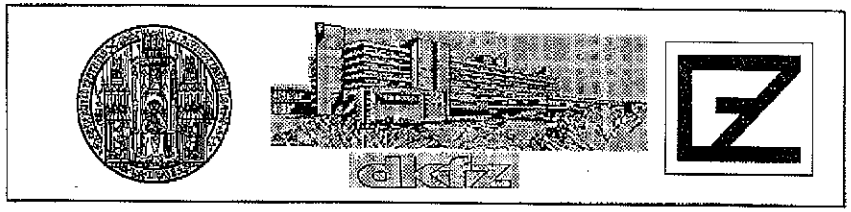
Kurzfassung der Beiträge



8. Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der
Deutschen Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 19. bis 21. Oktober 1995

Tagungsort

Kommunikationszentrum
Deutsches Krebsforschungszentrum Heideberg
Im Neuenheimer Feld 280
D - 69 120 Heidelberg
Tel.: 06221 / 42 32 08 Fax: 06221 / 42 26 52

Organisatoren

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

ISSN 0949 - 5347

Vorträge

Zellkinetische Wirkung von Interferon γ und TNFα bei Tumorzellinien und Einfluß auf die Cykline.

H. Baisch

Institut für Biophysik und Strahlenbiologie, Universität Hamburg,
Martinistraße 52. D-20246 Hamburg

Die zellkinetische Wirkung der Zytokine Tumor-Nekrosis-Faktor α (TNFα) und Interferon γ (IFNγ) auf humane Tumorzellen in Kultur wurden mit der Bromdeoxyuridin (BrdU-Methode) flußzytometrisch untersucht. Mit Hilfe der "Relative Movement" Analyse wurden die S-Phase-Zeiten (T_s), die Labelling Index (LI) und die potentielle Verdoppelungszeiten (T_{pot}) bestimmt. Darüberhinaus konnten mit einer Simulations-Analyse der flußzytometrischen Daten die Transitzeiten durch die G_1 und die G_{2M}-Phasen approximiert werden. In MCF-7 Zellen (Mamma Ca) wurde der LI durch TNF stark erniedrigt, während T_s konstant blieb und nur wenige Zellen abstarben. Im Gegensatz dazu blieben LI, T_s und T_{pot} bei Me 180 (Zervix Ca) erhalten, aber viele Zellen wurden durch TNF vom Monolayer gelöst und inaktiviert.

Interferon γ bewirkte eine Verlängerung von T_s in Me 180 und in der TNF-resistenten Zellinie 5637 (Blasen Ca) bis hin zu einem kompletten Stop der Zellen in der S-Phase. Bei MCF-7 Zellen hingegen blieb T_s gleich, nur der LI wurde abgesenkt. Die zellkinetischen Effekte des TNFα waren in beiden TNF sensiblen Linien reversibel, das heißt nach Zugabe frischen Mediums normalisierte sich die Proliferation der überlebenden Zellen. Die IFNγ-Wirkungen waren dagegen nur in MCF-7 Zellen reversibel, während in Me 180 und BC 5637 nach Zugabe von frischem Medium kein neues Wachstum erfolgte.

Die phasenspezifische Expression der Cycline wurde an den Tumorzellinien nur sehr eingeschränkt beobachtet, die Cyclinlevel waren fast gleich hoch in den Phasen des Zellzyklus (unscheduled expression). Nach IFNγ Behandlung wurde zunächst ein Anstieg des Cyclin D3 gemessen, obwohl die Proliferation bereits verlangsamt war. Erst nach 2 Tagen erfolgte ein Rückgang, zu einem Zeitpunkt, an dem die Proliferation schon vollständig gestoppt war. Die Zytokine scheinen nicht direkt in die Cyclin-Regulation des Zellzyklus einzugreifen, jedenfalls nicht zu einem früheren Zeitpunkt nach Zytokin-Einwirkung.

ROLE OF PROTEIN KINASE ACTIVITY IN REGULATION OF CELL CYCLE PROGRESSION

H. Crissman, J. Valdez, S. Rose, S. Minter
Life Sciences Division
Los Alamos National Laboratory, USA

Evidence from a large number of studies suggests that protein phosphorylation plays a central role in the regulation of cell cycle proliferation, growth and differentiation. Control of cell proliferation involves temporal activation of a series of interrelated primary and secondary kinases that phosphorylate an array of essential cycle regulating proteins. Cell cycle studies indicate that basic cellular processes such as the commitment to DNA replication and the initiation of mitosis are regulated by kinase mediated mechanisms. Recent studies have shown that phosphorylations of cellular proteins, important for cycle traverse, are brought about by complexing of cycle-specific cyclins with cyclin-dependent kinases. Levels of expression of the various cyclins can be observed to modulate at different times in the cell cycle. In order to obtain information on the role of kinase-mediated mechanisms in commitment to mammalian DNA replication, we initiated a series of studies using the general protein kinase inhibitor, staurosporine. Previous studies showed an inhibitory effect of continuous low levels of staurosporine (2-20 nM) on progression of nontransformed but not transformed cells through G1 phase of the cell cycle. More recent studies showed that similar effects could be obtained after 1 h exposures of asynchronous cultures of cells to relatively high levels of staurosporine (150 nM). Supported by the U. S. Department of Energy and the Los Alamos National Flow Cytometry Resource (NIH Grant P41-RR01315).

STROMA AUS CD13-POSITIVEN SORTIERTEN KNOCHENMARKZELLEN

J.W. Ellwart, K. Nispel, R.A.J. Oostendorp, G. Ledderose*, P. Dörmer
GSF-Institut für Experimentelle Hämatologie, München.
*Med. Klinik III, Klinikum Großhadern, Universität München.

Um Wechselwirkungen zwischen Stromazellen und hämopoetischen Vorläuferzellen zu untersuchen, möchten wir reine Subpopulationen stromabildender Zellen anreichern. Zu diesem Zweck isolierten wir anti-CD13 markierte mononukleäre Zellen aus kryo-konserviertem Knochenmark mit einem FACStar plus und hielten diese dann unter Langzeitkulturbedingungen. Nach 3 Wochen Kulturdauer konnten wir einen stromalen Layer beobachten, der aus der CD13-positiven Fraktion entstand. Die CD13-schwach-positive Fraktion, die einen Anteil von 98 % an den CD13-positiven Zellen hatte, zeigte 90-Grad-Scatter Eigenschaften wie Monozyten/Makrophagen, und nach einigen Tagen Kulturdauer hatten die adhärent gewordenen Zellen die Morphologie von Makrophagen. Sie bildeten keinen zusammenhängenden stromalen Layer während der nächsten Wochen, wenn sie nicht mit den CD13-hoch positiven Zellen vermischt wurden. Um ein fibroblastenähnliches dichtes Stroma zu bilden, in dem nach dem Replatieren Adipozyten entstanden, wurden ca. 100 CD13-hoch-positive Zellen benötigt. Dieses Stroma blieb 2 Monate lang vital und konnte etwa 6 mal replatiert werden. Die CD13-negativen Zellen dagegen zerfielen nach einigen Tagen Kuturdauer und sie bildeten niemals unter unseren Kulturbedingungen ein Stroma, auch wenn wir bis zu 10^6 Zellen einsäten. Für die Markierung stromaler Zellen hat Anti-CD13 (Aminopeptidase N) gegenüber STRO-1 den Vorteil, besser charakterisiert zu sein.

Neben den Untersuchungen normaler Wechselwirkungen zwischen Stromazellen und hämopoetischen Vorläufern, kann die flußzytometrische Isolierung verschidener Zelltypen stromabildender Zellen Bedeutung erlangen für die Verbesserung der Knochenmarklangzeitkultur und für die Diagnose und das Verstehen der Pathophysiologie von hämopoetischen Krankheiten, an denen das Stroma beteiligt ist.

Dynamische Proliferationsbestimmung an urothelialen Zellen mittels Bromodeoxyuridin/Hoechst33258 Technik und Durchflußzytometrie

Autoren: E. Endl, G. Fauser, Pia Steinbach, Ruth Knüchel und F. Hofstädter
Adresse: Institut für Pathologie, Franz Josef Strauß Allee, 93053 Regensburg

Ziel. Die Zugabe des modifizierten Nukleotids Bromodeoxyuridin (BRDU) zu in vitro wachsenden Zellkulturen und dessen Nachweis nach Einbau in die DNA liefert detaillierte Aussagen über das Wachstumsverhalten einzelner Zellen. In der Durchflußzytometrie läßt sich dieser Nachweis durch eine Färbung mit dem AT spezifischen Farbstoff HOE33258, dessen Fluoreszenz durch die Anwesenheit von BRDU vermindert wird, realisieren. Die unterschiedlichen Färbeintensitäten erlauben es so einzelne Zellen innerhalb einer Zellpopulation über bis zu drei Zellzyklen zu beobachten. Diese Methode wurde bisher überwiegend an synchronen lymphatischen Zellen angewandt. Unser Ziel war es deshalb diese Methode für asynchron wachsende, urotheliale Zellen unterschiedlicher Differenzierung und Ploidie zu etablieren und die Durchlaufzeiten durch einzelne Zellzyklusphasen zu analysieren, ohne durch Synchronisation mittels Serumentzug oder chemischer Substanzen in den Zellzyklus einzugreifen.

Ergebnisse: Wachstumskurven über den Zeitraum von 7 Tagen ergaben eine Populationsverdopplungszeit von 36 Stunden für RT4 Zellen (G1 Harnblasenkarzinom) und 27 Stunden für J82 Zellen (G3 Harnblasenkarzinom). Im Gegensatz dazu zeigte die BRDU/Hoechst Analyse am dritten Tag in Kultur die gleiche Durchlaufzeit durch die einzelnen Zellzyklusphasen für beide Zellinien. Am siebten Tag in Kultur verlängert sich bei RT4 Zellen im Gegensatz zu J82 die Durchlaufzeit durch die G1 Phase. Ein Übergang in die G0 Phase ist jedoch erst nach erreichen der Konfluenz (Tag 15), durch eine gleichzeitige Färbung gegen das Zell-Zyklus-assoziierte-Antigen KI67, zu erkennen

Schlußfolgerung: Durch die BrdU/Hoechst Technik lassen sich Aussagen über Zellzykluskinetik zu jedem Zeitpunkt in Kultur treffen, während Wachstumskurven nur eine Mittelung über einen bestimmten Zeitraum darstellen und Änderungen des Wachstumsverhaltens während dieses Zeitraums nicht berücksichtigt oder erkannt werden. Weiterhin erlaubt eine zusätzliche Färbung Zell-Zyklus-assoziierter Moleküle eine klare Aussage über deren Expression während der Übergänge zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen und deren zeitliche Zuordnung.

ERKENNUNG VON *MINIMAL RESIDUAL DISEASE* IN AKUTER MYELOISCHER LEUKOSE UND MYELODYSPLASTISCHEM SYNDROM IN KLINISCHER REMISSION MITTELS FACS/FISH.

H. Engel,[1] A. Gooodacre, A. Keyhani, S. Jiang and M. Andreeff. Department of Hematology, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, USA and[1] Institiut für klinische Biochemie der Universität Bonn, Germany.

Die Mehrheit der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) oder myelodysplastischem Syndrom (MDS), insbesondere diejenigen mit ungünstiger Zytogenetik, rezidivieren. Der Mechanismus des Überlebens von residualen leukämischen Zellen im Knochenmark (KM) ist unbekannt, wobei sensitive Methoden zur Erkennung und Überwachung erforderlich sind. Unser Studienziel war das Auftreten und die Frequenz von *minimal residual disease* (MRD) in 35 Patienten mit AML oder MDS und Abnormalitäten der Chromosomen 6, 7, 8, 9, 10, 17 und 18 in klinischer Remission zu untersuchen. KM-proben wurden mit Bromdesoxyuridin (BUdR) inkubiert, mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) für ihren bei Diagnosestellung vohandenen Phenotyp sortiert und die Interphasen durch *fluorecence in situ hybridization* (FISH) analysiert. Diese Methode erlaubt, weniger als 3 leukämische in 100 000 normalen Zellen aufzudecken. MRD konnte in 33/35 Patienten nachgewiesen werden, wobei 15 rezidivierten (8/11 mit Monosomie 7, 4/17 mit Trisomie 8 und 4/7 mit anderen chromosomalen Abnormalitäten). MRD-Niveaus ($p=0.007$) und S-Phase ($p=0.011$) waren signifikant höher in Patienten mit Monosomie 7 als in Patienten mit Trisomie 8 oder anderen Abnormalitäten. Cox-Regressionsanalysen zeigten eine Relation von S-Phase, MRD-Niveau und zytogenetischer Gruppierung zur Remissionsdauer ($p=0.001$), wobei die S-Phase den bedeutendsten prognostischen Faktor darstellte ($p=0.0001$). Wir schlußfolgern, daß die Kombination von FACS/FISH/BUdR, welche Quantität, Phenotyp und Proliferation einer sehr geringen Anzahl von leukämischen Zellen in Patienten mit AML oder MDS in klinischer Remission bestimmt, Patienten mit geringem oder erhöhtem Rezidiv-Risiko erkennen kann.

Anwendung der Partikelgrößenanalyse zur Prüfung auf Zytotoxizität

D. Fieblinger, K. Grünheid, D. Labes

Pharmakologische Forschungsgesellschaft BIOPHARM GmbH Berlin,
Alfred-Kowalke-Straße 4, 10315 Berlin

Toxizitätstests mit Testsubstanzen zur Einschätzung potentieller Gefährdungen für den Menschen sind unverzichtbar. Deshalb erlangt die Suche nach Möglichkeiten der Anwendung anderer Prüfsysteme als der allgemein üblichen Prüfung der Toxizität an Labortieren neuen Stellenwert. Aufgrund des engen Zusammenhangs von akuter Toxizität und Zytotoxizität - es existiert eine positive Korrelation zwischen der IC_{50} und der LD_{50} (oral) - gewinnt eine Nutzung von *in vitro*-Prüfsystemen für toxiologische Untersuchungen an Bedeutung. Gut charakterisierte, etablierte Zellinien wie z. B. V 79 - Zellen eignen sich für die Prüfung von Testsubstanzen auf zytotoxische Wirkung ebenso wie für Mutagenitätsprüfungen. Mit Hilfe von modernen Meßsystemen wie dem Coulter® Multisizer II lassen sich Größen zur Bewertung der Zellvitalität wie die Zellzahl und Größenveränderungen und damit toxische Einflüße einer zu prüfenden Substanz auf die Zellkulturen gut erfassen, darstellen und auswerten. Die Kriterien zur Bewertung der Toxizität gehen über eine einfache Veränderung der Proliferation hinaus. Neben quantitativen Parametern, die zur Berechnung der IC_{50}-Werte herangezogen werden, liefert die Partikelgrößenanalyse weitere qualitative Aussagen. Substanzen wie zum Beispiel 4-Acetamidophenol und Ethylmethansulfonat beeinflussen daß Wachstum einer Zellkultur auf unterschiedliche Weise. Mit Hilfe einer graphischen Auswertung der Partikelgrößenverteilung wird dies anschaulich dargestellt und miteinander vergleichbar.

Winkelaufgelöste Beobachtung der Lichtstreuung einzelner Teilchen und Teilchenagglomerate in einem Durchflußzytometer

C.Gohlke, J. Neukammer, H. Rinneberg
Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Berlin-Charlottenburg,
Abbestraße 2-12, 10587 Berlin

Zur winkelaufgelösten Beobachtung der Lichtstreuung einzelner Teilchen und biologischer Zellen wurde eine intensivierte CCD-Kamera (ICCD) in ein Laserdurchflußzytometer integriert. Die winkelaufgelöste Beobachtung des an Blutzellen gestreuten Lichtes wurde durchgeführt, um (i) ihre Differenzierung zu verbessern, um (ii) einzelne Zellen von Agglomeraten zu unterscheiden und um (iii) seltene Zellen zu identifizieren unter Verwendung der integralen Lichtstreuung zur Vorselektion. Darüberhinaus könnte die Winkelverteilung des an Blutzellen gestreuten Lichtes zur Bestimmung des Real- und Imaginäranteiles ihres Brechungsindex dienen.

Wir haben die Winkelverteilungen des an einzelnen Polystyrolkugeln mit Durchmessern von 0.37 µm bis 10 µm gestreuten Lichtes für Wellenlängen von 413.1 nm, 488.0 nm und 632.8 nm untersucht. Der Beobachtungsraumwinkel von 63°bis 117°wurde dabei durch das verwendete 32x/0.6 Mikroskopobjektiv bestimmt. Zur Erzeugung des zum Öffnen des Bildverstärkers der Kamera erforderlichen Trigger-Signals wurde ein weiterer Laserstrahl (Probenstrahl) verwendet, der sich etwa 20 µm oberhalb des ersten befindet. Um ein bestimmtes Teilchen zu selektieren, wurde die integrale Lichtstreuung, die sich durch seine Wechselwirkung mit dem Probenstrahl ergibt, mit Hilfe von Fensterdiskriminatoren analysiert. Damit kann die winkelaufgelöste Lichtstreuung von Teilchen gemessen werden, deren integrale Lichtstreuung innerhalb einer bestimmten Region im Streudiagramm liegt.

Neben der Winkelverteilung des an einzelnen Polystyrolkugeln gestreuten Lichtes haben wir die Lichtstreuung an Clustern (Agglomeraten), die aus zwei oder mehr Polystyrolkugeln bestehen, winkelaufgelöst beobachtet. Im Gegensatz zur Lichtstreuung einzelner Kügelchen kann die Mie-Theorie nicht angewendet werden, um die Streulichtverteilung von Teilchenclustern zu beschreiben. Erste Resultate zur winkelaufgelösten Beobachtung der Lichtstreuung von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten werden vorgestellt.

MODELLSYSTEM ZUR ISOLIERUNG VITALER OVARIALKARZINOMZELLEN AUS NATIVEM TUMORGEWEBE MITTELS EINES MAGNETISCHEN ZELLSEPARATIONSSYSTEMS (MACS)

Nadia Harbeck, Asmaa Abdulsalam, Sabine Schwarze, Elisabeth Schüren, Peer Dettmar[1], Walther Kuhn, Henner Graeff und Manfred Schmitt.
Frauenklinik und [1]Institut für Pathologie der Technischen Universität München.

Die durchflußzytometrische Analyse vitaler Ovarialkarzinomzellen wird durch die Heterogenität der Zellen im Tumorgewebe und seinem umgebenden Stroma erschwert. Wir haben ein Modellsystem zur Isolierung vitaler Tumoreinzelzellen aus frischem Ovarialkarzinomgewebe entwickelt. Durch Kombination von mechanischem (Gewebezerkleinerer, Bachofer, Reutlingen) und enzymatischem (0,005 % Kollagenase D) Gewebeaufschluß wurden Einzelzellen mit überwiegend intakter Oberflächenantigenstruktur aus frischem Tumorgewebe herausgelöst. Durch eine sogenannte "Tumorzell-Negativselektion" wurden Tumorzellen aus dieser Zellsuspension abgetrennt. Nicht-maligne Zellen wurden mit folgenden, gegen Oberflächenantigene gerichteten monoklonalen Antikörpern markiert: CD3 (T-Zellen), CD14 (Monozyten), CD15 (Granulozyten), CD45R (T-/B-Zellen) und 5B5 (Fibroblasten) (Dako, Hamburg). Anschließend wurde an Ferrit-Microbeads gekoppeltes Ratte-anti-Maus-IgG (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) zugegeben. Zellen, die an diese Microbeads gebunden hatten, wurden nun in einer von einem magnetischen Feld umgebenen Stahlwollmatrix (MACS, Miltenyi), zurückgehalten. Nicht-gekoppelte Tumorzellen wurden im Durchlauf angereichert. Diese Methode ermöglicht die einfache und schnelle Isolierung vitaler Tumoreinzelzellen aus frischem Ovarialkarzinomgewebe, Aszites oder Pleuraergüssen. In einem Modellsystem aus frischen Ovarialkarzinomkulturzellen und menschlichen Blutlymphozyten wurde eine Tumorzellreinheit von 93 % nach dem ersten und 97 % nach dem zweiten MACS-Durchlauf erreicht. Nach der Isolierung können auf den noch unmarkierten Tumorzellen verschiedene Oberflächenantigene wie Rezeptoren für Proteasen oder Wachstumsfaktoren durchflußzytometrisch oder mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert werden. Die Analyse von Zellbestandteilen (z.B. RNA, DNA, Zellmetaboliten) ist ebenfalls möglich. Nach Detergenzbehandlung oder Fixierung können mittels durchflußzytometrischer Multiparameteranalyse gleichzeitig intrazelluläre und Oberflächenantigene sowie nukleäre DNA (Ploidie, S-Phase) analysiert werden.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCH ERMITTELTE S-PHASEFRAKTION IST EIN STÄRKERES PROGNOSEKRITERIUM BEIM NODAL-NEGATIVEN MAMMAKARZINOM ALS IMMUNHISTOCHEMISCH BESTIMMTE MIB1-PROLIFERATIONSRATE

Nadia Harbeck, Peer Dettmar[1], Christoph Thomssen, Lothar Pache, Fritz Jänicke, Manfred Schmitt, Walther Nathrath[1] und Henner Graeff.

