Zellen in einem Bereich von 5% bis 67% auf. Interessanterweise lassen Tumore, welche sowohl diploide als auch aneuploide Zellpopulationen aufweisen, erkennen, daß die auftretenden apoptotischen Zellen nur in den aneuploiden Zellpopulationen, nicht jedoch in den diploiden Zellpopulationen zu finden sind. Die Bestimmung des Prozentsatzes von spontan auftretenden apoptotischen Zellen in frischen Tumorgewebsproben zusammen mit dem Proliferationsindex könnte somit als prognostischer Faktor dienen. Weiterhin könnte die Anzahl apoptotischer Zellen die Quantifizierung der Reaktion des Tumors auf die erfolgte Krebstherapie erlauben.

Schnelle densitometrische und morphometrische Bildanalyse am Gefrierschnitt durch hochspezifische Kernfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

W. Schöll, P. Pürstner, H. Auner
Geburtshilflich - Gynäkologische Univ. Klinik Graz
Vorstand: Univ. Prof. Dr. R. Winter

Einführung: Konventionelle Kernfärbung nach Feulgen zur bildanalytischen Kernuntersuchung mittels Durchlichtmikroskopie ist zeitaufwendig. Eine geringfügige Anfärbung cytoplasmatischer Strukturen sowie eine Darstellung von Zellmembranen erschwert die exakte Bilvorverarbeitung am digitalisierten Bild. Eine ausschließliche Segmentierung nach Grauwerten ist nicht möglich, häufig sind Kernkonturen nur interaktiv zu bestimmen. Dadurch ist die Zahl der untersuchbaren Zellkerne beschränkt. Im Falle einer Kernsuspension entfällt die Möglichkeit einer morphometrischen Untersuchung.

Material und Methoden: Ein mit Kryofix schnellfixierter Gefrierschnitt wird nach einminütiger Spülung in Aqua dest. mit 4´,6 - diamidino - 2 -phenylindol (Dapi) überschichtet und 20 Minuten bei 37°C im Dunklen inkubiert. Nach einer zweiten kurzen Spülung in Aqua dest. wird mit Karion F eingedeckt. Das Fluoreszenzbild an einem Zeiss Axioplan Mikroskop zeigt hellweiße Kerne , die sich von einem nur im Okular erkennbaren, schwach rötlichen Hintergrund stark kontrastieren. Emissionslicht über 450 nm wird über eine Sony CCD Kamera einem Zeiss Ibas Bildanalysesytem zugeführt und liefert am digitalisierten Bild isolierte Kerne mit Grauwertbereichen zwischen 130 - 230. Hintergrund gelangt nicht zur Darstellung. Die dadurch stark vereinfachte Binärbildgestaltung erfolgt durch Segmentierung nach Grauwerten. Das System wurde so programmiert, daß sowohl morphometrische objektspezifische und feldspezifische als auch densitometrische Parameter gleichzeitig am Schnitt gemessen werden. Die Datenauswertung erfolgt an einer MS Excel Tabellenkalkulation und ergibt neben der DNA - Ploidie u. a. die Kernfläche und - form, das Kern - Plasmaverhältnis des gesamten Gesichtsfeldes sowie die Ausrichtung der Kerne. Vor allem ungerichtete Migration und Infiltration charakterisieren neben unbeschränkter Proliferation das maligne Potential eines Karzinomes.

Diskussion: Eine stöchiometrische, selektive Fluorochromierung von Zellkernen kann eine rasche bildanalytische Prognoseabschätzung von Malignomen intraoperativ in weniger als einer Stunde möglich machen.

Die Induktion von Mikrokernen durch Mitomycin C und γ-Strahlen ist höher in differenzierten somatischen im Vergleich zu undifferenzierten embryonalen Zellen der Maus *in vitro*: eine Durchfluß-zytometrische Studie

Ulrich Sehlmeyer, Wolfgang Beisker[#] und Anna M. Wobus

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, 06466 Gatersleben,
[#] GSF-Institut für Biophysikalische Strahlenforschung, 85764 Oberschleißheim
F.R.G.