Frauenklinik und [1]Institut für Pathologie der Technischen Universität München.

Die Proliferationsmarker S-Phasefraktion (SPF) und MIB1-Proliferationsrate (MIB1-PR) wurden retrospektiv an benachbarten formalinfixierten Paraffinschnitten von 90 nodal-negativen Mammakarzinomen bestimmt. Die durchflußzytometrische SPF-Bestimmung wurde mittels einer modifizierten Hedley-Methode an herausgelösten reinen Zellkernen vorgenommen und SPF anhand des ModFit Programmes (Verity, Maine, USA) berechnet. Die immunhistochemische Färbung des Antigens Ki-67 erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers MIB1 (Dianova, Hamburg) und der APAAP Technik. Der Prozentsatz gefärbter Zellkerne unter 500 zufällig gewählten Tumorzellkernen wurde als MIB1-PR bezeichnet. Mittels isotoner Regressionsanalyse wurden für SPF (8 %) und MIB1-PR (25 %) optimierte Schwellenwerte berechnet: 61 (68%) Tumoren hatten eine niedrige (≤ 8 %) und 29 (32 %) eine hohe (> 8 %) SPF; 75 (83 %) eine niedrige (≤ 25%) und 15 (17 %) eine hohe (> 25 %) MIB1-PR. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 34 Monate (9-72 Monate). Es bestanden signifikante Korrelationen zwischen SPF und Tumorgröße ($p=0,041$) sowie Steroidhormonrezeptorstatus ($p=0,03$), außerdem zwischen MIB1-PR und Grading ($p=0,018$) sowie medullärem Tumortyp ($p<0,05$). Zwischen SPF und MIB1-PR wurde eine signifikante Korrelation nur bei aneuploiden Tumoren ($p=0,025$) gefunden. In der univariaten Analyse waren SPF ($p=0,0028$) und MIB1-PR ($p=0,0224$) statistisch signifikante Prognosefaktoren für das rezidivfreie Überleben. In der Multivarianzanalyse war SPF jedoch der einzig signifikante Prognosefaktor ($p=0,0073$), MIB1-PR und etablierte Prognosefaktoren (Tumorgröße, Menopausen-, Steroidhormonrezeptorstatus, Grading, Lymphangiosis carcinomatosa, Tumornekrose) hatten keine signifikante Bedeutung für das rezidivfreie Überleben. Die durchflußzytometrisch bestimmte SPF war in dieser Studie prognostisch stärker als der immunzytochemisch bestimmte Proliferationsmarker MIB1-PR und scheint daher für die klinische Anwendung beim nodal-negativen Mammakarzinom besser geeignet zu sein.

Einfluß der Markierungstechnik von Glycosaminoglykanen auf die Bindung an Leukozyten

J. Harenberg

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

Wir haben die Bindung von Glycosaminoglykanen an Leukozyten mittels Fluoreszenz-markierter Substanzen untersucht (Cytometry, im Druck). Im folgenden wird auf die Beeinflussung der Bindung verschiedener fluoreszent markierter Glycosaminoglykane auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten eingegangen. Fünf Fitc-markierte GAGs wurden hergestellt: niedermolekulares Heparin-Tyramin-Fitc (LMMH-Tyr-Fitc) mit einem Molekulargewicht von 3.700 Dalton und 8.100 Dalton, bei denen Fitc durch Endpunktsynthese an GAG synthetisiert wurde, 3 GAG-Präparationen mit einer Synthese von Fitc an die Carboxylgruppen: LMMH-Fitc, LMM-Dermatansulfat-Fitc (LMM-DES-Fitc) und eine Kombination aus DES und LMMH markiert mit Fitc (Sulodexide-Fitc).

Ergebnisse: 1) Die GAG-Präparationen, die Heparin enthalten, binden dosisabhängig an Leukozyten, Dermatansulfat bindet nicht an Leukozyten. 2) Die Endpunkt-markierten LMMH-Präparationen binden höher als die LMMH-Präparationen, die mit Fitc über die Carboxylgruppen markiert wurden. 3) LMMH-Tyr-Fitc bindet auf molarer Basis gleich viel an Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten.

Schlußfolgerung: Die Bindung von Fitc an die Zuckerkette der GAGs reduziert die Affinität an Leukozyten. Die Bindung hängt mehr von dem Grad der Sulfatierung als von der Kettenlänge der Heparine ab. Alle 5 GAG-Präparationen können für Affinitätsstudien auf zellulärer Ebene eingesetzt werden.

Die Bedeutung serieller Durchflußzytophotometrie während Chemotherapie für die Entwicklung individueller Behandlungsstrategien bei soliden Tumoren

J Hemmer, Universität Ulm, Sektion für Tumorbiologie

Die Fähigkeit zur Absiedelung von Metastasen und lokaler Rezidivtumoren bei oralen Plattenepithelkarzinomen ist nahezu ausschließlich auf aneuploide Zellpopulationen beschränkt. Dies spiegelt sich auch in der ploidiespezifischen Prognose wider: Nach radikalem chirurgischen Eingriff überleben 90% der Patienten mit diploidem Primärtumor länger als 5-Jahre, jedoch nur 36% des aneuploiden Kollektives. Um zu untersuchen, ob die selektive Vernichtung der hoch-malignen, aneuploiden Tumorzellen zu einer Verbesserung der Prognose bei diesen Patienten führt, wurden bei 53 Patienten vor, während und nach Induktions-Chemotherapie Tumorbiopsien entnommen und durchflußzytophotometrisch untersucht. In allen Fällen konnte eine deutliche Reduktion der aneuploiden Tumorzellen während der Therapie festgestellt werden. Dies zeigt, daß der aktuelle zytotoxische Effekt einer Behandlung zu jedem Zeitpunkt individuell kontrolliert werden kann. Tatsächlich war das Ausmaß der Tumorreduktion bei der Gruppe am größten, bei der nach der Chemotherapie keine aneuploiden Zellen mehr nachweisbar waren. Die 5-Jahresprognose bei Patienten mit vollständigem Verschwinden aneuploider Zellen war allerdings nicht signifikant günstiger als bei Patienten mit persistierenden aneuploiden Zellen. Mit Hilfe der Bromodeoxyuridinmethode war es außerdem möglich, auch den zytostatischen Effekt zu jedem Zeitpunkt der Therapie abzuschätzen: Eine Akkumulation der Tumorzellen in der späten S-Phase bei vollständigem Rückgang der BrdU-Markierung spiegelte offensichtlich eine komplette Blockierung der Proliferation wider, während der Nachweis BrdU-positiver Zellen auch während der Chemotherapie als unvollständige Zytostase interpretiert werden mußte. Die funktionelle Verknüpfung zwischen zytotoxischem und zytostatischem Effekt zeigte sich in der Beobachtung, daß ein deutlicher Rückgang aneuploider Tumorzellen nur bei vollständiger Blockierung der Proliferation erreicht werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Bestimmung der aktuellen Wirkung einer Behandlung auf die Tumorzellen zur Entwicklung von flexiblen, auf die individuelle Reaktion eines Tumors abgestimmter Therapiestrategien beitragen kann.

DIFFERENT APPROACHES TO STUDY THE NUCLEOLAR TERRITORY DURING THE CELL CYCLE

D. Hernandez-Verdun, C. Masson and R. Junera

Institut Jacques Monod, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

In the nucleoli, the ribosomal genes (rDNA) are present as tandem repeats and are the most frequently transcribed genes in cycling cells. The repetitiveness of the rDNA is an advantage that should facilitate the analysis of the 3-D organization of genes during interphase. This makes it possible to investigate the *in situ* organization of transcribed and non transcribed genes of the same locus and also the *in situ* organization during gene replication within the structural context of the cell.
Identification of the interphase stages was performed in single cells using DNA quantification by cytometry for the G_1 and G_2 phases while the S phase was identified by immunolabelling of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The 3-D organization of the rDNA in the nucleolus was analyzed by fluorescence *in situ* hybridization using confocal microscopy. The rDNA was heterogeneously distributed in each nucleolus during G_1, S and G_2, with alternate sites of clustered genes (spots) and of genes in more extended configurations. During mid-S phase, rDNA replication occurs inside nucleoli and at different sites of the same locus simultaneously. In electron microscopy, the fine 3-D structure of G_1 and G_2 nucleoli was reconstructed after specific contrast of DNA and RNA, digitization of the serial section images and computer-assisted 3-D architecture. Fibrillar centers (FCs) formed discrete structures (about 10 in G_1 and 20 in G_2) connected by a network of the dense fibrillar component. The 3-D arrangement of the FCs in G_1 and G_2 are similar to the rDNA spots. In conclusion, the architecture of the nucleoli during interphase reflects the distribution of the rDNA that is characterized by alternation of clustered and extended genes.

Quantitative durchflußzytometrische Meßverfahren mittels fluoreszenter Partikel ('beads')

H.-G. Höffkes und G. Schmidtke, Abteilung für Hämatologie, Zentrum für Innere Medizin, Universität Essen, Hufelandstraße 55, 45122 Essen

Durchflußzytometrischen Messungen in der klinischen Anwendung erfordern qualitätssichernde Maßnahmen der Gerätekalibrierung, Datenacquisition und Datenanalyse. Die quantitative Datenanalyse setzt eine valide und reliable Gerätekalibrierung voraus, eine Forderung die im Rahmen der Etablierung der Zulassungsverfahren für diagnostische Testsysteme auch auf europäischer Ebene für die Standardisierung zellulärer Meßsysteme gefordert wird. Der Einsatz definierter fluoreszenter Partikel ('beads') als Standard zur geräte- und anwenderunabhängigen Kalibrierung und Referenz ermöglicht die Angabe der Fluoreszenzintensitäten als einen Meßwert zum Vergleich verschiedener Laboratorien.

Erfreulicherweise stehen mittlerweile für alle in der Routine verwendeten Emissionsspektren entsprechend definierte Partikel zur Verfügung. Unterschiede bestehen in der Art der Partikel (z.b. künstliche oder natürliche Partikel) und der Fluorochrombindung (Fluorochrom bindende Partikel oder selbständig emittierende Partikel). Es wird die Fluoreszenzintensität der mit Fluorochrom gebundenen Partikel bzw. der selbst-emittierenden Partikel bestimmt und ermöglicht per mathematischem Dreisatz eine Funktion zu errechnen, die einer gemessenen Fluorszenzintensität eine exakte Menge an gelöstem Fluorochrom über die Intensität des gebundenen Fluorochroms der Partikel definiert. Dieser Wert ist definiert als 'molecules equivalent of soluble fluorochrom (MESF)' oder 'molecules equivalent of fluorochrom (MEF)' in Abhängigkeit des Partikelsystems.

Für die quantitative Immunphänotypisierung ist ein indirekter Immunfluoreszenz-Test entwickelt ('quantitative immuno-fluorescence indirect assay', Qifikit®, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg). Dieser Test standardisiert die Bindung monoklonaler Antikörper an der Zelloberfläche und transformiert bislang arbiträre Fluoreszenzeinheiten ('mean fluorescence intensity (MFI)') in absolute Werte der gebundenen Antikörper pro Zelle, die der Anzahl der Antigene pro Zelle entspricht. Das Prinzip dieses Testes beruht auf der Ermittlung der sättigenden Konzentration des Primärantikörpers durch Titration gegen das jeweilig zu analysierende Antigen mittels durchflußzytometrischer Analyse. Entsprechend dem Meßverfahren der fluoreszierenden Partikel wird mit definierten fluoreszierenden Partikeln eine Eichkurve für die Antigendichte entwickelt. Der Unterschied zu den Kalibrierungspartikeln besteht in der Ermittlung absoluter Antigendichten gegenüber MESF-Werten. Hierzu sind Partikel notwendig, die über eine bekannte und reproduzierbare "Antigendichte" verfügen. Nach Inkubation des Sekundärantikörpers und Analyse der Fluoreszenzintensität kann dann über ein Rechenprogram (z.B. TallyCAL®, DAKO) die Antigendichte der untersuchten Epitope ermittelt werden. Der Vorteil der quantitativen Immunphänotypsierung besteht in der Angabe eines standardisiert ermittelten Ergebnisses ('Antigendichte pro Zelle') für Messungen, die bislang nur mit arbiträren Maßeinheiten qualifiziert werden konnten sowie den beliebig analysierbaren Antigenen durch den indirekten Immufloreszenzansatz.

ISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN AUS DEM PERIPHEREN BLUT MITTELS MAGNETISCHER ZELLSORTIERUNG IM HOCHGRADIENTENFELD

Alexander Horst*, Andreas Radbruch#, Stefan Miltenyi* and Jürgen Schmitz*. * Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach und #Institut für Genetik, Universität zu Köln, Köln.

Wir haben eine schnelle Methode zur effizienten Isolation von funktionell intakten, hochreinen dendritischen Zellen (DC) aus dem menschlichen peripheren Blut (PB) mittels magnetischer Zellsortierung im Hochgradientenfeld (MACS) entwickelt. Die Anreicherung der DC aus mononukleären Zellen des PB (PBMC) erfolgte durch magnetische Depletion von CD3, CD14, CD16 sowie CD19 exprimierenden Zellen und anschließende Anreicherung von CD4 oder HLA-DR positiven Zellen. Mit dieser Methode gelang es uns, DC von einer ursprünglichen Frequenz von etwa 1% in PBMC auf bis zu 99,5% anzureichern. Frische DC können morphologisch in zwei Unterpopulationen aufgeteilt werden: runde Zellen mit runden oder leicht ovalen Kernen und weniger runde Zellen mit gelappten Kernen. Nach einer Kulturperiode entwickeln PB-DC die typische dendritische Morphologie; sie vergrößern sich und entwickeln Fortsätze. Die Immunophänotypische Untersuchung von frisch isolierten PB-DC mittels Drei-Farben-Fluoreszenz zeigte die Expression des c-kit Rezeptors (CD117) sowie des hochaffinen FcεRezeptors (FcεRI). Wie durch intrazelluläre Zytokinfärbungen nachgewiesen werden konnte, produzieren PB-DC, die mit einer löslichen Form des CD40 Liganden stimuliert wurden, IL-12.

Kombination von B-Zell-Purging und CD34+ -Selektion zur Lymphomzellentfernung aus Blutstammzelltransplantaten

P. Hundsdörfer[1], S. Fruehauf[2], R. Höft[1], R. Haas[2], W. J. Zeller[1]
[1]Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Forschungsschwerpunkt Diagnostik und Experimentelle Therapie
[2]Medizinische Klinik und Poliklinik V der Universität Heidelberg

Bei malignen Lymphomen ist die Transplantation autologer peripherer Blutstammzellen nach Hochdosis-Konditionierungstherapie dabei, die autologe Knochenmarkstransplantation zu ersetzen. Dies liegt zum Teil an der schnelleren hämatologischen Rekonstitution. Ein Problem der Transplantation autologer hämatopoetischer Stammzellen ist eine mögliche Kontamination mit Tumorzellen, die ein Rezidiv verursachen könnten. Bei malignen Lymphomen können Tumorzellen mittels direkter B-Zell-Depletion oder CD34+ -Selektion entfernt werden. Mit dem Ziel einer effizienteren Tumorzellentfernung, kombinierten wir direkte B-Zell-Depletion mit zwei verschiedenen CD34+ -Selektionstechniken - der immunomagnetischen CD34+ -Selektion (IMB) oder der CD34+ -Selektion durch eine Biotin-Avidin-Säule (BAC) - und verglichen die Ergebnisse mit denen einer alleinigen CD34+ -Selektion. Follikuläre Lymphomzellen (K422-Linie) wurden nach Membranfärbung mit dem fluoreszierenden Farbstoff PKH26 in verschiedenen Anteilen (2.33 % - 10.13 %, n=24) zu Proben aus Leukapheresepodukten hinzugefügt, die 0.18 % - 8.1 % CD34+ -Zellen enthielten.
Nach B-Zell-Depletion mit Antikörpern gegen CD19, CD20, CD22, CD23 und CD37 in Kombination mit BAC-Selektion (n=3) lag die mittlere Reinheit an CD34+ -Zellen in der angereicherten Fraktion bei 76.95 % ± 17.72 % (Mittelwert ± SEM), die mittlere Ausbeute der CD34+ -Zellen bei 35.3 % ± 12.06 % und die mittlere Purgingeffizienz bei log 4.32 ± log 0.21. Nach B-Zell-Depletion in Kombination mit IMB-Selektion (n=6) lag die mittlere Reinheit bei 40.75 % ± 30.19 %, die CD34+ -Ausbeute bei 47.4 % ± 10.95 % und die Purgingeffizienz bei log 3.68 ± log 0.42. Die der IMB-Selektion vorausgehende B-Zell-Depletion steigerte die Effektivität der Tumorzelldepletion, verglichen mit alleiniger IMB-Selektion (log 3.3 ± log 0.86), nicht. Im Gegensatz dazu konnte mit kombinierter B-Zell-Depletion und BAC-Selektion eine signifikant ($p<0.01$) höhere Purgingeffizienz als bei alleiniger BAC-Selektion (log 3.02 ± log 0.67) erreicht werden. Möglicherweise gelangten einige B-Zell-Bead-Komplexe oder antikörperbeladene B-Zellen in den CD34+ -Selektionsschritt, wurden während der CD34+ -Selektion mit immunomagnetischen Beads erneut selektiert und in der CD34+ -Fraktion zurückbehalten. Das Biotin-Avidin-Selektionssystem weist dagegen keine spezifischen Bindungsstellen für B-Zell-Komplexe auf.
Eine Kombination verschiedener Purging-Verfahren erscheint geeignet, um eine maximale Tumorzellentfernung zu erreichen.

A New 3-Colour, Lyse-No-Wash (LNW), Absolute Count System for Immunophenotyping and HIV Monitoring

Luc Ketele, Becton Dickinson Immunocytometry Systems Europe, Erembodegem, Belgium

The presentation will focus on New horizons in Immunophenotyping and HIV monitoring.

We will address a new concept of identifying Lymphocyte subsets, using TriTEST ™ Reagents with fluorescence triggering and gating. Unlike traditional methods of light-scatter gating, where lymphocyte gate purity and recovery are concerns, TriTEST reagents allow you to directly gate the CD45-positive lymphocyte population or the CD3-positive T lymphocyte population, providing unambiguous identification.

In addition, we will focus on important features of the new 3-Colour, Lyse-No-Wash, Absolute Count System such as: Direct Absolute Count Capability using TriTEST Reagents, Automated Sample Introduction and Enhanced Data Analysis.