Undifferenzierte und differenzierte Zellen der Maus reagieren unterschiedlich auf die Behandlung mit mutagenen Substanzen. Wir untersuchten die Induktion von Mikrokernen durch Mitomycin C (MMC) und γ-Strahlen in undifferenzierten und differenzierten Zellen der Maus *in vitro* mit Hilfe der Durchfluß-Zytometrie, die eine schnelle und verläßliche Bestimmung zytogenetischer Effekte erlaubt.

Als Modell für undifferenzierte und differenzierte Zellen verwendeten wir die pluripotente embryonale Karzinom-Linie P19 und die aus P19 Zellen somatisch differenzierte ectodermale Linie EPI-7. MMC induzierte in beiden Zellinien dosisabhängig Mikrokerne. Kinetische Untersuchungen zeigten ein Maximum nach 18 Stunden. In den undifferenzierten Zellen war eine geringere Mikrokern-Induktion festzustellen. Dieser Unterschied wurde noch deutlicher, wenn die höhere Zytotoxizität von MMC in EPI-7 Zellen berücksichtigt wird. Die MMC-Konzentrationen, die bei differenzierten Zellen eingesetzt werden konnten, lagen eine Größenordnung unter denen, die bei P19 Zellen einsetzbar waren: $IC_{10} = 1$ µM bei EPI-7 gegenüber 20 µM bei P19. Die unterschiedliche Sensitivität der beiden Zellinien nach Mutagen-Behandlung wird auch durch Genmutationsexperimente (HPRT-Locus) gestützt, da MMC in EPI-7 Zellen 6-Thioguanin-resistente Mutanten induziert, in P19 Zellen bei allen untersuchten Konzentrationen dagegen nicht.

In Übereinstimmung mit den nach MMC-Behandlung erzielten Resultaten induzierten γ-Strahlen gleichfalls dosis-abhängig Mikrokerne, wobei vorläufige Ergebnisse zur Kinetik mit den bei MMC erzielten vergleichbar sind.

Auswirkungen von Thaliblastin, einem Pflanzenalkaloid mit antitumoraler Wirkung, auf den Zellzyklus von Cisplatin - sensiblen und - resistenten Ovarial Tumorzellinien

F. Seifert [1], K.-J. Hutter [2], D. Todorov [3], W. J. Zeller [1]

[1] Institut für Toxikologie und Chemotherapie, und
[2] Institut für Radiologie und Pathophysiologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg
[3] Nationales Onkologiezentrum, Medizinische Hochschule, 1156 Sofia (Bulgarien)

Abstrakt. Das Pflanzenalkaloid Thaliblastin (TBL, NSC-68075), ein Dimer aus Benzylisochinolin und Aporphin, wird aus Thalictrum-Arten verschiedener Spezies, vor allem aus Thalictrum dasycarpum (Kupchan et al. 1963) und Thalictrum minus (Mollov et al. 1964) gewonnen. Seine antitumorale Aktivität ist sowohl in vitro als auch in vivo bewiesen, der Wirkungsmechanismus jedoch weitgehend ungeklärt (Todorov 1988).

In der vorliegenden Studie wurde die Auswirkung von TBL auf den Zellzyklus von Ovarial-Tumorzellen mit Hilfe der DNA-Durchflußcytometrie untersucht. Es wurden zwei Tumor-Zellinien untersucht (O-342, O-342/DDP(resistent gegen Cisplatin)). Es zeigte sich, daß eine Änderung im Zellzyklus sowohl von der Konzentration des TBL als auch von der Inkubationszeit abhängig ist. Bei einer Konzentration von 100µg/ml TBL ist bei beiden Zellinien schon nach einer Stunde Inkubationszeit ein Anstieg der G_2/M Fraktion zu beobachten, der jedoch bei O-342 ausgeprägter war als bei O-342/DDP. Wurde die Cisplatin-resistente Ovarialtumor-Zellinie (O-342/DDP) bis kurz vor TBL-Exposition in Cisplatin-haltigem Medium gehalten, so zeigte sich in dieser Zellinie ein ausgeprägterer G_2/M-Block als wenn das Cisplatin bereits eine Woche vorher aus dem Medium entfernt worden war. Bei diesem ausgeprägteren G_2/M-Block in der resistenten Zellinie handelt es sich vermutlich um einen synergistischen Effekt von Cisplatin und TBL.