Sensitiver Nachweis von spezifischen Nukleinsäurefragmenten durch die Lumineszenzmarkierung mit "Terbium-Nukleotiden"

S. Klingel, M. Collasius und G. Valet
Arbeitsgruppe Zellbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, 82152 Martinsried

Die Empfindlichkeit durchflußzytometrischer Untersuchungen von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) wird durch gestreutes Anregungslicht und zelluläre Autofluoreszenz erheblich eingeschränkt. Falls Nukleinsäurefragmente nicht in so hohen Kopienzahlen vorliegen wie z.B. rRNA-Moleküle und häufig vorkommende mRNA-Moleküle wird dadurch ihr spezifischer Nachweis mit herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen, wie FITC, wesentlich erschwert. Die Markierung von Hybridisierungssonden mit lumineszenten Metallkomplexen kann das Signal-Rausch-Verhältnis entscheidend verbessern, da diese nach Anregung mit einem kurzen Lichtblitz wesentlich länger Photonen emittieren als zelluläre Verbindungen (10^{-3} sec statt nur 10^{-7} sec). Nach einer Verzögerungszeit von 10^{-5} Sekunden wird deshalb das spezifische Lumineszenzsignal nicht mehr durch ungefärbtes, fluoreszentes Zellmaterial beeinflußt.

Wir haben neuartige Desoxyribonukleosidtriphosphate entwickelt, die mit stabilen lumineszenten Terbiumkomplexen gekoppelt sind ("Terbium-Nukleotide") und die eine enzymatische, direkte Markierung von Nukleinsäuresonden ermöglichen. Diese dUTP-Derivate können anstelle von dTTP durch Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase, Nick-Translation, Random-Priming und PCR leicht in DNA eingebaut werden. Analog aufgebaute Terbium-Ribonukleotide erlauben die effiziente Markierung von RNA-Sonden durch *in vitro* Transkription mit den RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3 und T7. Der Nachweis der lumineszenten Sonden in Agarosegelen war in den meisten Fällen bereits empfindlicher als die unspezifische Färbung mit Ethidiumbromid, obwohl die Photonendichten bei der Anregung mit Blitzlampen eindeutig suboptimal sind. Im Gegensatz hierzu wird die Lumineszenzanregung mit gepulsten UV-Lasern die Messung von Picogramm-Mengen an Nukleinsäuren ermöglichen, was bisher nur mit radioaktiven Isotopen oder enzymatischer Signalverstärkung möglich ist.

In Kombination mit einer zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion in Durchflußzytometern, Mikroskopen oder anderen Nachweissystemen sollten sich lumineszente Sonden als außerordentlich nützlich für sensitive *in situ* Hybridisierungen, aber auch für *in situ* Markierungsreaktionen erweisen. Hierzu zählt insbesondere der Nachweis von DNA-Strangbrüchen bei der Apoptose.

Die Bedeutung der DNA-Ploidie des Primärtumors für den Nachweis okkulter Metastasen bei oralen Plattenepithelkarzinomen.

K Kraft*, A Schouba#, J Hemmer#
* Abt. Pathologie, Bundeswehrkrankenhaus Ulm
# Sektion für Tumorbiologie, Universität Ulm

Eine durchflußzytzophotometrische Untersuchung an 485 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle hat gezeigt, daß nur 14% der Fälle mit diploiden Tumoren aber 53% des aneuploiden Kollektives histologisch gesicherte Lymphknotenmetastasen bei Erstbehandlung aufwiesen. Bei Patienten, bei denen keine klinische Indikation für eine Lymphknotentherapie bestand, trat bei 8% der diploiden und bei 23% der aneuploiden Fälle innerhalb von zwei Jahren eine verzögerte Metastasierung auf. In einer dreijährigen Pilotstudie wurden daher auch bei denjenigen Patienten eine Lymphknotentherapie durchgeführt, die einen aneuploiden Primärtumor aufwiesen obwohl sowohl durch sonographische als auch durch computertomographische Untersuchung keine Anzeichen einer Metastasierung vorlagen. Jeder Lymphknoten wurde in 100µ-Abständen histologisch durchgemustert. Bei 15 Patienten mit diploidem Primärtumor, die aufgrund auffälliger klinischer Befunde einer Lymphknotenbehandlung unterzogen wurden, konnte nur in einem Fall (7%) der Verdacht auch histologisch bestätigt werden. Bei 9 von 38 Patienten mit aneuploidem Primärtumor (23%), die aufgrund einer fehlenden klinischen Indikation nicht therapiert worden wären, fanden sich histologisch gesicherte Lymphknotenmetastasen. Diese histopathologischen Ergebnisse stimmen vollständig mit den oben erwähnten Resultaten einer verzögerten klinischen Metastasierung überein. Auch diese Untersuchung bestätigt ein erheblich höheres Risiko einer Metastasierung bei Aneuploidie des Primärtumors während Metastasen bei diploiden Tumoren, unabhängig von Größe oder histologischem Grading, nur sehr selten vorkommen. Eine Lymphknotentherapie bei diploidem Primärtumor sollte nur bei strenger klinischer Indikation durchgeführt werden. Bei einer Behandlung klinisch unauffälliger Lymphknoten bei Aneuploidie des Tumors muß allerdings eine Übertherapie bei der Mehrzahl der Fälle in Kauf genommen werden.

Differenzierung von Ovarialtumoren mit Bildanalyse

W. Kühn, M. Ruhnke, A. Ditzenbach und H. Weitzel
Frauenklinik am Klinikum Benjamin Franklin der FU Berlin,
Hindenburgdamm 30, D-12200 Berlin

Die Differenzierung von Ovarialtumoren bereitet häufig diagnostische Schwierigkeiten. Besonders die Borderline-Veränderungen stellen sowohl den Pathologen als auch den Kliniker vor Probleme. Der histologische Unterschied des Borderline-Tumors vom Ovarialkarzinom ist das Fehlen von Invasivität, die allerdings durch sogenannte Implantate vorgetäuscht werden kann. Ziel dieser Untersuchung ist eine Differenzierung von Ovarialtumoren mit bildanalytischer Zytometrie.

Mit einem CAS 200 Bildverarbeitungssystem wurden 55 Ovarialtumore unterschiedlicher Dignität vermessen. An nach Feulgen gefärbten Zellkernen wurden integrierte optische Dichte (IOD), Kernfläche, Kernform, Entropie, Blobness und Ploidie bestimmt.

Die Mittelwerte der gemessenen Parameter sind in Tabelle 1 angegeben:

	IOD	Fläche	Form	Entrop.	Blob.
benigne	102,67	54,83	17,37	1,4735	0,3973
Borderline	127,74	60,94	17,86	1,4493	0,4114
Karzinom	271,78	129,41	17,38	1,4688	0,3892

Bei benignen Veränderungen hatten 4,3%, beim Borderline-Tumor 12,0% und beim Ovarialkarzinom 25,5% der Zellen einen DNA-Gehalt > 5c. Noch deutlicher sind die Unterschiede bei den Zellen > 9c (Benigne 0%, Borderline 0,22%, Ovarialkarzinom 11,3%).

Borderline-Tumore unterscheiden sich von Ovarialkarzinomen am deutlichsten in DNA-Gehalt und Kerngröße. Bei den Kerntexturparametern sind die Unterschiede geringer. Die Bestimmung der Kernform ist methodisch begrenzt. Mit bildanalytischer Zytometrie ist eine Differenzierung zwischen Borderline-Tumoren und Ovarialkarzinomen mit hoher Sicherheit möglich. Dagegen ist die Unterscheidung zwischen Borderline-Tumoren und benigenen Veränderungen wie z.B. proliferierenden Zystadenomen weniger zuverlässig.

Neue Entwicklungen in der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

J. Kukulies
Carl Zeiss Jena GmbH, Unternehmensbereich Mikroskopie, Systemvertrieb Deutschland

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) hat in den letzten Jahren in der Zellforschung enorm an Bedeutung gewonnen: Räumlich intakte Zell- und Gewebepräparate können nicht-invasiv in Serien optischer Schnitte zerlegt werden. Dadurch erhält man wesentlich schärfere Fluoreszenzbilder und kann über verschiedene Softwareprogramme räumliche Rekonstruktionen fluoreszenz-markierter Strukturen bis in subzelluläre Bereiche generieren. Genauso lassen sich verschiedene, fluoreszenz-markierte Proben gleichzeitig darstellen, um mehrere Parameter in fixierten oder lebenden Zellen simultan zu lokalisieren.

Zur Fluoreszenzanregung stehen in CLSM's Laser mit Wellenlängen 351, 364, 457, 488, 514, 543, 568, 633, 647 nm zur Verfügung. Dabei können HeNe-Laser (543, 633 nm) integriert sein, während luftgekühlte Ar-Laser über optische Fasern oder "optisches Bank-Prinzip" kaskadiert werden können. Auf der Emissionsseite können bis zu 4 Detektoren (PMT's) parallel eingesetzt werden.

Die Software in CLSM's steuert im wesentlichen die Einstellung der Geräteparameter (Laserwahl, Abschwächung, Scan-Geschwindigkeit, Zoom-Faktor, Konfokalität-Pinhole-Durchmesser, Z-Schnitt-Serien usw.). Darüber hinaus existieren Softwarepakete für die 3D-Rekonstruktion und die Darstellung / Auswertung konfokaler Bilder, die von lebenden Zellen über die Zeit generiert werden.

Im Übersichtsvortrag werden Beispiele für die Anwendung von CLSM's in molekularer Zellforschung illustriert und neue Trends diskutiert.

Der Nachweis intrazellulärer mdr-1-mRNA mit RT-PCR und Durchflußzytometrie

D. Laßner, J. Milde, M. Ladusch*, K. Drößler* und H. Remke

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, *Institut für Zoologie, Universität Leipzig, Liebigstraße 16, 04103 Leipzig

Das MDR1-Gen, welches für das Auftreten der "Multi Drug Resistance" (mdr) in humanen Zellen verantwortlich ist, kodiert ein Transportprotein (P-170) mit geringer Spezifität (1). Durch die Expression des P-170 wird die Aufnahme von Zytostatika verhindert und dies führt zu einer Resistenz in menschlichen Tumoren und Normalgeweben gefunden.

Der mdr1-Phänotyp wird häufig erst durch die angewandte Chemotherapie induziert und die Bestimmung der mdr1-mRNA in weißen Blutzellen von Leukämiepatienten ist ein guter Marker dafür. Andererseits wird die Expression des P-170 auf Knochenmarkszellen als zweiter Stammzellmarker, neben dem Protein CD 34, beschrieben (2).

Die mdr-1 mRNA läßt sich durch die PCR nach Umschreibung der RNA in cDNA (RT-PCR) amplifizieren und dann mit konventionellen Methoden nachweisen (3).

Für den Nachweis der mdr-1-mRNA in Leukozyten wurde In-cell-PCR genutzt (4). Diese Methode basiert auf der Amplifikation von mdr-1 mRNA mit RT-PCR in formalinfixierten Zellen mit fluoreszierenden Primern und der nachträglichen Analyse der Zellen mit der Durchflußzytometrie.

Diese Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit den konventionellen Bestimmungen der mdr-1-mRNA. Die Methode ist besonders für die Untersuchungen von Leukämie auf Zellebene geeignet.

Literatur:

(1) Roninson I., Biochem. Pharmacol. 1992, 43:95-103

(2) Chaudhary PM, Roninson I., Cell 1991, 66: 85-94

(3) Koehler T , Lassner D, Remke H., Eur.J.Clin.Chem.Biochem. 1993, 4:254

(4) Embleton MJ, Gorochov G, Jones PT, Winter G., Nucl.Acids Res.1992, 20:3831-38

Vergleich der BrdU Inkorporation und der Expression von PCNA und Ki-67 bei HL-60 Zellen nach Induktion und Bestrahlung.

M. Lindinger°, A. Sendler*°, K.-P. Gilbertz°, D. van Beuningen°

°Institut für Radiobiologie, Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesen der Bundeswehr, 80901 München, *Chirurgische Klinik und Poliklinik der TU München, Klinikum rechts der Isar, 81644 München

In der Onkologie spielt die Proliferation eine wichtige Rolle. Zur Bestimmung der Wachstumsfraktion werden proliferationsassoziierte Antigene (PCNA, Ki-67) oder die BrdU (Bromdeoxyuridin) Inkorporation eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind widersprüchlich. In dieser Studie wurden an der HL-60 Leukämiezellilinie, die durch verschiedene Agenzien in ihrer Proliferation moduliert werden kann, diese Proliferationsmarker analysiert. Die Expression der Antigene und die BrdU Inkorporation wurde nach immunhistochemischer Färbung durchfluß-zytometrisch dargestellt und miteinander verglichen.

Unbehandelte HL-60 Zellen wachsen in den ersten vier Kulturtagen exponentiell und gehen dann in eine Plateauphase über. Die PCNA Expression verbleibt während der Untersuchungszeit (7 Tage) bei 90 %. Die Ki-67 Expression beträgt nach Kulturbeginn 70%, verbleibt vom 1. - 5. Tag bei über 90% und sinkt bis zum siebten Tag auf 70% ab. Der BrdU LI (labelling index) liegt bis Tag 5 bei 50% und fällt bis zum 7. Tag auf 10% ab. Nach Modulation der Proliferation (Induktion) durch DMSO oder Isotretinoinsäure korreliert die Ki-67 Expression besser mit dem BrdU-LI und der Wachstumskurve als die Expression von PCNA. Nach Bestrahlung dagegen werden sowohl PCNA als auch Ki-67 vermehrt exprimiert. Bei den nichtinduzierten HL-60 Zellen zeigt sich in der G2-Phase ein radiogen induzierter, dosisabhängiger PCNA Expressionsanstieg.

In unserem Model scheint die durch Ki-67 ermittelte Wachstumsfraktion ein exakterer "Proliferationsmarker" zu sein

Vergleich durchflußzytometrischer Methoden für die Analyse apoptotischer Zellen

Kristin Marx, Michael Nüsse
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, AG Durchflußzytometrie,
Ingolstädter Landstr.1, D 85758 Oberschleißheim

Die Anwendbarkeit einer Methode zur Identifizierung und Quantifizierung apoptotischer Zellen ist abhängig vom jeweiligen Zellsystem, der Art des Apoptose-induzierenden Agens, der speziellen Information die man sucht und von technischen Beschränkungen. Es wurden drei verschiedene durchflußzytometrische Methoden aus der Literatur verglichen, mit denen man Dosis- und Zeitabhängige Effekte untersuchen kann. Zusätzlich wurde eine neue Methode zur Detektion apoptotischer Körperchen benutzt, einem charakteristischen morphologischen Merkmal apoptotischer Zellen.
Das Zellsystem der Wahl war die humane myeloische Leukämiezellinie HL60, zur Induktion der Apoptose wurde das chemotherapeutische Agens Camptothecin, ein Topoisomerase-I-Inhibitor, verwendet. Die erste Methode basiert auf einer Doppelfärbung Ethanol-fixierter Zellen mit HOECHST 33342 und Propidiumjodid (PI). Nach UV Anregung zeigen apoptotische Zellen eine verminderte Blaufluoreszenz. Die beiden anderen Methoden, nämlich die In Situ Nick Translation (ISNT) und die Sub-G_1-Peak Methode, beziehen sich auf die typischen apoptotischen DNA Strangbrüche. Bei der ISNT bleibt die DNA in der Zelle und die Strangbrüche werden direkt mit Fluorescein gelabelt. Bei der Sub-G1-Peak Methode werden die DNA Fragmente rausgewaschen, so daß apoptotische Zellen nach PI-Färbung anhand ihres verminderten DNA Gehaltes identifiziert werden können. Nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Camptothecin zeigen alle drei Methoden einen ähnlichen zeitlichen Verlauf mit kleinen Unterschieden in der Anzahl apoptotischer Zellen. Ähnliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeiten, jedoch quantitative Unterschiede konnten mit der neuen Technik gemessen werden, weil die Zellmembranen zerstört werden mußten um die apoptotischen Körperchen zu erhalten.

Flow-Sortierung von PRINS-markierten pflanzlichen Chromosomen

Armin Meister, Uta Pich und Ingo Schubert

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
D-06466 Gatersleben

Die Isolierung einzelner Chromosomentypen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Konstruktion chromosomenspezifischer DNA-Bibliotheken und die Lokalisierung von Genen auf einzelnen Chromosomen. Ein wichtiges methodisches Hilfsmittel dazu ist die Flow-Sortierung. Während eine Vielzahl von tierischen Chromosomensätzen erfolgreich sortiert wurde, liegen entsprechende Ergebnisse für Pflanzen nur vereinzelt vor. Das ist einerseits durch die Existenz einer Zellwand bei pflanzlichen Zellen und damit verbundene präparative Schwierigkeiten bedingt, andererseits dadurch, daß Pflanzen viel häufiger morphologisch sehr ähnliche Chromosomen mit geringen Größenunterschieden haben. Damit verbunden sind sehr geringe Unterschiede im DNA-Gehalt, so daß nur in wenigen Fällen eine Trennung mit Hilfe von DNA-spezifischen Farbstoffen möglich ist.
An dem von uns bevorzugten Forschungsobjekt *Vicia faba* (Ackerbohne) mit sechs Chromosomenpaaren kann deshalb nur ein Chromosom auf konventionelle Weise mit Hilfe der Durchfluß-Zytometrie auf der Grundlage des DNA-Histogramms isoliert werden. Die Verwendung rekonstruierter Karyotypen, bei denen Chromosomenumbauten zu deutlich unterschiedlich großen Chromosomen führten, erweiterte das Spektrum der sortierbaren Chromosomen.
Grundsätzlich neue Möglichkeiten eröffnet die FITC-Markierung bestimmter DNA-Sequenzen auf den einzelnen Chromosomen mit Hilfe der PRINS- (primed *in situ*)-DNA-Markierung, die in Chromosomensuspension durchgeführt werden kann. Durch Kombination des DNA-spezifischen Propidium-Jodid-Signals mit dem sequenz-spezifischen FITC-Signal war eine Sortierung aller sechs Chromosomentypen des Karyotyps ACB mit hoher Reinheit (durchschnittlich 95 %) möglich.

PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DER DNA-PLOIDIE UND DER S-PHASE BEIM DUKTALEN ADENOKARZINOM DES PANKREAS

H. Nekarda, J.D. Roder, K. Becker*, A. Rossmann, J.R. Siewert
*Chirurgische Klinik und *Institut für Pathologie, Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Str. 22, 81675 München*

Die Prognose der Patienten mit einem duktalen Karzinom des Pankreas ist im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Tumoren schlecht. Durch Prognosefaktoren sollten die Patienten identifiziert werden, die von einer adjuvanten Therapie profitieren und die Patienten definiert werden, bei denen eine Resektion kein Überlebensvorteil bringt.

Wir untersuchten retrospektiv 69 Patienten mit einem duktalen Pankreaskarzinom, die zwischen 1982 und 1990 reseziert wurden. Bei 32 Patienten (46 %) konnte eine residualtumorfreie Resektion (R0-UICC) durchgeführt werden. Die Ploidie und S-Phase wurde durchflußzytometrisch an Zellkernpräparationen von Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Tumorgewebe untersucht und mit der Software „ Multicycle" analysiert. Die mediane Überlebenszeit des Gesamtkollektives lag bei 13 Monaten (R0: 17 Monaten) mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 10 % (R0: 20 %).