DNA-DURCHFLUSSZYTOMETRIE AN FEINNADELPUNKTATEN BEIM MAMMAKARZINOM

Us-Krašovec M, Pogačnik A, Golouh R, Škrbinc B, Bračko M.
Institute of Oncology, Ljubljana, Slovenia

HINTERGRUND: Zur preoperativen Diagnose von Mammatumore wird als bedeutende Methode immer häufiger die Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) angewandt. Die durchflusszytometrische DNA-Analyse könnte die zytopathologische Diagnose ergänzen.
MATERIAL: In einer Gruppe von 324 Patienten wurden Teile der Gewebeproben, gewonnen mittels Feinnadelapirationsbiopsie, der Durchflusszytometrie unterworfen. 244 Patienten wurden dananch operiert. Bei 80 Patienten wurde die maligne Erkrankung durch klinische und labortechnische Untersuchungen bestätigt.
METHODEN: Die Materialgewinnung wurde von 4 Zytopathologen, unter Verwendung von 22 Mass Nadeln und 10 cm Spritzen, durchgeführt. In den meisten Fällen reichte eine einzige Biopsie für beides, die zytopathologische und die durchflusszytometrische Analyse. Die Zellsuspensionen wurden nach Otto aufbereitet, mit einer DAPI-SR-100 Loesung gefärbt und mittels PAS II-Durchflusszytometer (Partec) gemessen.
RESULTATE: Von 324 FNAB-proben enthielten 12 (3,7%) nicht verwertbares Material für die DNA-Analyse. In 80% der Proben konnten mehr als 10.000 Signale registriert werden. 52 (26,7%) der 195 histologisch bestätigten Mammacarcinome (145 IDC, 25 ILC, 16 andere und 9 nicht klassifizierte) zeigten eine Diploidie und 143 (73,3%) eine Aneuploidie. Der mittlere CV fuer diploide Tumore lag bei 2,78 (auf einer Skala von 1,6 - 7,57) wobei 3,3 die 75. Percentile representierte. Der mittlere CV für aneuploide Tumore lag bei 2,66 (auf einer Skala von 1,13 bis 6,03) und 3,37 repraesentierte die 75. Percentile.In der Gruppe der 80 Krebspatienten, die nicht chirurgisch behandelt wurden, waren 24 (30%) diploide und 56 (70%) aneuploide Tumore. In der Gruppe der 34 benignen Mammatumore zeigte nur ein einziger Phylloidestumor einen aneuploiden Wert.
SCHLUSSFOLGERUNG: Die durchflusszytometrische DNA-Analyse von Feinnadelpunktaten ist durchführbar und kann zusätzliche Informationen über die biologische Eigenschaft eines Tumors geben.

Flow Cytometric Analysis of Activated Sludge with rRNA-targeted Oligonucleotide Probes

G. Wallner* and R. Amann#

* GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, AG Durchflußzytometrie, 85764 Oberschleißheim;
# TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, 80290 München.