47 Tumore (68 %) des Gesamtkollektives waren aneuploid, bei den R0-resezierten Patienten lag die Aneuploidierate bei 57 %. Die Ploidie war nur mit dem Grading korreliert. Größere S-Phasen waren signifikant mit einem schlechteren Grading, dem R-Status , einer Perineuralkarzinose und einer fehlenden muzinösen Differenzierung des Tumors korreliert. Mit dem Überleben war signifikant das Grading (G1,2 vs. G3,4), die S-Phase (cutoff-value 8 %), die Ploidie (euploid/tetraploid vs. aneuploid) und die WHO-Tumorklassifikation (muzinös vs. nicht muzinös) korreliert. Unabhängige Faktoren waren nur das Grading (RR: 2,3-fach) und die S-Phase (RR: 6-fach). Die mediane Überlebenszeit der 24 Patienten mit einer niedrigen S-Phase war mit 17,5 Monaten signifikant niedriger als bei den Patienten mit einer S-Phase über 8 % (6.5 Monate). Ebenso hatten die 18 Patienten mit einer guten Tumordifferenzierung mit 23 Monaten eine deutlich längere Überlebenszeit als Patienten mit einem schlecht differenzierten Karzinom von 7,5 Monaten.

Zusammenfassend sind die einzigen unabhängigen Prognosefaktoren beim tumorfrei resezierten duktalen Pankreaskarzinom das Tumorgrading und die S-Phase. Mit diesen Parametern können die Patienten in definierte Gruppen zur Evaluierung von adjuvanten Therapiestudien eingeteilt werden.

DER NACHWEIS GERINGER LEUKOZYTEN- UND THROMBOZYTENZAHLEN IN FILTRIERTEN ERYTHROZYTENKONZENTRATEN (FEK) UND PLASMAPRÄPARATEN (FPP)

J. Neumüller, D.W.M. Schwartz*, W.R. Mayr*
Ludwig Boltzmann Institut für Rheumatologie und Balneologie, Wien, Österreich
**Blutspendezentrale des Österreichischen Roten Kreuzes, Wien, Österreich*

Die Entwicklung von Polyester-Flachfiltern (Pall RD1746) ermöglicht eine starke Depletion von Leukozyten (LZ) und Thrombozyten (Th) in FEK und FPP. Eine Depletion der LZ- und Th-Zahlen auf höchstens 5×10^6 respektive 5×10^9 / Unit verhindert in den Empfängern vor allem febrile Transfusionsreaktionen und reduziert das Risiko einer Alloimmunisation durch leukozytäre und thrombozytäre Antigene. In dieser Studie wurde gezeigt, daß mithilfe der Flußzytometrie (FC) eine genaue Quantifizierung residualer LZ und Th in filtrierten Blutpräparaten vorgenommen werden kann.

Die FC-Untersuchungen wurden mit einem FACSort-Gerät (Becton & Dickinson, B&D) unter Verwendung der Lysys-II- oder der CELLQuest-Software (Aquisition) sowie der Lysys-II- oder der Attraktor-Software (Analyse) durchgeführt. Die Absolutzahl der Zellen wurde anhand einer zahlenmäßig definierten Referenzpopulation uniformer und mit FITC- und PE-vernetzter Beads (Standard Brites, Coulter) errechnet. Zur Bestimmung der LZ wurde in FEK und FPP eine Kombination monoklonaler Antikörper (MAK) gegen CD45 (FITC-markiert) und gegen CD14 (PE-markiert; Simultest, B&D) verwendet. 500 µl des FEK oder des FPP wurden mit 50 µl dieser MAK-Mischung 15' inkubiert. Die Erythrozyten wurden mittels 10-minütiger Inkubation mit 10 ml FACS-Lysing Solution (B&D) eliminiert (die Lyse wurde nur im FEK durchgeführt). Die verbleibenden Zellen wurden 2 x in PBS gewaschen, in 450 µl CellFix (B&D) resuspendiert und mit 50 µl Standard Brites gemischt. Die residualen LZ wurden durch Setzen von Gates im FSC x SSC-Doppelhistogramm sowie noch genauer im FL1 x FL2-Doppelhistogramm identifiziert.

Bestimmung residualer Th: 100 µl FRK oder FPP wurden mit 10 µl eines anti-CD41-FITC MAK 15' inkubiert und anschließend 1:10 mit 0.15 M Zitratpuffer, pH 7.4, 1:10 verdünnt. 100 µl dieser Suspension wurden mit 800 µl Zitratpuffer und 100 µl Standard Brites gemischt. Die Th wurden im FL1-Einfachistogramm nach Setzen eines Gates im FSC x SSC-Doppelhistogramm nachgewiesen.

Mit dieser Methodik konnte gezeigt werden, daß eine Filtration von FEK und FPP durch Pall RD1746 Filter eine Reduktion von LZ auf $2.9 \pm 2.3 \times 10^5$ und von Th $3.6 \pm 4.1 \times 10^7$ in FEK und eine Reduktion der LZ auf $7.9 \pm 2.5 \times 10^1$ und der Th auf $1.3 \times 10^8 \pm 3.3 \times 10^7$ in FPP bewirkte. Diese Werte liegen unter dem für die erwähnten Nebenwirkungen kritischen Limit.

ANALYSE VON SORTIERTEN MIKROKERNEN MIT HILFE DER FISH-TECHNIK

M. Nüsse[1], A. Slavotinek[2], B.M. Miller[3]

[1]GSF-AG Durchflußzytometrie, D-85758 Oberschleißheim
[2]Dept. of Clinical Genetics, Churchill Hospital, Oxford
[3]PRPT, Preclinical Division, Hoffmann La-Roche, Basel

Die chromosomale Zusammensetzung sortierter strahleninduzierter Mikrokerne (MK) in Maus 3T3-Zellen und in drei menschlichen Zellinien unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit wurde mit Hilfe der FISH-Technik näher untersucht. Es wurden dazu Zentromer-Proben sowie Chromosomen-spezifische Painting Proben eingesetzt. Die große Mehrheit strahleninduzierter MK in 3T3-Zellen enthielten azentrische Fragmente, mit zunehmendem DNA-Gehalt nahm der Anteil Zentromer-positiver MK jedoch zu, was die Anwesenheit von einem oder mehreren Chromosomen in diesen größeren MK zeigte. Diese Ergebnisse stimmten mit Daten überein, die an fixierten Zellen mit einer Kombination von Zentromer- und Telomer-Proben erhalten wurden. Mit diesen Daten konnte die DNA-Verteilung strahleninduzierten MK, die mit Hilfe der Durchflußzytometrie gemessen wurde, mit einem „Random-Breakage-Modell" quantitativ simuliert werden.
FISH mit Chromosomen-spezifischen Painting Proben wurde zusätzlich eingesetzt, um strahleninduzierte zytogenetische Schäden, die zu MK führen, näher zu untersuchen. Untersuchungen mit vier Painting Proben (Chromosomen Nr. 1, 7, 11, 14) an strahleninduzierten MK in drei menschlichen Zellinien zeigten Abweichungen der erwarteten Häufigkeit Signal-positiver Mikrokerne nur für Chromosom Nr. 7, das im Gegensatz zu den anderen untersuchten Chromosomen in allen Zellinien unterrepräsentiert war. Falls man annimmt, daß die chromosomale Zusammensetzung der MK strahleninduzierte zytogenetische Schäden akkurat wiederspiegelt, unterstützen diese Ergebnisse eine nicht zufällige („non-random") Verteilung strahleninduzierter Chromosomenbrüche.

Ergebnisse des Ringversuchs 1995 zur Standardisierung und Qualitätsprüfung der durchflußzytometrischen DNA-Messung.

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

Der vierte Ringversuch zur Qualitätsprüfung der durchflußzytometrischen DNA-Messung wurde mit Unterstützung der Gesellschaft für Zytometrie im Januar 1995 durchgeführt. 53 Labors erhielten die Testproben zugesandt; 36 Labors führten die Messungen durch und schickten auswertbare Daten zurück.
Die Proben bestanden aus tierischen und menschlichen Zellen und Zellkulturen, die ohne irgendeine Vorbehandlung in Ethanol fixiert waren. Die Teilnehmer wurden gebeten, die Proben nach ihren eigenen Protokollen zu färben und zu messen. Zusätzlich wurden zwei Standardprotokolle vorgeschlagen, um die Heterogenität der Färbemethoden zu vermindern.
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 DAPI-Färbung und HBO-Lampen-Geräten erreicht. Im Vergleich der Ergebnisse der 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 ebenfalls erhebliche Abweichungen.
Die Anwendung der vorgeschlagenen Standardprotokolle und der von den Organisatoren mitgelieferten Reagenzien führte zu einer deutlichen Verbesserung der Ergebnisse. Das DAPI-Standardprotokoll verbesserte die Genauigkeit und Homogenität der Meßdaten und reduzierte die bei der Bestimmung der DNA-Indizes und S-Phase-Anteile beobachteten Abweichungen. Das PI-Standardprotokoll ergab eine leichte Verringerung der Unterschiede bei den DNA-Indizes und S-Phase-Anteilen.
Die Ergebnisse bestätigen, daß die Standardisierung der Färbemethoden eine wirksame Maßnahme darstellt, die Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Daten zu verbessern. Unsere Bemühungen um die Erhöhung und Sicherung der Qualität der durchflußzytometrischen DNA-Messung werden mit der Prüfung von Standardprotokollen und Kontrolle der Geräteeinstellung fortgesetzt werden.

Zytometrische Analyse und Isolierung von transfizierten Zellen anhand von membranständigen Selektionsmarkern

K. Petry, R. Christine, G. Siebenkotten und A. Radbruch
Institut für Genetik, Universität zu Köln, Weyertal 121, D-50931 Köln, Deutschland

Zur molekularbiologischen Untersuchung der Funktion und Expression von Genen werden diese oder ihre Kontrollelemente häufig in transfizierten Zellen untersucht. Konvertionelle Analysen verwenden Enzyme und ihre Aktivitäten als Indikatoren. Nur wenige Methoden erlauben die quantitative Analyse einzelner, lebender Zellen. Wir haben Expressionsvektoren entwickelt, die für membranständiges CD4(human) oder H-2K^k(murin) kodieren. Diese Vektoren erlauben allein oder zusammen die zytometrische Erfassung der Frequenz transfizierter Zellen, die quantitative Erfassung der Expressionsaktivität und die Bestimmung der Expressionskinetik. Transfizierte Zellen von Interesse können für weitergehende Untersuchungen schonend mit MACS oder FACS isoliert werden, auch wenn sie sehr selten sind. Toxische biochemische Selektionen entfallen.
Wir untersuchen mit diesen Vektoren Rekombinationen in B Lyphocyten. Eine Rekombination führt hierbei zur Deletion eines Transkriptionsstop-Signals das dem Membranexon des Indikatorgens vorgeschaltet ist, wodurch das Indikatorgen nach der Rekombination auf der Zellmembran exprimiert wird. Erste Ergebnisse zeigen eine erhöhte Rekombinationshäufigkeit in aktivierten, verglichen mit nicht aktivierten Zellen einer B Zellinie. Zur Zeit analysieren wir, welche Sequnzen des Substrats für diese Rekombination verantwortlich sind.

CMV : h CD4
hMT : m H2-K^k } Kotransfektion

Haben nicht beobachtet: Stillschaltung eines Transgens u. der andere bleibt aktiv (sowohl positive Single Transfektion). Keine Erfahrung über Effekt der intracellulären, physiol. Wirkung Signaldomäne CD4.
Keine Langzeitstabilitätsexpressionsanalyse.

Eichung eines Durchflußzytometers mit Hilfe von fluoreszierender Latexpartikel. Martin Poot, Sharon M. Swan, und K. Sam Wells. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR 97402, USA.

Für die quantitative Durchflußzytometrie ist die tägliche Eichung des Instruments von kritischer Bedeutung. Zum einem benötigt die Durchflußzytometrie ein gut definierter Standardpartikel für die optimale Einstellung des Instruments. Dies könnte eine Probe von intensiv fluoreszierender Latexpartikel sein. Diese Partikel müssen in ihrer Größe und Fluoreszensintensität sehr Homogen sein (CV-Wert von unter 2 %). Umso größer die Fluoreszensintensität des Partikels ist, umso geringer könnte der CV-Wert sein, weil der Beitrag des elektronischen Rauschens des Signalverstärkers geringer sein wird. Für die Mehrparameter-Durchflußzytomtrie ist es notwendig, entweder Latexpartikel für jeden einezelnen Fluoreszenswellenlängenbereich, oder einen Partikeltyp mit sehr starker Fluoreszens in allen Wellenlängenbereichen zur Verfügung zu haben. Solche Partikel wurden in letzter Zeit hergestellt. Für den Vergleich von Messungen von Fluoreszensintensitäten, welche an unterschiedlichen Tagen durchgeführt worden sind, ist es Notwendig, daß für unterschiedliche Instrumentseinstellungen kompensiert werden kann. Herkömlicherweise wird hierzu ein einziger Standard benutzt. Hiermit kann der Durchflußzytometriker jedoch nicht Unterschiede in der Elektronensättigung der Dynoden in den Photomultiplikatorröhren erfassen. Diese zeigen sich dadurch, daß das Verhältnis in der Fluoreszensintensität zweier Partikel sich als Funktion der Hochspannung über der Photomultiplikatorröhre ändert. Um diese Beurteilung des Durchflußzytometers zu ermöglichen, haben wir vor kurzem einen Satz von Latexpartikel mit unterschiedlicher Fluoreszensintensität entwickelt. Der Fluoreszensintensitätsbereich dieser Partikel umspannt zwei Dekaden. Diese Eigenschaft erlaubt es, das Durchflußzytometer auch bei sehr unterschiedlichen Signalverstärkungen zu eichen.

Erfassung von mitochondrialer Funktion und Morphologie mit neuen Fluoreszensfarbstoffen. Martin Poot, Ananda G. Lugade, Jennifer Krämer, K.Sam Wells, Laurie J. Jones, Lisa Gibson, Stephen T. Yue, David Hanzel§, Victoria L. Singer, Richard P. Haugland. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR 97402, §Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA 94086, USA.

In Versuche zur Darstellung der Struktur oder Funktion von Zellorganelle wird implizit angenommen, daß der Fluoreszensfarbstoff spezifisch das jeweilige Organell markiert. Um diese Annnahme zu prüfen, haben wir zwei - Versuchansätze entwickelt. Erstens, erfassten wir die Kolokalisation von Paaren von mitochondrialen Fluoreszensfarbstoffen unterschiedlicher Emissionsbereiche (z.B. "Grün" und "Rot") mittels gängiger und konfokaler Fluoreszensmikroskopie. Rhodamin 123, Nonyl Acridinorange, MitoTracker™ Green und MitoTracker™ CMXRos zeigten eine perfekte Kolokalisation, weil sich ihre Fluoreszensfarben "mischten" (z.B. "Grün" + "Rot" wird "Gelb"). Keine isolierte grüne oder rote Signale wurden beobachtet. Zweitens, führten wir Doppeltfärbungen durch, welche es erlauben, mögliche Interaktionen zwischen Farbstoffe zu erfassen. Rhodamin 123 und Nonyl Acridinorange zeigten keine Interaktion. Zwischen Nonyl Acridinorange und CMXRos wurde jedoch starke Fluoreszensenergieübertragung beobachtet. Während Nonyl Acridinorange sich gegenüber Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials nicht empfindlich zeigte, war die Anfärbung mit Rhodamin 123 und CMXRos Membranpotentialabhängig. Wir schließen, daß Rhodamin 123, Nonyl Acridinorange, CMXRos und Mitotracker Green zwar dasselbe Organell anfärben, jedoch nur Nonyl Acridinorange und CMXRos Bindungsstellen in unmittelbarer Nähe zueinander belegen. Diese Ergebnisse zeigen, daß Kombinationen von mitochondrialen Fluoreszensfarbstoffen benutzt werden können, um die submikroskopische Feinstruktur des Mitochondrions zu untersuchen.

Die Ergebnisse von Ringversuchen der Zentralen Referenzinstitution zur Immunphänotypisierung - Geeignetes Probenmaterial und Inter-Labor-Variation

W. Prchaska, R. Kruse, W.-J. Geilenkeuser, T. Nebe, A. Radbruch, H. Diem, A. von Rücker

Arbeitsgruppe zur Qualitätssicherung in der Durchflußzytometrie
der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie

Seit 1993 sind fünf Ringversuche zur Immunphänotypisierung mit den Markern CD3+, CD4+/CD3+, CD8+/CD3+, CD19+, CD16,56+/CD3- und CD3+/HLA-DR+ durchgeführt worden. Für die ersten beiden Ringversuche wurde gewaschener, weiter aufbereiteter buffy coat aus der Blutkonservenherstellung verwendet, für die folgenden drei Ringversuche mit CPD (Citrat/Phosphat/Dextrose) stabilisiertes Vollblut. Der buffy coat wurde zur Erzeugung von pathologischen Verminderungen einzelner Lymphozyten-Subpopulationen einer Immun-Magnet-Depletion (magnetisierbare Antikörper-beads, Miltenyi Biotec) unterzogen. Beide Probenmaterialien wurden jeweils am Tag der Spende/Präparation an die Teilnehmer ausgesandt. Auf eine Sollwertfestlegung über Referenzlabors wurde verzichtet.

Bei durchschnittlich 109 Teilnehmern der einzelnen Ringversuche ergab sich beim Übergang von immundepletiertem buffy coat auf CPD-Vollblut eine Verbesserung der Variationskoeffizienten (VK) bei der Ermittlung des relativen Anteils [% der Lymphozyten] bei CD3+ Zellen von 4,5 - 12% auf 3 - 7,5%, bei CD4+/CD3+ von 5,8 - 14,4% auf 3,2 - 6,6% und bei CD19+ Zellen von 22 - 39% auf 7,8 - 13,6. Die mit CPD-Blut erhaltenen Variationskoeffizienten unseres Teilnehmerkollektivs sind günstiger, als im College of American Pathologists Flow Cytometry Survey (1) und anderen internationalen Publikationen beschrieben.
Klinisch ist die Ermittlung der absoluten Zellzahl wichtiger als die des relativen Anteils einer Subpopulation, für den relativ günstige Variationskoeffizienten erhalten werden. Bei der Bestimmung der absoluten Zellkonzentration (Zellzahl) wurden in unserer Untersuchung für CD4+ T-Zellen wie auch andere Populationen erheblich schlechtere VK ermittelt (CD3+: 14 - 22,4%, CD4+/CD3+: 14,5 - 21%; CPD-Blut). Da die Leuko- und Lymphozytenzahl die Grundlage für die Berechnung der absoluten Zellzahl der Subpopulationen ist, ist ihre Bestimmung besonders wichtig. Für Subpopulationen mit geringem Anteil und/oder wenig homogener Expression der Markerepitope (z.B. HLA-DR) fanden sich allerdings auch bei der Relativ-Verteilung hohe VK (>20%).

Zusammenfassend ergibt sich, daß mit frischem CPD-Blut ein natürliches, ausreichend stabiles und unkompliziert zu handhabendes Material für Ringversuche in der quantitativen Immunphänotypisierung zur Verfügung steht. Bestrebungen zu Verbesserungen müssen sich neben einer weiteren Standardisierung von Probenmaterial und Durchflußzytometrie auch auf die Methoden zur Leuko- und Lymphozytenzählung richten.

1. Homburger, H.A., Rosenstock, W., Paxton, H., Paton, M.L., Landay, A.L.; Assessment of Interlaboratory Variability of Immunophenotyping; Ann. N.Y. Acad. Sci. 677: 43-49 (1993)

Analyse und Isolierung von seltenen Zellen

Diether Recktenwald[1], Hans Joachim Groß[2], Stefan Miltenyi[3]

[1] AmCell Corp., Sunnyvale, Ca, USA
[2] Labor Mitterersstraße, München
[3] Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Der quantitative Nachweis und die Isolierung seltener Zellen hat mit dem Fortschritt in der Immunologie, der Zellbiologie, und der Molekularbiologie an Bedeutung gewonnen. Beispiele für solche Zellen sind Stammzellen im peripheren Blut, seltene Tumorzellen im Blut oder Knochenmark, fötale Zellen im materialen Blut oder antigen spezifische Lymphozyten. Basierend auf einem kommerziell erhältlichen Durchflußzytometer wurde eine Methode entwickelt (2,3), die es erlaubt, eine Zelle in mehr als zehn Millionen anderer Zellen mittels Immunofluoreszenz nachzuweisen. Die Methode beruht auf einer Ausschlußfärbemethode in Kombination mit einem Datenfilterverfahren. Die Verschleppung von Zellen von Probe zu Probe muß auch korrigiert werden. Zur Automatisierung der Datenanalyse wurde ein genetischer Algorithmus eingesetzt (3). Zur Zellsortierung können die Verbesserungen in der Datenanalyse noch nicht eingesetzt werden, da die Algorithmen noch nicht in "real time" ablaufen können. Eine Verbesserung der Analyse und der Isolierung von seltenen Zellen kann erreicht werden, indem neue spezifische Voranreicherungsmethoden eingesetzt werden. Magnetische Zellsortierung mit kolloidalen magnetischen Antikörperkonjugaten ist eine solche Methode (5,6). Sie wurde zum Nachweis von fötalen Zellen im Blut der Mutter (1), von Tumorzellen im Blut (unveröffentlicht), und von Subpopulationen von CD34 reaktiven Zellen (4) eingesetzt.
Eine effektive Voranreicherung wird auch die Empfindlichkeit von manuellen (6) und automatisierten (7) mikroskopischen Methoden für den Nachweis extrem seltener Zellen verbessern. Die hier beschriebene Technologie verspricht die Analyse von Phänomenen, die von sehr wenigen Zellen abhängen, sehr zu beschleunigen.

Referenzen:

1. Büsch, J., Huber, P., Pfluger, E., Miltenyi, S., Holtz, J., Radbruch, A.: Enrichment of fetal cells from maternal blood by high-gradient magnetic cell sorting (double MACS) for PCR based genetic analysis. Prenatal Diagnosis 1994, 14:1129-1140

2. Gross H.J., Verwer B., Houck D., Recktenwald D.: Detection of Rare Cells at a Frequency of One per Million by Flow Cytometry. Cytometry 1993,14(5):519–526

3. Gross H.J., Verwer B., Houck D., Hoffman, R., Recktenwald D.: Model Study Detecting Breast Cancer Cells in Peripheral Blood Mononuclear Cells at Frequencies as low as 10^{-7}. Proc. natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 537--541

4. Kato,K.,Radbruch,A.: Isolation and Characterisation of CD34 Hematopoetic Cells from Human Peripheral Blood by High-Gradient Magnetic Cell Sorting. Cytometry 1993, 14:384--392.

5. Miltenyi,S., Müller,W.,Weichel,W.,Radbruch,A.:High Gradient Magnetic Cell Sorting with MACS. Cytometry 1990, 11:231–239.

6. Pantel, K., Izbicki, J.R., Angstwurm, M., Braun, S., Passlick, B., Karg, O., Thetter, O., Riethmuller, G.: Immunocytological Detection of Bone Marrow Micrometastasis in Operable Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer Res. (UNITED STATES) 1993, 53(5):1027–1031

7. Ploem-Zaaijer, J.J., Mesker, W.E., Boland, G.J., Sloos, W.C., van de Rijke, F.M., Jiwa, M. Raap, A.K.: Automated Image Cytometry for Detection of Rare, Viral-Antigen-Positive Cells in Peripheral Blood. Cytometry 1994,15(3):199--206

8. Weichel,W.,Irlenbusch,S.,Kato,K.,Radbruch,A.:Sorting of Rare Cells. In Flow Cytometry and Cell Sorting, 1st edn.Edited by Radbruch, A. Berlin: Springer; 1992:159--167.

Hochauflösende Durchflußzytometrie und p53 Immunoreaktivität bei epithelialen Ovarialtumoren vom Borderlinetyp im Stadium I

Reich O., Pürstner P., Schöll W.
Geburtshilflich-gynäkologische Universitätsklinik Graz,
Auenbruggerplatz 14, 8010 Graz, Österreich

Verschiedene Studien lassen vermuten, daß die klinische Progession epithelialer Ovarialtumoren vom Borderlinetyp (BOT) mit DNA-Aneuploidie und Mutation des p53 Tumorsuppressorgens assoziiert ist. Wir untersuchten den DNA-Gehalt von Zellkernen und die Überexpression des p53 Proteins an 14 BOT im Stadium 1 (8 serös, 4 muzinös, 1 endometroid, 1 klarzellig, mittleres Alter der Patientinnen: 50 Jahre (20-82); mittlere Tumorgröße: 10cm (4cm-19cm)). Pro Tumor wurden 4-8 Biopsien gezielt entnommen. Die hochauflösende Durchflußzytometrie erfolgte nach Goehde's Technik mit einem PAS III Zytometer (Fa. Partec). Das mutierte p53 Genprodukt wurde mit dem monoklonalen Antikörper DO 7 (Fa. BioGenex, AM 239-5M) nachgewiesen. 8 von 14 Tumoren (57%) zeigten DNA-Aneuploidie, 6 Frauen (43%) hatten DNA-diploide Tumoren. Die DNA-Indices der aneuploiden Fälle schwankten zwischen 1,06 und 1,90 (1,06; 1,09; 1,10; 1,70; 1,90). 3 Fälle zeigten near diploide DNA-Messungen. In keiner der Gewebeproben konnte eine Überexpression des p53 Proteins demonstriert werden. Die Studie zeigt, daß durch hochauflösende Durchflußzytometrie bei BOT im Stadium I verschiedene DNA-Gehalte von Zellkernen (diploid, near diploid, aneuploid (2c+<10%), aneuploid (2c+>10%)) nachweisbar sind, die Grundlage eines DNA-Malignitätsgradings sein könnten. Hingegen scheint eine Überexpression des p53 Proteins gewöhnlich nicht im Stadium I von BOT vorzukommen.

Durchflußzytometrische Quantifizierung des intrazellulären Gehaltes an myelomonozytären Proteinen MRP8 und -14 sowie ihres durch den Antikörper 27E10 erkannten Heterodimeres MRP8/14 in humanen Monozyten und Granulozyten.

O. Röhrig, C.L. Klein, T. van Kooten, C.J. Kirkpatrick
Institute of Pathology, Universityhospital of Mainz, Germany

Die myelomonozytären Proteine MRP8 und MRP14, auch bekannt als Calprotectin oder L1-Komplex sind wichtige zytoplasmatische Bestandteile von Zellen des Monozyten-Phagozyten-Systems und von Granulozyten. Die kalziumabhängige Bildung von Heterodimeren aus MRP8 und -14 und die folgende Bindung der Dimere an Zellmembranen sowie das Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und der Extravasation von zirkulierenden Monozyten. Folglich wurden Makrophgagen, die das Heterodimer MRP8/14 exprimieren, das durch den Antikörper 27E10 erkannt wird, als „entzündliche Makrophagen" bezeichnet. Da die zelluläre Verteilung von monomeren MRP8 und-14 Molekülen und ihres Dimeres (27E10) noch nicht genau untersucht wurde, ist noch ungeklärt, ob zirkulierende Monozyten, die das 27E10-Antigen exprimieren, eine „entzündliche Subpopulation" darstellen.
Um diese Frage zu klären, wurde eine neue Methode entwickelt, um den gesamten zellulären Gehalt von MRP8, -14 und des Dimeres 27E10 in frisch isolierten humanen Monozyten und Granulozyten zu bestimmen. Die intrazellulären Antigene konnten mit Hilfe von Fix und Perm nachgewiesen werden. Die vorhergehende Markierung der membranständigen Marker CD14 und CD66b(CD67) ermöglichte den Verzicht auf streulichtbasierte Unterscheidung der Zelltypen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe von QSC-Beads quantifiziert und in Anzahl von Molekülen pro Zelle umgerechnet. Der Nachweis der intrazellulären Moleküle wurde sowohl mit der direkten sowie der indirekten Methode (AK-Biotin, Avidin-FITC) durchgeführt, und die Ergebnisse der beiden Methoden verglichen.
Die Kombination von vorhergehender Membranmarkierung, folgender intrazellulärer Markierung mit FIX und Perm und Kalibrierung durch QSC-Beads erwies sich als eine sinnvolle Methode zur Quantifizierung der Expression von intrazellulären Antigenen. Die Expressionshöhe sowie der Anteil an exprimierenden Zellen konnten genau bestimmt werden.
Die Ergebnisse bezüglich der intrazellulären Expression von MRP8, -14 und ihres Dimers MRP8/14 (27E10) werden dargestellt, und ihre Bedeutung für das Konzept der „entzündlichen Monozyten/Makrophagen" wird diskutiert werden.

CHARAKTERISIERUNG VON SUBPOPULATIONEN MONONUKLEÄRER PHAGOZYTEN DES BLUTES

G. Rothe, J. Stöhr, G. Schmitz
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität Regensburg

Mononukleäre Phagozyten sind von großer Bedeutung in der Pathogenese der Arteriosklerose. Das Ziel unserer Studie war die Charakterisierung von Subpopulationen der Monozyten des Blutes als potentielle zelluläre Marker für Veränderungen des Immunsystems bei Hypercholesterinämie. Bei Normalprobanden zeigten 61.3 ± 6.0 % der Monozyten eine dichte Expression des LPS-Rezeptors (CD14) und des Fcγ-R-I (CD64) jedoch keine Expression des Fcγ-R-III (CD16). Eine Subpopulation dieser "regulären" mononukleären Phagozyten, 2.1 ± 0.8 %, zeigte zusätzlich Expression von N-CAM (CD56). Weitere Subpopulationen von Monozyten zeichneten sich durch simultane Expression beider Fcγ-Rezeptoren (25.6 ± 5.0 %), isolierte Expression des Fcγ-R-III (9.4 ± 1.7 %), oder dichte Expression von CD33 (3.7 ± 1.1 %) bei nur geringgradiger Expression von CD14 aus. Sämtliche fünf Subpopulationen wiesen ein positives Signal für CD68 und Myeloperoxidase, Phagozytose- und Esteraseaktivität auf. Deutliche Unterschiede bestanden jedoch in der Expression von Antigenen mit Bedeutung für die zelluläre Antigenpräsentation und Adhäsion. Analyse der mononukleären Phagozyten des peripheren Blutes bei Patienten mit Hypercholesterinämie und Normalprobanden zeigte eine relative Zunahme von Zellen mit dem reiferen Phänotyp der isolierten Expression von Fcγ-R-III in einem Zusammenhang mit den Apolipoprotein E3/E4 und E4/E4 Phänotypen. Weiterhin deutete eine verstärkte Expression des Aktivierungsantigens CD45RA in Korrelation zur Plasmaspiegeln von LDL and Lp(a) auf systemische Veränderungen mononukleärer Phagozyten bei Erkrankungen des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels hin.

Eine neue durchflußzytometrische Methode für die Analyse der lysosomalen sauren Cholesterinesterhydrolase

G. Schindler, G. Rothe, G. Schmitz
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität Regensburg

Die lysosomale saure Cholesterinesterhydrolase (LAL; EC 3.1.1.3.13) ist ein Schlüsselenzym im zellulären Cholesterinstoffwechsel. Sie hydrolysiert Cholesterinester und Triglyzeride, die über Low Density Lipoproteine (LDL) aufgenommen werden. Zwei seltene genetische Erkrankungen, die Cholesterinesterspeicherkrankheit (CESD) und die Wolman Ekrankung (WD) sind durch eine verminderte bzw. fehlende LAL-Aktivität gekennzeichnet. Bei Patienten mit symptomatischen Gefäßerkrankungen wurde eine verminderte Enzymaktivität im Vergleich zu altersgleichen Kontrollen beschrieben. Dies läßt auf eine pathogenetische Rolle der LAL bei der Entstehung der Arteriosklerose schließen.

Die verfügbaren Methoden für die Bestimmung der LAL basieren auf der Spaltung radioaktiv markierter Cholesterinester im Zellhomogenat. Ziel dieser Untersuchungen war die Charakterisierung der *in situ* Aktivtiät der LAL in intakten Zellen mit Hilfe eines fluorogenen Enzymsubstrates. Als geeignetes fluorogenes Substrat erwies sich Fluoresceindilaurat (FLDL). Aus FLDL kann durch enzymkatalysierte Hydrolyse Fluorescein freigesetzt werden. Durch Inkorporation des FLDL in LDL wird eine spezifische lysosomale Anreicherung des FLDL erreicht. Eine spezifische Aufnahme über den Apo B/E-Rezeptor durch intakte Fibroblasten erwies sich in Kompetitionsexperimenten mit nativem LDL. Die zusätzliche Markierung des LDL-Partikels mit 3,3'-Dioctadecylindocarbocyanin (DiI) erlaubt die Quantifizierung der LAL-Aktivität unabhängig von der LDL-Aufnahme. Inkubiert man intakte Fibroblasten mit DiI-FLDL-LDL, läßt sich durchflußzytometrisch die LDL-Aufnahme über die DiI-Fluoreszenz und die LAL-Aktivität als Maß der Fluorescein-Fluoreszenz analysieren.

In dem neu entwickelten Testsystem zeigten sich signifikante Unterschiede in der LAL-Aktivität in Experimenten mit Fibroblasten von normalen Kontrollen, CESD und WD Patienten. Die durchflußzytometrischen Befunde korrelierten gut mit Ergebnissen aus einem Radioaktiv-Referenzassay, bei dem ^{3}H-Cholesterinlinoleat in LDL rekonstituiert, als Substrat diente.

Qualitätskontrolle und Standardisierung der Durchflußzytometrischen Thrombozytenanalytik

G. Schmitz, S. Barlage, G. Rothe
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Zentrallabor und Blutbank der Universität Regensburg

Die durchflußzytometrische Analyse der Thrombozytenaktivierung ist ein zunehmend wichtiger Aspekt im Bereich der Qualitätskontrolle von Thrombozytenpräparaten, sowie in der klinischen Diagnostik von Erkrankungen, die mit einer Hyper- oder Hyporeagibilität der Thrombozyten verbunden sind. Veränderungen der Expressionsdichten von Oberflächenproteinen der Thrombozyten, wie die gesteigerte Expression des GpIIb/IIIa (CD41a), des GMP-140 (CD62) und des Gp53 (CD63) sowie eine verringerte Expression des GpIb (CD42b) dienen hierbei als Marker einer Thrombozytenaktivierung. Trotz hoher Sensitivität der Methodik sind die erzielten Resultate in hohem Maße abhängig vom methodischen Vorgehen, so von der Art der Probenvorbereitung, der Auswahl und Konjugation der Antikörper sowie der Datenaquisition bzw. Datenanalyse.

Zur Standardisierung der Analytik wurden daher im Jahr 1994 zwei Ringversuche organisiert. Das Konzept basierte auf der fixationsfreien Stabilisierung zweier unterschiedlich alter Thrombozytenkonzentratproben, der Verwendung eines standardisierten Protokolls zur Probenvorbereitung, der Verwendung laboreigener Antikörper und deren Kalibration über goat-anti-mouse Eichbeads mit einer definierten Anzahl an Bindungsstellen.

Die erzielten Resultate zeigten vergleichbare relative Fluoreszenzen für die Bestimmung des stark exprimierten CD42-Antigens. Viele Teilnehmer berichteten jedoch über Schwierigkeiten in der Analyse der niedrig exprimierten Antigene CD62 und CD63, sowie in Bezug auf die Kalibration anhand der mitversandten Eichbeads. Die Auswertung der list mode files demonstrierte die unterschiedliche Qualität der Datenaquisition, u.a. hinsichtlich der Kontamination der Scattersignale durch Zelldebris, sowie die unterschiedliche Art der Datenauswertung.

Insgesamt bestätigten die Resultate die Notwendigkeit einer Erarbeitung von Konsensusprotokollen zu den methodischen Aspekten der Analyse der Thrombozytenaktivierung.

Vergleich morphometrischer Bildverarbeitungsparameter mit Flußzytometriedaten ausgewählter Ovarialkarzinome

Schöll W., Reich O., Pürstner P., Taucher A.
Geburtshilflich Gynäkologische Universitätsklinik Graz

Fragestellung: Flußzytometrische DNA-Messungen aus verschiedenen Arealen desselben Ovarialkarzinomes geben Hinweis auf einen oft inhomogenen Aufbau aus regional zytogenetisch unterschiedlichen Tumorzellpopulationen. Bei der histologisch-visuellen Beurteilung kann dieses Phänomen gewöhnlich nicht erkannt werden. Sind verschiedene Zellpopulationen in unterschiedlichen Tumorkompartimenten durch morphometrische, nur mit Bildanalysesystemen bestimmbaren Parametern differenzierbar?

Material und Methoden: An mehreren Stellen eines Ovarialkarzinomes wird Frischmaterial zur flußzytometrischen und histologischen Untersuchung entnommen. Die quantitative DNA-Bestimmung entspricht einem standardisierten Protokoll nach Göhde am PAS III Flußzytometer, die dazu streng korrelierte pathohistologische Untersuchung erfolgt am HE Schnitt. Tumore, die an mehreren Arealen flußzytometrisch heterogene Zellpopulationen, jedoch histologisch nicht unterscheidbares Typing und Grading zeigen, werden morphometrisch am Zeiss Ibas 2.0 Bildanalysesystem untersucht. Interaktiv werden in diesen Kompartimenten ca. 150 maligne Zellkerne auf Kernfläche, Formfaktor, Maximaldurchmesser, Elongation und Kernausrichtung bei 400-facher Vergößerung untersucht. Die Meßwerte der einzelnen Arealen werden mit dem Kruskal-Wallis Test auf mögliche Unterschiede geprüft.

Ergebnisse: Proben mit flußzytometrisch heterogenen Zellpopulationen unterscheiden sich von histologisch gleichen, flußzytometrisch aber aus nur einer Zellpopulation aufgebauten Präparaten hochsignifikant ($p<0{,}0001$) in Kernfläche und Formfaktor. Tumorareale mit heterogenen, höher aneuploiden Zellklonen zeigen im Median größere Kernflächen (z.B. 73 μm^2 vs 38 μm^2) sowie kleinere Kernformfaktoren (z.B. 0,65 vs 0,74).

Schlußfolgerung: Morphometrische Änderungen können der visuellen Beurteilung bei histologisch gleicher Wuchsform entgehen, da eine knappe Verdoppelung der Kernfläche mit einem nur ca. 1,35 fach vergrößertem Radius einhergeht. Der flußzytometrische Nachweis von regionaler Tumorheterogenität läßt sich bildanalytisch bestätigen.

Qualitätskontrolle der Immunphänotypisierung in Österreich

E. Schönwald*, R. Jilch**
Zentrallabor (Vorstand:Prof.Dr.M.Fischer)** im Krankenhaus der Stadt Wien- Lainz und Dermatologische Abteilung (Vorstand: Prof.Dr.F.Gschnait)*
Wolkersbergenstr. 1, A-1130 Wien.

Seit 1993 wird in Österreich regelmäßig eine externe Qualitätssicherung für die durchflußzytometrische Immunphänotypisierung von peripheren Blutlymphozyten durchgeführt. Die Basis dafür bildete ein Pilotringversuch, durch den die Vorgehensweise im Ringversuch erarbeitet werden konnte. In gemeinsamen Diskussionen der Teilnehmer bei regelmäßigen Treffen werden die Ergebnisse besprochen und Anregungen für die nächsten Rundversuche miteinbezogen. Der derzeitige Stand: an 22 Laboratorien in Österreich und ein Labor in Ungarn (Universitätskliniken, Spitäler, Privatlabors) werden vier mal pro Jahr jeweils zwei Vollblutproben versandt. Als Meßparameter wurden die Markerkombinationen CD45/14, CD3/19, CD3/16+56, CD4/8, CD3/4, CD3/8 und CD3/HLA-DR gewählt. Bei vom Versuchsleiter vorgegebener Leukozytenzahl und vom Teilnehmer selbst gemessener Lymphozytenzahl sollen auch die Absolutwerte ermittelt werden. Zusätzlich zu diesem Basisprogramm werden bei jedem Rundversuch Antikörperkombinationen (z.B.:CD3/25, CD3/HLA-DR) unterschiedlicher Hersteller zum Vergleich mitgeschickt. Die Arbeitsrichtlinien folgen internationalen Konsensusprotokollen zur Routinediagnose (Vollblut- Lyse, Gating). Zunächst wurden Ausreißer- bereinigte Mittelwerte als Zielwerte vorgegeben und das Gesamtbild über Standardabweichung und Variationskoeffizient beurteilt. Derzeit erfolgt die Aus- und Bewertung mit Hilfe einer Software der ÖQUASTA (Österreichische Gesellschaft für Qualitätssicherung und Standardisierung medizinisch- diagnostischer Untersuchungen) über vom Versuchsleiter vorgegebene Referenzbereiche und eine Gewichtung der einzelnen Subpopulationen. Einen interessanten Ansatz zur Erweiterung des Rundversuches bildete der Einsatz von Beads zur Bestimmung von Linearität und Rezeptordichte. Das gesetzte Ziel bleibt jedoch, im Falle klinischer Fragestellungen, die zur Routinediagnose eingesetzt werden, bei derselben Untersuchungsanforderung vergleichbare Ergebnisse in den teilnehmenden Labors zu gewährleisten.