Oligonucleotide probes directed against ribosomal RNA facilitate the rapid identification of species or groups of microorganisms. Their great potential and advantage over culture-dependent methods for the analysis of activated sludge by fluorescence microscopy has recently been shown (1). Combined with flow cytometry, up to several thousand cells per second can be classified (2). In addition to the identification and specific enumeration of microorganisms, further information on the distribution of cell size, DNA and ribosome content - and therefore an assessment of activity - within the entire community or subpopulations can easily be collected. Hybridizations with a positive control probe that binds to all bacteria showed that in activated sludge samples up to 90% of all cells (as defined by their stainability with the DNA specific dye Hoechst 33342) can unambiguously be identified. Relative counts as well as size, DNA and rRNA distributions for the genus *Acinetobacter* and the alpha-, beta-, and gamma-subclasses of proteobacteria in a sample from activated sludge will be presented. Members of the beta-subclass are dominating in this sample. The cells which are stained by the probe specific for the genus Acinetobacter are both phylogenetically and by their flow cytometric properties a subset of the gamma-subclass.

(1) Wagner M. et al. (1993), Appl. Environ. Microbiol. 59: 1520-1525.

(2) Wallner G. et al. (1993), Cytometry 14: 136-143.

Durchflußzytometrische Messung des Wasserstoffperoxid-Burst in Zellen des Liquor cerebrospinalis

Uwe Zettl[1], Eilhard Mix[2], Gregor Rothe[3], Hans-Peter Hartung[1]

[1]Neurologische Klinik der Universität Würzburg
[2]Abt. Neurologie, Nervenklinik der Universität Rostock
[3]Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Regensburg

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden von Phagozyten im Rahmen des oxidativen Burst freigesetzt. Sie haben zahlreiche Wirkungen, wie (i) intrazelluläre Bakterizidie, (ii) Vasokonstriktion, (iii) Gewebezerstörung per se (z.B. Myelinabbau), (iv) Inaktivierung endogener Wirkstoffe (z.B. Proteasen, Chemotaxine, Leukotriene) und (v) Reduktion von Oberflächenantigenen. Diese Prozesse spielen sich u.a. auch im Zentralnervensystem im Verlauf von Infektions- und Autoimmunerkrankungen ab. Da die Krankheitsherde schwer direkt zugänglich sind, werden bevorzugt aus dem Funktionszustand der Liquorzellen Rückschlüsse auf das Krankheitsgeschehen gezogen. Von Interesse sind dabei die spontane Burstaktivität der Liquorphagozyten sowie ihre Kapazität zur Produktion von ROS nach Stimulation. Zur Bestimmung des oxidativen Burst eignet sich die durchflußzytometrische Analyse der Oxidation von Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123 durch die Prototyp-ROS H_2O_2. Wir haben diese Methode an Liquorzellen adaptiert. Hauptmodifikationen gegenüber der Methode mit Blutzellen sind (i) das Vorwärmen von 1ml Zellsuspension anstelle zellfreier Hanks-Pufferlösung und (ii) die Zugabe von 10% AB-Serum anstelle autologen Plasmas. Es werden die Ergebnisse einer Liquorprobe vorgestellt, die bei einem niedrigen Phagozytengehalt die Vorzüge und Aussagekraft des Verfahrens demonstriert. Die Messung erfolgte mit dem FACScan-Gerät und der FACScan Research Software, die Auswertung im Consort 30-Programm mittels Fensterung im Zytogramm der Seitwärtslichtstreuung (linear verstärkt) gegen Grünfluoreszenz (logarithmisch verstärkt). Stimuliert wurde submaximal mit dem chemotaktischen Peptid FMLP und maximal mit dem Aktivator der Proteinkinase C TPA. Die Spontanaktivität war bei den Monozyten am höchsten. Nach TPA-Stimulierung wurde sie in der gesamten Monozytenpopulation auf das 20-Fache angehoben. Bei den neutrophilen Granulozyten ließ sich keine Spontanaktivität nachweisen. TPA-Stimulation führte zum Auftreten von drei Subpopulationen mit niedriger, mittlerer und hoher Burstaktivität (maximal 200-fach). Diese Heterogenität wurde im peripheren Blut nicht gefunden. Das Verfahren erlaubt die parallele Testung von Liquor- und Blutzellen sowie die Untersuchung des Einflusses von Liquor- und Serumfaktoren. Es ist für Vergleichsuntersuchungen im Krankheitsverlauf und zwischen Patientengruppen mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen geeignet.