Fehlermöglichkeiten bei der quantitativen Bildaufnahme in der Zytometrie

P. Schwarzmann, G. Mähner
Institut für Physikalische Elektronik, Universität Stuttgart

Die quantitative Auswertung von Bildern in der Zytometrie stellt hohe Anforderungen an die Bildqualität und damit an die Bildaufnahmetechnik. Diese Anforderungen können beträchtlich von denjenigen der visuellen Betrachtung abweichen. Dieser Beitrag soll einige Fehlermöglichkeiten bei der Bildaufnahme aufzeigen, welche die Geometrie, die Helligkeitswerte und die Farbdarstellung von Bildern beeinflussen.

Auswertung geometrischer und morphologischer Merkmale:

In der Zytometrie sind normalerweise kleinere Fehler bei Längen- und Flächenmessungen ohne Bedeutung. Von weit höherer Wichtigkeit ist jedoch die Notwendigkeit in Bildern Abgrenzungen von Zellbestandteilen überhaupt zu erkennen und zu lokalisieren. Diese Erkennungsfähigkeit wird mit bestimmt durch die optische Auflösung des Mikroskops, die Apertur der Bildpunkte des Sensorelements und natürlich durch die optischen Eigenschaften der Objektgrenze selbst.

Messungen der Transmission und der optischen Dichte:

Fehler in der Bestimmung dieser Maße sind von hohem Interesse, da diese Maße mit der Menge von chemischen Verbindungen in der Zelle verbunden sind, welche ihrerseits wieder von hohem diagnostischen Wert sein kann. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die DNS-Analyse (DNS-Histogramm). Fehlermöglichkeiten, welche die quantitative Bestimmung einer Färbesubstanz beeinflussen können sind vor allem: Abweichungen vom Lambert-Beer'schen Gesetz beim Lichtdurchgang durch das Objekt, örtliche und zeitliche Schwankungen der Beleuchtung, die Beugung innerhalb der Optik und dem Objekt selbst und schließlich noch die dynamischen Eigenschaften des Sensorelements.

Auswertung der Farbinformation zur Trennung gefärbter Zellbestandteile;

Fehlermöglichkeiten bestehen hier in der schlechten Überdeckung der Farbauszüge bei 3-Chip-CCD-Kameras, sytembedingten Farbshadingerscheinungen, unterschiedlicher örtlicher Auflösung der Farbkanäle bei Verwendung von Composit-Signalen der Fernsehtechnik oder bei Verwendung von 1-Chip-Farbfernsehkameras sowie den grundsätzlichen Unterschieden der Farbdarstellung der Fernsehtechnik und spektral hoch aufgelösten Techniken der Bildaufnahme.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER NACHWEIS INTRAZELLULÄRER THROMBOZYTENANTIGENE

Peter Sedlmayr[1], Barbara Großhaupt[1, 2], Wolfgang Muntean[2], Astrid Blaschitz[3], Gottfried Dohr[3]

Medizinische Univeritätsklinik[1], Universitäts-Kinderklinik[2] und Institut für Histologie und Embryologie[3], Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich

Unstimulierte Thrombozyten weisen intrazelluläre Strukturen wie α-Granula, Lysosomen und dense bodies auf. Aktivierung mit Thrombin führt zu Exozytose. Die Granulamembran verschmilzt mit der Zelloberflächenmembran, und integrale Moleküle der Granulamembran wie z. B. P-Selektin (CD62P, in α-Granula) oder p53 (CD63, in Lysosomen und dense bodies) werde an der Zelloberfläche nachweisbar. Thrombospondin, ein Protein der α-Granula, wird auf Plättchenaktivierung hin sezerniert und bindet sich an Thrombospondin-Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche. Der durchflußzytometrische Nachweis mit Hilfe von Antikörpern gegen Aktivierungsmarker an der Oberfläche in vitro aktivierter Thrombozyten ist etabliert. Nach Permeabilisierung der Zellmembranen durch Methanol oder Fix&Perm (An der Grub) wiesen wir die erwähnten Aktivierungsmarker mit Hilfe der Durchflußzytometrie im Zytoplasma unstimulierter Blutplättchen nach. Außerdem waren Interleukin (IL)-1α, jedoch in wesentlich geringerem Maß IL-1β, im Zytoplasma unstimulierter Thrombozyten nachweisbar, jedoch nicht an der Zelloberfläche. Diese Nachweisbarkeit war nur unter Verwendung von Methanol, nicht jedoch von Fix&Perm gegeben. Dies führt zur Frage, ob Fix&Perm eine Freisetzung von (vorwiegend im Zytosol befindlichen) IL-1 verursacht.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Durchflußzytometrie für die Untersuchung präformierter intrazellulärer Aktivierungsmarker von Thrombozyten geeignet ist. Diese Methode solte auch geeignet sein, die relative Menge an intrazellulären Thrombozytenantigenen zu bestimmen, vorausgesetzt, die Permeabilisation führt nicht zu Freisetzung von Antigen. Beispielsweise erlauben vorläufige Daten den Schluß, daß Thrombozyten Neugeborener im Vergleich zu denen Erwachsener nach Thrombinstimulation zwar eine geringere Expression von CD63 an der Zelloberfläche aufweisen, unstimulierte Thrombozyten enthalten jedoch die gleiche Menge von CD63 wie diejenigen Erwachsener. Dies läßt vermuten, daß diese Hyporeaktivität der Thrombozyten Neugeborener nicht durch Präaktivierung während der Geburt verursacht ist, die zu einer intrazellulären Depletion führen würde.

Zytometrische Beurteilung der "rush"-Bienengift-Immuntherapie

J.A. Segura, J. Irsch*, A. Löhndorf* N. Hünzelmann* und A. Radbruch

Institut für Genetik der Universität Köln. Weyertal 121. 50931 Köln. Deutschland.
*Hautklinik der Universität zu Köln. Joseph-Stelzmann Str. 9. 50931 Köln. Deutschland.

Die molekularen Mechanismen der "rush"-Bienengift-Immuntherapie sind weitgehend unbekannt. Wir benutzen die Durchflußzytometrie, um zu analysieren, wie diese Therapie die Kontrolle der Immunantwort beeinflußt. Allergischen Partienten, die die Desensibilisierungsbehandlung erhielten, wurde Blut entnommen. Die so gewonnenen Zellen wurden mit PMA und Ionomycin fünf Stunden stimuliert. Die prozentualen Anteile der reagierenden T-Zellen wurden anhand ihrer Zytokinproduktion durch intrazellulärer Färbung und Multi-Parameter-Durchflußzytometrie bestimmt.
Die Häufigkeit der Zellen, die die regulatorischen Zytokine IL-4 und IFN-γ exprimieren, nimmt im Verlauf der Immuntherapie ab, wobei das Minimum am fünften Behandlungstag erreicht wird. Die IL-2 Produktion ändert sich nicht signifikant. Der Prozentanteil an Zellen, die den frühen Aktivierungsmarker CD69 exprimieren, sinkt ebenfalls während der Behandlung.
In gesunden Spendern werden Zytokine haupsächlich von den CD45RO+ (voraktivierten) Zellen produziert. Dagegen ist bei allergischen Individuen die Häufigkeit der CD45RO+ T-Zellen, die IL-4 und IFN-γ sekretieren, drastisch reduziert, und die "naive" CD45RO- -Population beinhaltet hier eine höhere Anzahl von zytokinsekretierenden T-Zellen.
Somit scheint im Verlauf der "rush"-Desensibilisierung eine systemische Repression des Immunsystems, die die voraktivierten CD45RO+ T-Zellen betrifft, für den Desensibilisierungseffekt verantwortlich zu sein.

Untersuchungen zur Aufnahme von 5-Aminolävulinsäure, Synthese von Protoporphyrin IX und Efflux von Porphyrinen an zwei Urothelkarzinomzellinien

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

[1]Institut für Pathologie, Universität Regensburg und [2]Urologische Klinik, Universität München

Um 5-Aminolävulinsäure (ALA) erfolgreich in der photodynamischen Therapie (PDT) einsetzen zu können, ist es notwendig eine ausreichend hohe intrazelluläre Konzentration des daraus gebildeten endogenen Photosensibilisators Protoporphyrin IX (PPIX) in malignen Zellen zu erreichen. Zelltypspezifische Unterschiede in der Akkumulation von PPIX sind zur Zeit noch nicht vollständig verstanden. Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit den Ursachen der unterschiedlichen PPIX Akkumulation zweier unterschiedlich differenzierter Harnblasenkarzinom-Zellinien.

Der intrazelluläre PPIX Gehalt wurde anhand der durchflußzytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensität der mit ALA inkubierten Zellen quantifiziert und aufgrund seiner spektralen Charakteristik mittels Fluoreszenzspektrometrie verifiziert. Nach 4-stündiger Inkubation in ALA-haltigem Medium zeigten die aus einem hochdifferenzierten Tumor abgeleiteten RT4 Zellen eine dreifach höhere Fluoreszenzintensität als die aus einem gering differenzierten Karzinom abstammenden J82 Zellen. Diese Unterschiede in der Fluoreszenzausbeute konnten teilweise auf Unterschiede in der ALA Aufnahme selbst zurückgeführt werden, die spektrophotometrisch quantifiziert wurde. Kinetik-Messungen zeigten, daß der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei beiden Zellinien erst 6 Minuten nach ALA Zugabe einsetzte. Die Ausschleusung der intrazellulär gebildeten Porphyrine war initial für RT4 Zellen schneller als für J82 Zellen. Die Unterschiede in der ALA induzierten Fluoreszenz konnten weiterhin mit Unterschieden des Mitochondrienmembranpotentials, das mittels Rhodamin 123 bestimmt wurde, korreliert werden. Der Anstieg der ALA induzierten Fluoreszenz konnte durch Zugabe der Kalium-Ionophore Valinomycin sowie durch Inkubation in mit Kalium angereichertem Medium vollständig verhindert werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, daß die zelltypspezifischen Unterschiede der ALA induzierten zellulären Fluoreszenz auf Unterschiede in der Höhe des Mitochondrienmembranpotentials, und damit auf Unterschiede in der Syntheserate von PPIX, unterschiedliche Effluxraten und Unterschiede in der ALA-Aufnahme selber zurückgeführt werden können, wobei letztere wiederum vom Plasmamembranpotential abhängig sein könnte.

Die Empfindlichkeit spermatogenetischer Zellen von Säugetieren gegenüber ionisierender Strahlung

I. Tatchen, W. Göhde
Institut für Strahlenbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

Nur mit Hilfe biologischer Indikatoren ist es möglich, die Höhe einer unbeabsichtigten Strahlenexposition eines Individuums zu bestimmen. Die bisher zur Verfügung stehenden cytogenetischen Methoden der 'biologischen Dosimetrie' sind jedoch sehr zeitaufwendig und relativ unempfindlich.
Es ist bekannt, daß stark proliferierende Gewebe wie z. B. spermatogenetische Zellen sehr empfindlich auf ionisierende Strahlung reagieren; die LD_{50} für Spermatogonien der Maus liegt bei etwa 0.25 Gy.
Methoden zur Detektion der Effekte kleiner Strahlendosen konnten verbessert werden, indem NMRI-Mäuse in vivo mit BrDU (1h) behandelt wurden. Die Mäuse wurden vor der BrDU-Markierung Dosen von 0.05-2.0 Gy ^{60}Co-Gamma-Strahlung ausgesetzt. Nach der Entnahme der Testes wurde die Häufigkeit der S-Phase-Zellen mit Hilfe eines monoclonalen anti-BrDU-Antikörpers erfaßt.
Die Häufigkeit der S-Phase-Zellen wurde flowcytophotometrisch bestimmt (Partec PAS III) und Dosis-Effekt-Kurven erstellt. Eine maximale Reduktion des Anteils der S-Phase-Zellen wurde am 2. bis 4. Tag nach Bestrahlung beobachtet. Die Dosis-Effekt-Kurven, die für die Zeitpunkte 2, 4, 7 und 9 Tage nach Bestrahlung erstellt wurden, zeigen bereits nach einer Dosis von 0.05 Gy eine deutliche Reduktion der S-Phase-Zellen.
Der hier vorgestellte Indikator für die Strahlenwirkung ist empfindlicher als alle bekannten biologischen Dosimeter. Vorgehensweisen werden diskutiert, die es erlauben ,Dosis-Effekt-Kurven auch für menschliche Zellen zu erstellen.

Nicht-radioaktive Lebensdauermessungen an Erythrozyten mittels Durchflußzytometrie und Vergleich mit radioaktiver Markierung.

Trastl, C.[1]; Beisker, W.[2]; Berg, D.[3]; Hoffmann-Fezer, G.[1]

(1): GSF - Institut für Immunologie
(2): GSF - Arbeitsgruppe Durchflußzytometrie
(3): GSF - Institut für Strahlenbiologie

Ingolstädter Landstr. 1 D-85764 Oberschleißheim Germany

Die in-vivo Lebensdauer von Erythrozyten im peripheren Blut von Hunden (Beagles) wurde über einen Zeitraum von 120 Tagen sowohl mittels Durchflußzytometrie als auch durch radioaktive Markierung (^{51}Cr) bestimmt. Ein Anteil von 2% des peripheren Blutes wurde entnommen, biotinyliert mit Biotin-X-N-hydroxy-succimid Ester (B-X-NHS) und danach wieder injiziert. Proben des peripheren Blutes wurden wöchentlich genommen und mit Fluoresceinisothiozyanat (FITC) markiertem Avidin gefärbt. Biotin-markierte Erythrozyten wurden mittels Laser-Durchflußzytometrie (Anregung 488nm, Emission 530nm) gemessen. Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wurde benutzt, um die Erythrozyten auszugaten. Grüne Fluoreszenz wurde als Maß für die Biotin-Markierung erfaßt. Markierte und unmarkierte Erythrocyten unterschieden sich etwa um einen Faktor 10 in der Fluoreszenzintensität. Der Prozentsatz der markierten roten Blutzellen sank während des Beobachtungszeitraums von 2% auf 0.2% nach ca. 120 Tagen. Während der ersten 30 Tage lieferte die Biotin-Markierung vergleichbare Ergebnisse mit den standardisierten radioaktiven Markierungsmethoden (International Committee for Standardization in Haematology, 1980). Die radioaktiven Markierungsdaten durch ^{51}Cr waren vergleichbar nach Reduktion für die Zerfallszeit des ^{51}Cr sowie für den standardisierten Chromverlust während der 120 Tage. Die FITS Fluoreszenzintensität pro Zelle blieb konstant über den ganzen Beobachtungszeitraum; dies demonstriert eindeutig die Vorteile der Biotin Methode.

COMPUTER-KLASSIFIZIERUNG DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER DREIFARBEN-IMMUNPHÄNOTYPEN VON BLUTLEUKOZYTEN UND KNOCHENMARKSZELLEN BEI LOW UND HIGH GRADE NON-HODGKIN-LYMPHOMEN UND CHRONISCH LYMPHATISCHEN LEUKÄMIEN

G.Valet[1], G.Schmidtke[2], U.Schmücker[2], G.Brittinger[2], H.G. Höffkes[2]
1) Max-Planck-Institut für Biochemie, 82152 Martinsried,
2) Abt.Hämatologie, Medizinische Klinik der Universität, 45122 Essen

Die Analyse von Dreifarbenimmunfluoreszenzmessungen ergibt üblicherweise 3x4=**12** Werte für die prozentuale Häufigkeit von Lymphozytenpopulationen in den Quadranten der FITC/PE, PE/CY5 und FITC/CY5 Histogramme. Die **Mehrheit** der **Information**, die aus der Intensität der Antikörperfluoreszenz, der relativen Oberflächendichte der Antigene, den Fluoreszenzverhältnissen, der Vorwärts- (FSC) und Seitwärtslichtstreuung (SSC) sowie dem SSC/FSC Verhältnis jeweils bei Lympho-, Mono- und Granulozyten besteht, geht auf diese Weise gänzlich **verloren**. Die Diagnose wird üblicherweise visuell und quantitativ von qualifizierten Experten durchgeführt. Dieses ebenso **mühsame** wie **zeitaufwendige** führt zur Interuntersuchervariabilität bei den **nicht** standardisierten Auswerteprozeduren.

Das Ziel dieser Untersuchung war die **automatische** Computerklassifizierung von CD45/14/20, CD8/4/3, κ/CD19/5, λ/CD19/5, CD10/23/9 Listendateien (BD-FACScan) von Blutleukozyten und Knochenmarkszellen chronisch lymphatischer (CLL, n=14) und hairy cell (n=8) Leukämien, centrocytisch-centroblastischen (n=2), centroblastischen (n=2), B-Zell (n=1) Lymphomen, Immunozytomen (LP-IC, n=9), centrocytischen (n=1) und low grade Lymphomen (n=1) sowie von normalen (n=15) und leukozytotischen (n=12) Patienten mit dem CLASSIF1 Program (Ann.NY Acad.Sci.**677**,233-251(1993), Partec, Münster). Das CLASSIF1 Programm extrahiert **222** Werte je Dreifarbenimmunphänotyp and erstellt Instrument- und Labor-**unabhängige** Klassifizierer.

84-100% der Patientenproben wurden korrekt klassifiziert. Die klinisch schwierige Unterscheidung zwischen CLL und LP-IC wurde in **100%** der Fälle erreicht. Zusätzlich konnten **9** von **10** klinisch nicht entscheidbare Fälle entweder einer CLL oder einem LP-IC zugeordnet werden.

Vergleich zwischen Exzimerfluoreszenz und Depolarisationstechnik zur Analyse hydrophober Membranregionen

M. Wimmer, G. Rothe, G. Schmitz
Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Regensburg, 93042 Regensburg

Die mit Veränderungen des zellulären Cholesterinstoffwechsels eng verknüpfte Membranfluidität ist ein potentiell wichtiger Faktor in der zellulären Pathogenese der Arteriosklerose.

Die etablierte Methode zur durchflußzytometrischen Bestimmung der zellulären Membranfluidität ist die Messung der Depolarisation von 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH). Die Anregung des Farbstoffes erfolgt dabei mit einem Argonionen-Laser bei 364 nm. Eine Alternative hierzu, die ohne weitergehende Gerätemodifikationen auskommt, basiert auf der Exzimerbildung von Pyrendecanoic-Acid (PDA).

Als experimentelles Modell wurde der Cholesteringehalt von Humanlymphozyten mittels Inkubation mit Phospatidylcholin-Liposomen reduziert. Bei der Exzimer-Monomer-Technik wurden diese Lymphozyten anschließend mit PDA inkubiert und die Exzimer- (478 nm) und die Monomerfluoreszenz (395 nm) gemessen; die Fluoreszenzdepolarisation von mit DPH gefärbten Zellen wurde mittels der Aufnahme der beiden Polarisationsrichtungen der DPH-Emission bestimmt.

Aus den Messungen ergab sich, daß der Grad der Polarisation der DPH-Fluoreszenz bei sinkendem Cholesterininhalt der Membran abnimmt und das Exzimer-Monomer-Fluoreszenzverhältnis zunimmt.

Die Exzimer-Monomer-Methode mit dem Farbstoff PDA erwies sich in den oben beschriebenen Messungen als der weitaus sensitivere Weg, um Änderungen in der Fluidität der Zellmembran zu bestimmen.

Die technisch einfachere Bestimmung des Exzimer-Monomer-Fluoreszenzverhältnisses sollte von Interesse sein zur Analyse einer gestörten zellulären Membranfluidität.

Poster

CGH Bildverarbeitung mit einer Einchip CCD-Farbkamera

Harald Bornfleth[1], Klaus Aldinger[1], Michael Hausmann[1], Anna Jauch[2] and Christoph Cremer[1,3]

1= Institut für Angewandte Physik, 2= Institut für Humangenetik und Antropologie, 3= Interdisziplinäres Zentrum für wissenschaftliches Rechnen, Universität Heidelberg, D-69120 Heidelberg

Die quantitative Bestimmung von Fluoreszenzintensitätsverhältnissen auf Metaphasechromosomen ist von fundamentaler Bedeutung für die cytogenetische Analyse bei „comparative Genomhybridisierung (CGH)". Üblicherweise werden hierzu Mikroskopbilder mit hoch auflösenden, hoch sensitiven schwarz weiß CCD Kameras aufgenommen. Dies bedingt, daß die verschiedenen Farben nacheinander mit verschiedenen optischen Filtern für Anregung und Emission aufgenommen werden müssen. Hier wird als Alternative die Anwendung einer Einchip CCD Farbkamera (Kappa CF 15 MC) vorgestellt, die unter Verwendung eines Omega Tripel-Bandpassfilters die simultane Aufnahme der drei Farben Texas Red, FITC und DAPI erlaubt. Die Bildaufnahmeeigenschaften des Systems wurden untersucht. Die Kameraantwort in den drei Farbebenen R,G,B wurde bestimmt und Kalibrierungsfaktoren wurden errechnet. Ein komplettes Softwareprogramm wurde für die Bildauswertung von CGH Experimenten geschrieben, das auf einem PC unter Verwendung des kommerziellen Softwarepakets Optimas zur Bildaufnahme läuft. Beispiele zeigen die Anwendung für die Bildauswertung von CGH bei Tumorzellen. Die Resultate wurden mit Ergebnissen verglichen, die für dasselbe Präparat mit einem konventionellen System mit einer schwarz weiß CCD Kamera (Photometrics) und einem Softwareprogramm auf der Basis des TCL-Pakets für einen Macintosh Quadra 950 erzielt wurden. Für verschieden Beispiele wurde eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Systeme gefunden

Literatur: Bornfleth H, Aldinger K, Hausmann M, Jauch A, Cremer C: CGH Imaging by the one chip true color CCD camera Kappa CF 15 MC. Cytometry 1995 (submitted)

Simultane, zeitabhängige Quantifizierung von zellinternem Kalzium und reaktiven Sauerstoffspezies in humanen Granulozyten nach Belastung mit Umweltagentien.

W.Grundler[1],P.Dirscherl[2],K.Marx[1],I.Beck-Speier[2],W.Beisker[1],K.Maier[2] und A.Stampfl[3]

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,Neuherberg, AG Durchflußzytometrie[1], Institut für Inhalationsbiologie[2] und Institut für Toxikologie[3], D-85764 Oberschleißheim

Polymorphkernige Granulozyten (PMNs) schützen einen Organismus effektiv gegen eigedrungene Pathogene. Neben ihrer Fähigkeit zu Migration, Phagozytose und Sekretion liegt eine der wichtigsten Funktionen dieser Zellen in der Erzeugung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI), die "respiratory burst" (RB) genannt wird. Die normalerweise nutzbringenden Effekte des RB können bei Störungen der RB-Regulation pathologisch wirken. Die Belastung der PMNs mit Sulfit, einer schädlichen Umweltchemikalie in der Luft, bedingt bereits die Auslösung des RB und moduliert den stimulatorischen Effekt von PMA und FMLP.

Wir etablierten eine durchflußzytometrische Methode für die simultane Registrierung von interzellulären Konzentrationen von Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) und H_2O_2 ($[H_2O_2]_i$), um zeitabhängige Wechselwirkungen von Sulfit mit diesen Signaltransduktionsvorgängen quantifizieren zu können. Hierfür werden die durchflußzytometrische Bestimmung von $[Ca^{2+}]_i$ mit Indo-1 und die von $[H_2O_2]_i$ mit DHR-123 kombiniert mit einer effektiven Datenanalyse zur Quantifizierung der Meßergebnisse, die das selbsterstellte Datenauswertesystem DAS ermöglicht. Diese Methode erlaubt die Charakterisierung der Kinetik von transienten Ca^{2+}-Signalen und die simultane Bestimmung der H_2O_2-Produktionsraten in unterschiedlichen Subpopulationen lebender Zellen.

Das Heidelberger Slit-Scan Flußfluorometer

Michael Hausmann[1], Alexander Rohrbach[1], Dietmar Wolf[1], Klaus Aldinger[1], Michael Schurwanz[1], Jürgen Dölle[2], Arnulf Keese[3], Martin Crone[1], Christoph Cremer[1]

1= Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, D-69120 Heidelberg; 2= IBM Entwicklungslabor, D-71032 Böblingen, FRG; 3= Bertelsmann Entwicklungsabteilung, D-33311 Gütersloh

Die Slit-Scan Flußfluorometrie ist ein Laseranalyse- und Sortierverfahren, das einer beschleunigten Detektion von Chromosomenaberrationen dient. Details des Heidelberger Systems werden vorgestellt. Fluoreszenzmarkierte Chromsomen durchqueren schnell, einzeln, nacheinander einen „bandförmig" fokussierten Laserstrahl. Die Auflösung des Systems kann mithilfe von Computersimulationen bestimmt werden. Hierzu wurde ein Computerprogramm geschrieben, das die Wellenpropagation durch die fokussierenden Elemente beschreibt. Da die Chromosomen aufgrund der hydrodynamischen Fokussierung im Flußsystem senkrecht zum Laserstrahl orientiert sind, wird deren Fluoreszenz zeitaufgelöst, d.h. räumlich längs der Chromosomenachse, angeregt und detektiert. Somit erhält man verschieden Intensitätsprofile für normale, dizentrische und Translokationschromosomen (nach FISH in Suspension). Die Echtzeitverarbeitung mit einem Parallelcomputer erlaubt eine Signalauswertung in weniger als 600µs. Die gewünschten Profilparameter können per Software frei gewählt werden und ein schnelles Sortiermodul kann über den Computer angesteuert werden. In der Größenordnung von 100 Chromosomen pro Sekunde können analysiert und sortiert werden. Dies eröffnet neue Möglichkeiten im Falle seltener Ereignisse wie z.B. in der biologischen Dosimetrie, wo durch diese Technik nur noch jene Chromosomen für eine Mikroskopanalyse aussortiert werden müssen, die aufgrund ihres Slit-Scan Profils als „aberrant" klassifiziert wurden.

Literature: Hausmann M, Dölle J, Schurwanz M, Cremer C: Slit-scan flow fluorometry and sorting of chromosomes: A fast preanalysis system for microscopy. Microscopy and Analysis 7/95 (1995) 27-29

Durchflußzytometrische Charakterisierung von Bakterienpopulationen aus Batchversuchen nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten, rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden

Carsten Herrmann, Andreas Lösche, Thomas Bley

Projektgruppe Biosignale, Abteilung Biotechnologie, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig, Permoserstr. 15, 04138 Leipzig.

Die Kombination von Durchflußzytometrie und *in situ*-Hybridisierung von Bakterien mit fluoreszenzmarkierten, rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden wurde hier verwandt, um Fragen zur Substratpartizipation und Wachstumsdynamik von *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 und *Acinetobacter sp.* in Batchkultivierungen zu beantworten.
Beide Bakterienstämme zeichnen sich durch ihre Potenz beim Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen (Phenole und Benzoate) aus. In ersten Batchversuchen wurden beide Stämme auf Acetat als Haupt-C-Quelle sowohl in jeweiliger Reinkultur und auch als einfache Mischpopulation kultiviert.
Als Gensonden für die Hybridisierungsexperimente wurden kurze synthetische Oligonukleotide (aus 15-20 Nukleotiden) eingesetzt, die an die komplementäre Sequenz auf der 16 S-rRNS bzw. der 23 S-rRNS binden (Übersicht bei Amann, 1995). Als phylogenetischer Marker eignen sich die rRNS-Moleküle, weil sie teilweise einzelsträngig, natürlicherweise amplifiziert vorliegen und weil phylogenetische Zuordnungen auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen möglich sind (Woese, 1987). Neben einer Universalsonde, die sich gegen die Domäne der Bacteria richtet, wurden zwei Sonden, die die Beta- und Gamma-Gruppe der Proteobakterien erfassen und gattungsspezifische bzw. stammspezifische Sonden eingesetzt. Eine eindeutige Identifizierung und Trennung der benutzten Stämme war so möglich.
Als Strukturelement der Ribosomen ist der rRNS-Gehalt bei Bakterien mit der Wachstumsgeschwindigkeit korreliert, daher ist die Stärke des Hybridisierungssignals, gemessen als Fluoreszenzsignalstärke bei der Durchflußzytometrie, auch ein Maß für den physiologischen Zustand der Zellen (Wallner, 1993).
Verschiedene Stadien von *Acinetobacter sp.* aus einer Batchkultur wurden mit fluoresceinmarkierten Sonden hybridisiert. Beim Einsatz von nur einer Sonde ergaben nur die Proben aus exponentiell wachsenden Stadien ein detektierbares Signal. Eine Signalverstärkung konnte durch den gleichzeitigen Einsatz von bis zu drei verschiedenen Sonden erreicht werden, so daß alle Stadien der Kultur (lag-, log- und stationäre Phase) detektierbar waren.
Eine weitere Strategie zur Signalverstärkung ergab sich beim Einsatz von Farbstoffen mit höherer Quantenausbeute wie dem Cyaninfarbstoff CY3. Bei Anregung mit der 514 nm Linie des Argon-Lasers zeigte sich bei Experimenten mit einer CY3-markierten, gattungsspezifischen Sonde vergleichbare Signalstärken zu dem Versuch mit drei fluoresceinmarkierten Sonden.
Eine getrennte Detektion der Mischpopulation aus beiden Stämmen war wegen überlappender Spektren der Farbstoffe Fluorescein (grün) und CY3 (rot-orange) bei gleichzeitiger Hybridisierung mit den spezifischen Sonden nur in der Fluoreszenzmikroskopie und Bildauswertung möglich.

Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 134-169.

Wallner, G., Amann, R., Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. Cytometry. 14: 136-143.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.

Anti-p53-Autoantikörper in Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle

Ch. Hofele*, M. Volkmann+, M. Schmitt*, W. Fiehn+, J. Zöller*, J. Mühling*

(*Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Heidelberg, INF 400, D-69120 Heidelberg, Germany, +Zentral-Labor der Medizinischen Universitätsklinik, Bergheimer Str. 58, D-69115 Heidelberg, Germany)

Aberrationen im p53 Gen sind die häufigsten genetischen Veränderungen bei der Entstehung maligner Tumore des Menschen. Oft finden sich Punktmutationen, die zu erhöhten Spiegeln eines aberranten p53 Proteins in den Tumorzellen führen. Dieses zelluläre Protein scheint im Laufe der Tumorentwicklung immunogen zu werden und induziert die Produktion zirkulierender Antikörper gegen p53. In unserer Studie untersuchten wir bis jetzt die Seren von 69 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle vor Beginn der Behandlung. Als Kontrollgruppe dienten 79 Seren von Patienten ohne Karzinomanamnese oder -Verdacht. Zum Nachweis der p53-Autoantikörper verwendeten wir einen ELISA (Dianova, Hamburg).

Bei 25% der Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle fanden sich p53-Autoantikörper (38% bei Patienten mit Rezidiven bzw. lokalen Zweitkarzinomen). Keines der Kontrollseren war positiv. Die anti-p53-positiven Patienten waren im Durchschnitt jünger als die negativen. Bei Frauen fand sich eine wesentlich höhere Rate von anti-p53-positiven Seren. Zwischen der klinischen TN-Klassifikation des Tumors und dem Auftreten von p53 spezifischen Autoantikörpern fand sich keine Korrelation. Ein Zusammenhang des Nachweises von p53-Autoantikörpern scheint aber mit dem histologischen Grading, dem sonographischen Tumorvolumen und in Fällen mit Rezidiven bzw. lokalen Zweitkarzinomen zu bestehen. Unsere Ergebnisse zeigen, daß der p53-Autoantikörper-Status möglicherweise eine Bedeutung in der Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle erlangen kann, daß aber weitere Studien durchgeführt werden müssen, um die klinische Bedeutung von p53-Autoantikörpern (vor allem in Hinblick auf die Frühdiagnostik bei Rezidiven bzw. lokalen Zweitkarzinomen und den Verlauf des Antikörpertiters unter Therapie) voll zu erfassen.

Zellvolumen- und Zellzyklusanalysen verschiedener Saccharomyces-Hefen

K.-J. Hutter, DKFZ Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 280
R. Süßmuth, Institut f. Mikrobiologie, Univ. Hohenheim
J. Schärfe, Schärfe System, Reutlingen

Biotechnologische Prozesse stellen ein komplexes, biologisches System dar, bestehend aus mikrobiellen Zellen, die durch ihre chemische und physikalische Umgebung direkt beeinflußt werden. Zur Kontrolle solcher Prozesse sind Beobachtungen des Zellzustandes während der Kultivierung erforderlich. Hierzu eignen sich schnelle und direkte elektronische Zellvolumen- und flußzytometrische Meßverfahren.

Das Zellvolumen von Saccharomyces-Hefen ist stammspezifisch, allerdings morphologisch sehr heterogen. Die Zellgröße einer Hefepopulation in einer statischen Kultur ändert sich mit den Wachstums- und Milieubedingungen. Dabei erschwert die Polyklonalität der Heferassen die morphologische Zuordnung.

Zellen aus der Ruhephase müssen zunächst ein Größenwachstum (critical size) absolvieren, bevor sie den Zellzyklus initiieren können. Mutterzellen hingegen können unter optimalen Wachstumsbedingungen sofort einen neuen Zellzyklus beginnen. Diese unterschiedlichen Größenklassen entsprechen Hefezellen in unterschiedlichem Alter. Die Charakterisierung einer Zellpopulation nach dem Alter wäre für die Regelung und Steuerung eines biotechnologischen Prozesses von großer Bedeutung. Die elektronische Zellvolumenmessung (CASY) wurde mit entsprechenden flußzytometrischen Daten an verschiedenen Hefen verglichen.

Lit.: Carter, B.L.A., Jagadish, M.N.: Exptl. Cell Res. 112, 15-24 (1978)

Lebend / Tot-Anfärbung von Bakterien mit einen neuen 488 nm anregbaren Nukleinsäurenfarbstoff. Paul J. Millard, Bruce Roth, Stephen T. Yue, Laurie J. Jones, Martin Poot. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR 97402, USA.

Der SYTOX Green Farbstoff ist ein neuer fluoreszierender Nukleinsäurenfarbstoff, welcher nicht Membrangängig ist. Dieser Farbstoff empfindet eine 1500-fache Verstärkung der Fluoreszensemission bei 523 nm nach Bindung an der DNA, und zeigt eine Quantenausbeute von 0.64. Obwohl das Absorptionsmaximum vom SYTOX Green Farbstoff nach Bindung an der DNA bei 502 nm liegt, ist der SYTOX Green Farbstoff sehr wohl mit Hilfe eines Argon-Lasers bei 488 nm anregbar. Der SYTOX Green Farbstoff wird von eukaryontischen und prokaryontischen Zellen mit intakter Membran völlig ausgeschlossen, während alle Zellen mit einer geschädigten Membran hellgrün fluoreszieren. Dadurch ist die Fluoreszens vom SYTOX Green Farbstoff in Zellen mit geschädigter Membran 10- bis 100-fach größer als in Zellen mit intakter Membran; diese Eigenschaft erlaubt die Unterscheidung von lebendigen und toten Bakterien mittels durchflußzytometrischer Verfahren. Die Wirkung von Antibiotika des ß-Lactamtyps auf Escherichia coli konnte nach Anfärbung mit dem SYTOX Green Farbstoff durchflußzytometrisch dargestellt werden. Darüberhinaus, konnte mittels Fluoreszensmikroskopie nach Kombinationsfärbung mit SYTOX Green Farbstoff und Oberflächenmarker konjugiert mit AMCA-X oder Texas Red-X, wie z.B. Wheat Germ Agglutinin oder Antikörper, die gleichzeitige Identifizierung und Vitalitätsuntersuchung von Bakterien erzielt werden. Diese Studien haben gezeigt, daß der SYTOX Green Farbstoff eine gute Alternative zur Lebend / Tot-Darstellung von Bakterien mittels Propidium Iodid in einer großen Zahl von Anwendungen ist.

DNS-Bildzytometrie bei Schnittpräparaten: Messung kompletter oder angeschnittener Zellkerne?

T. Klapperstück, W. Wohlrab
Klinik für Hautkrankheiten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Die Bestimmung des totalen DNS-Gehalts von Tumoren kann mit Durchflußzytometrie und Bildanalyse durchgeführt werden. Die interaktive Bildanalyse Feulgen gefärbter Präparate bietet die Möglichkeit, morphologische Kriterien in die Selektion der zu messenden Zellkerne einzubeziehen. Dies ist insbesondere dann ein Vorteil, wenn die zu untersuchende Zellpopulation zahlenmäßig klein ist und in der Durchflußzytometrie im DNS-Histogramm untergeht. Verwendet werden meistens Ausstriche, Abtupfpräparate und aus Paraffin eingebettetem Gewebe isolierte Kerne. Im Schnittpräparat ist die Identifizierung von verschiedenen Geweben am sichersten, jedoch muß mit dem Vorhandensein von inkompletten Kernen und Kernüberlappungen gerechnet werden. Das Ziel der vorliegende Studie war zu überprüfen, ob die Messung am Schnitt dennoch zu glaubwürdigen Ergebnissen führt.
Hierzu wurden Ausstriche und die korrespondierenden Schnitte von 25 Melanomen mit dem digitalen Bildanalysesystem CYDOK (Carl Hilgers) untersucht. Die Ausstriche wurden von frisch operiertem Gewebe durch Zellvereinzelung (Zitronensäure-Tween 20) gewonnen. Zuerst wurden 25 Ausstriche mit bekanntem DNS-Histogramm (5 diploid, 20 aneuploid) ausgewählt. Die DNA indices der GO/G1-Peaks lagen in einem Bereich von 0.98 bis 2.5. Die Resultate wurden als Referenz betrachtet, da sie auf der Messung kompletter Kerne beruhten. Dann wurden zehn Schnitte mit einer Schnittdicke von 2, 4, 6 und 8 µm gemessen, um eine optimale Schnittdicke herauszufinden. 8 µm Schnitte zeigten die beste Histogrammqualität und wurden im folgenden für den Datenvergleich verwendet. Es wurde versucht, angeschnittene Kerne durch sorgfältiges Fokussieren in beide Richtungen auszuschließen. Die Ergebnisse von Schnitt und Ausstrich wurden hinsichtlich des DNA Index der GO/G1-Peaks (DI), der 5c Exceeding Rate (5cER) und des Proliferationsindex (PI) miteinander verglichen (Rangkorrelation nach Spearman). Als diploid betrachtet wurden Stammlinien mit einem DI von 0.9 bis 1.1 (Referenz spindelförmige Kerne bzw. Fibroblastenkerne).
Die Qualität der Histogramme von Ausstrichen war in Bezug auf die CV-Werte der GO/G1-Peaks denen der Schnitte überlegen. Dennoch hatte dies keine Auswirkungen auf die Bewertung der DNA-Ploidie. Die DIs der GO/G1-Peaks wiesen ein hohes Maß an Übereinstimmung auf (r_S=0.95). Sowohl für die 5cER als auch den PI wurden nicht so hohe Korrelationskoeffizienten gefunden (r_S=0.84 bzw. 0.77). Die 5cER erscheint jedoch auch beim Schnitt noch verwendbar, da vermutlich die Präsenz von Kernen mit einem DI>2.5 von größerer Bedeutung ist als der genaue Prozentsatz. Es ist offenbar möglich, die Anzahl von angeschnittenen Kernen, die gemessen werden, bei Verwendung einer geeigneten Schnittdicke und sorgfältiger Selektion deutlich zu reduzieren.

ZEITVERSCHIEBUNG DES CIRCADIANEN MUSTERS VON LYMPHOZYTEN-SUBPOPULATIONEN UND EXPRESSION VON CD2, CD11a UND CD44 IM PERIPHEREN MENSCHLICHEN BLUT

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

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

Signifikante circardiane Schwankungen wurden in früheren Untersuchungen für T-Lymphozyten, ihre Subpopulationen und B-Zellen mittels Cosinor-Rhythmometrie festgestellt (1). Hier wurde die Zeitkonstanz dieses circadianen Zellmusters für menschliche Immunzellen wie folgt untersucht: Im Abstand von einem Jahr wurde venöses EDTA-Blut von drei gesunden Männern in jeweils vierstündigen Intervallen über 48 h entnommen und die folgenden Zellanalysen durchgeführt: Im Cell-Dyn 1600 (Sequoia Turner Corp., USA) wurden Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl bestimmt sowie Hämatokrit und Hämoglobin. Leukozytendifferenzierung und Lymphozytensubpopulationen wurden mittels Doppelmarkierung mit monoklonalen Reagenzien im FACSCan untersucht (Becton Dickinson)(2). Die Signifikanz circadianer Rhythmen wurde mittels Cosinor-Rhythmometrie evaluiert (3).
Ergebnisse und Diskussion. Die peak time signifikanter circadiane Veränderungen verlagerte sich für T-Lymphozyten und ihre Subpopulationen CD4+3+, CD8+3+ von 23 h-24 h (wie bereits beschrieben (1)) nach 14 h-15 h. Diese Zeitverschiebung war für CD19+ B-Zellen weniger ausgeprägt. Diese Veränderungen waren unabhängig von Tagesschwankungen der Erythrozytenparameter. Vergleichbare Zeitverschiebungen des circadianen Zellmusters wurden bei der Markierung von T-Lymphozytensubpopulationen mit CD2 (LFA-2), CD11a (LFA-1α) und CD44 (Pgp-1) gefunden, die sich nahezu vollständig anfärbten. Dies indiziert langzeitliche Verschiebungen bei der Rezeptorexpression von T-Zellen bzw. in ihrem Aktivierungszustand. CD19+ B-Zellen wurden dagegen mit CD44 und/oder CD11a nur teilweise angefärbt, wobei keine Unterschiede in der peak time signifikanter circadianer Schwankungen von CD44 bzw. CD11a positiven und negativen Zellen gefunden wurden. Diese Befunde machen langzeitliche Änderungen des homing Verhaltens von T- und B-Zellen wahrscheinlich mit Änderungen in ihrem Aktivierungszustand.

1. T.O. Kleine, R. Hackler et al. (1993) J. interdiscipl. Cycle Res. 24: 236-9.
2. T.O. Kleine, R. Hackler, A. Raffael. In: Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. (G. Schmitz, G. Rothe Hrsg.) Schattauer Stuttgart 1994, S.217
3. W. Nelson, Y.L. Tong, F. Halberg (1979) Chronobiologia 6: 305-323.

DER EINFLUß VON TOTALEM SCHLAFENTZUG AUF CIRCADIANE SCHWANKUNGEN VON LYMPHOZYTENPOPULATIONEN IM VENÖSEN BLUT VON GESUNDEN

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

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

Im peripheren Blut von Gesunden wurden signifikante circadiane Schwankungen von T-Lymphozyten und B-Zellen in Form einer Cosinus-Funktion beschrieben (1) mit Abweichungen, die größer als die Impräzision der angewendeten Verfahren waren (2). Hier wird der Einfluß von totalem Schlafentzug auf diese Schwankungen wie folgt untersucht: Venöses EDTA-Blut wurde von 4 gesunden Männern um 7 h, 13 h und 19 h an drei aufeinander folgenden Tagen entnommen bei totalem Schlafentzug vor dem 2. Tag und normalem Nachtschlaf (22 h bis 6 h) vor dem 1. und 3. Tag. Es wurden folgende Zellanalysen durchgeführt (3): Im Cell-Dyn 1600 (Sequoia Turner Corp., USA) wurden Leukozyten- und Erythrozytenzahl bestimmt sowie Hämatokrit und Hämoglobin. Leukozytendifferenzierung und Lymphozytensubpopulationen wurden mittels Doppelmarkierung mit monoklonalen Reagenzien im FACSCan untersucht (Becton Dickinson). Signifikante Unterschiede der Mittelwerte von Lymphozytenzahlen pro μl zwischen dem 1. und 2. bzw. 3. Tag wurden mittels gepaartem t-Test berechnet.
Ergebnisse und Diskussion. Die Lymphozytengesamtzahl nahm um 7 h am 2. und 3. Tag um 20% bzw. 31% signifikant ($p < 0{,}05$) gegenüber dem 1. Tag ab, nicht jedoch um 13 h und 19 h; ebenso die CD3+ -Zellzahl um 13% bzw. 29%, die CD4+3+ -Zellzahl um 16% bzw. 30% und die CD8+3+ -Zellzahl um 11% bzw. 16% signifikant. Die HLADR+CD3+ -Zellzahl war um 7 h signifikant um 25% erst am 3. Tag erniedrigt. Die CD19+ B -Zellzahl war um 7 h nur am 3. Tag signifikant um 43% vermindert, während die NK-Zellen CD15+56+3- um 7 h am 2. und 3. Tag um 46% bzw. 28% signifikant erniedrigt waren und nicht signifikant um 19 h. Diese Ergebnisse weisen auf signifikante Veränderungen im zellulären Immunsytem nach totalem Schlafentzug hin mit Störungen seines circadianen Zell-Musters, die sich auch nach einem Erholungsschlaf nicht völlig normalisiert hatten.

1. T.O. Kleine, R. Hackler et al. (1993) J. interdiscipl. Cycle Res. 24: 236-8.
2. T.O. Kleine, R. Hackler, J. Albrecht (1992) Klin. Lab. 38: 308-309.
3. T.O. Kleine, R. Hackler, A. Raffael. In: Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. (G. Schmitz, G. Rothe Hrsg.) Schattauer Stuttgart 1994, S.217.

Fast-Kinetics-Messungen von intrazellulärem Ca^{2+} mit dem FACScan™

Ladusch, M., Jüngel, A., Drößler, K.
Universität Leipzig, Institut für Zoologie, Talstraße 33, 04301 Leipzig

Ionophoren und einige Agonisten wie z.B. fMLP induzieren in Leukozyten eine sehr schnelle Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in der Größenordnung von wenigen Sekunden oder sogar Millisekunden. Diese schnellen Änderungen sind mit den üblichen Durchflußzytometern nicht ohne weiteres zu verfolgen. Meist kann man nur noch feststellen, daß eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ stattgefunden hat. Das Ziel unserer Untersuchungen war, die Möglichkeiten des FACScan™ für Kurzzeitmessungen an Fluo-3-gefärbten Zellen bei Verwendung dieser Stimulatoren zu prüfen.
Wir haben ein einfaches Protokoll mit Veränderungen am Meßröhrchen erarbeitet, das die direkte Injektion des Stimulators in die Zellsuspension während laufender Datenaquisition gestattet. Die Totzeit zwischen Injektion und dem Auftreten erster Signale aus dem Injektionsvolumen im Meßpunkt wurde zu 2,8 s bestimmt. Diese Gerätekonstante kann nur mit erheblichem Aufwand bei der Modifikation von Sample tube, Meßzelle und Probendruckregulation deutlich verkürzt werden.
Der Zeitpunkt, an dem die ersten Zellen analysiert werden, die bereits Kontakt mit dem Stimulator hatten, wird bei der Messung durch das Auftreten von Latices im Meßverlauf angezeigt. Die stark grün fluoreszierenden Polystyren-Latices (2,65 µm) wurden der Stimulator-Lösung zuvor in einem ausgetesteten Verhältnis zugemischt.
Dose-Response-Untersuchungen mit fMLP in einem breiten Konzentrationsbereich ($2 \cdot 10^{-6}$ bis $2 \cdot 10^{-13}$ M) an humanen neutrophilen Granulozyten zeigten, daß nicht die Höhe der maximalen Kalziumkonzentration, jedoch die Geschwindigkeit, mit der sie erreicht wird, dosisabhängig ist. Die Granulozyten weisen bei der niedrigsten Dosis ($2 \cdot 10^{-13}$ M) die maximale Fluoreszenz nach 5,6 s und bei Konzentrationen oberhalb von $2 \cdot 10^{-7}$ M bereits innerhalb der Totzeit (2,8 s) auf.
Unsere Meßanordnung gestattet die durchflußzytometrische Darstellung von $[Ca^{2+}]_i$-Oszillationen an Neutrophilen aus Humanblut. Die Zugabe von fMLP in Konzentrationen zwischen 10^{-11} und 10^{-12} M führte in der Mehrheit dieser Zellen zu partiell synchronisierten $[Ca^{2+}]_i$-Änderungen mit einer Phasenlänge zwischen 20 und 23 s. Nach einer Oszillation geht parallel zur Abnahme von $[Ca^{2+}]_i$ die Synchronität bereits wieder verloren.

Flußzytometrische Charakterisierung von Präadipozyten aus dem Muskelgewebe

Bertold Löhrke, Torsten Viergutz, Jochen Wegner, Klaus Ender

Einleitung. Muskelgewebe enthält eine relativ kleine Zahl undifferenzierter fibroblastoider Zellen. Sie können Merkmale sowohl von Adipozyten als auch Chondroblasten entwickeln. Im Gegensatz zu Zell-Linien ist über die adipogene Programme auslösenden Faktoren wenig bekannt. Methoden. Muskelbioptate von wachsenden Rindern wurden durch Kollagenase verdaut, die Suspension bei 200g und 2000g zentrifugiert und die Zellen vor und nach Kultur mit Insulin (I), Cortisol (C) und Noradrenalin (NA) flußzytometrisch den Gruppen > 15 µm und starke Granulierung (I), 10-14 µm und mittlere Granulierung (II), 5-9 µm und mittlere Granulierung (III), 5-9 µm und geringe Granulierung zugeordnet. Die Genexpression auf Proteinebene für Protein S-100 und für die proliferative Signaltransduktion (Ras) wurde immuntechnisch und die Fettvesikelbildung über Nile Red erfaßt. Caseinfluoreszein diente zum Nachweis von Makrophagen mit Caseinrezeptoren. Funktionelle Teste wurden für die Dihydrorhodamin (DHR)-Oxidation, PMA-angeregte DHR-Oxidation, Fettsäurenaufnahme (Dodecanoyl-Bodipy), unspezifische Esterasenaktivität (Calcein AM), Cathepsine B und L (Rhodamin-110-bis (CBZ-L-alanyl-L-arginyl-L-arginamid) und Membranpotentiale (Bis(1-3 Dibutyl-Barbitursäure) trimethinoxonol) durchgeführt. Rezeptoren für Opioide, Kortikosteroide, und β- Adrenozeptoren wurden mit Fluoresceinkonjugaten (Naloxon, Dexamethason, CGP12177A) bestimmt. Ergebnisse. *Zellen vor der Kultur.* 1) Die IV-2000g-Gruppe enthielt den größten Zellanteil mit Fettvesikelfluoreszenz (18% von 4% der Gesamtzellen, die dieser Gruppe zugeordnet wurden), IV-200g den geringsten. 2) Entsprechend der Funktionsteste und der Caseinrezeptorexpression waren I-200g und I-2000g, sowie II I-200g- und 2000g- Zellpopulationen mit Magrophagen angereichert (bis zu 40%), obwohl 30% (I-200g) und 50% (I-2000g) dieser Zellen Ras exprimierten. 3) Protein S-100 war in 25% der II-200g-, 20% der II-2000g- und 15% der III-2000g-Zellen nachweisbar. 4) IV-200g- und 2000g Zellen exprimierten weder Ras noch Protein S-100. *Kultivierte Zellen.* IV-200g- Zellen wurden durch I zur Ras-Expression angeregt. C oder NA hemmte die I-Wirkung. Protein S-100 wurde durch NA exprimiert. I+C erhöhte Ras und I stimulierte die Protein S-100-Expression bei II-200g- Zellen, II-2000g- Zellen antworteten auf I+NA oder NA mit einer Ras- und Protein S-100 Erhöhung, die durch C hemmbar war. Schlußfolgerungen. IV-200g- Zellen ohne Lipidvesikel sowie Ras- und Protein S-100- Expression können durch I die proliferative Signaltransduktion (Ras) und durch NA eine Adipozytenmarkerexpression (Protein S-100) in Gang setzen. Da in dieser Zellpopulation nach Kultur auch Lipidvesikel auftraten, könnte sie Präadipozyten enthalten, deren adipogenes Programm durch I und NA aktiviert wird.

FLOW CYTOMETRY ANALYSE MIT AKTIVIERTEN MIKROPARTIKEL

Reinhard Malsch, Lukas Piazolo, Daniel Melui und Job Harenberg
First Dept. of Medicine, Faculty of Clinical Medicine Mannheim, University of Heidelberg, Theodor Kutzer Ufer, 68167 Mannheim, Germany.

Ferromagnetische und nicht magnetische Mikropartikel werden in verschiedenen Größen und mit verschiedenen aktivierten Gruppen angeboten. Die Zielsetzung unserer Arbeiten war daher diese Partikel auf ihre Eignung zur Synthese von Heparin und Protamin-Mikropartikeln zu untersuchen. Partikel mit Carboxyl- Hydroxyl- und Aminogruppen-Aktivierung wurden zur Synthese von Heparin-Mikropartikeln benutzt. Carboxy-aktivierte Mikropartikel wurden durch Katalyse mit Cyclocarbodiimiden (26 mM) aktiviert und banden Heparin (M = 11000 Da) an ihre Oberfläche. Zur Synthese von Hydroxyl- und Aminogruppen aktivierten Heparin-Mikropartikeln konnte dieses Verfahren ebenso verwendet werden. Die Partikel unterschieden sich in der Anzahl der gebundenen Gruppen und ihrer relativen Größe im Flow Zytometer. Parallele Reaktionen zeigten daß die Bindungsregionen für die antikoagulante Reaktion intakt blieben. Mit dem chromogenen Test S 2222 wurden 589 ± 97.2 antifactor Xa Einheiten/mg und mit dem S 2238 Test 798 ± 138 Antithrombin Einheiten/mg für die Heparin-Mikropartikel gemessen.
Protamine (M = 6000 Da) wurde an Carboxyl und Tosyl-aktivierte Mikrobeads verschiedener Größen gebunden. Zwischen 0.65 und 0.75 aXa Einheiten/ml Heparin Lösung wurden neutralisiert durch 0.1µg Protamin-Mikropartikel. Die Protamin-Mikropartikel banden Dosisabhängig Fluoreszenz markiertes niedermolekulares Heparin-Tyramin (LMMH-tyr-fitc) sowohl in wässriger Lösung , im Plasma als auch im Vollblut.. Die relative Fluoreszenzintensität (RFI) der gebundenen Heparin-Tyramin-Fitc Konzentration wurde durch die Flow Zytometrie Analyse mit einem direkten und indirektem Heparinbindungsassay nach (Piazolo et al: Semin Thromb Haemostas 20: 227-235, (1994) bestimmt..
Qualitative und quantitative Analysen der Heparinkonzentration in wässriger Lösung, im Plasma und im Vollblut können mit den Heparin- und Protamin-Mikropartikeln durchgeführt werden.

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

Standardisierung von Protamin-Microbeads mit Hilfe der Durchflußzytometrie zur Bestimmung der Heparinkonzentration

Daniel Melui, Reinhard Malsch, Lukas Piazolo und Job Harenberg
1. Medizinische Klinik, Fakultät für klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer, 68167 Mannheim

Zur Bestimmung der Heparinkonzentration in Plasma und Vollblut wurde ein Microassay mit Hilfe der Durchflußzytometrie entwickelt. Heparin wurde in diesem Assay an oberflächen-gebundenes Protamin der Microbeads gebunden (Piazolo et al: Semin Thromb Haemostas 20: 227-235, (1994). In dieser Untersuchung wurden Protamin-Microbeads verschiedener Hersteller optimiert und mit Hilfe der Durchflußzytometrie auf ihre Größe und ihre Bindungsfähigkeit für fluoreszenzgelabeltes niedermolekulares Heparin (LMMH-tyr-fit) untersucht.

In einem ersten Ansatz wurde die Größe von Estapor-Microbeads (M1-070/60 und M1-180/12) und Dynabeads (M-450) miteinander verglichen. Die Estapor-Microbeads wurden zwischen 10 µg/ml und 200 µg/ml in 0.9 % NaCl und in lysiertem Vollblut zwischen 33 µg/ml und 100 µg/ml gemessen. Die Dynabeads wurden zwischen 6 µg/ml und 60 µg/ml in 0.9 % NaCl und in lysiertem Vollblut in einer Konzentration von 30 µg/ml gemessen.
Ein Einfluß verschiedener pH-Werte (7.0, 7.5, 8.0, 8.5) des Puffersystems bei der Beschichtung der Dynabeads (M-450) mit Protamin auf ihre relative Größe konnte nicht festgestellt werden.

In einem zweiten Ansatz wurde die Bindung von Protamin-Estapor-Microbeads (M1-070/60 und M1-180/12) und Protamin-Dynabeads (M-450) mit fluoreszentem Heparin (LMMH-tyr-fitc) untersucht. Nach Inkubation von Protamin-Microbeads mit LMMH-tyr-fitc wurde die relative Fluoreszenzaktivität (RFI) der an den Protamin-Microbeads gebundenen LMMH-tyr-fitc-Moleküle gemessen. Die Bindungsfähigkeit von Protamin-Microbeads für LMMH-tyr-fitc wurde in wässriger Lösung, Plasma und Vollblut untersucht. Zur Standardisierung der Bindungsfähigkeit von Protamin-Estapor-Microbeads (M1-070/60 und M1-180/12) und Protamin-Dynabeads (M-450) wurde die relative Fluoreszenzaktivität (RFI) in einer Verdünnung von 1:1000 gemessen (Fünffachbestimmungen!).
Die höhere Bindungsrate und Sensitivität der Protamin-Estapor-Microbeads M1-180/12 konnte von den homogeneren Protamin-Dynabeads nicht erreicht werden, während die Protamin-Estapor-Microbeads M1-070/60 den Protamin-Dynabeads gleichwertig waren. Mit einem kompetitiven Bindungsassay zeigten die Protamin-Dynabeads mehr Vorteile. Sie wiesen eine höhere Sensitivität auf und zeigten eine lineare Standardkurve im Vergleich zu den Protamin-Estapor-Microbeads.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Protamin-Dynabeads den Protamin-Estapor-Micobeads vorzuziehen sind, da sie ebenfalls zur Bestimmung der Heparinkonzentration benutzt werden können.

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

Durchflußzytometrische Bestimmung der Apoptose in T-Zell-Linien der Ratte

Eilhard Mix[1], Uwe K. Zettl[1,2], Jürgen Zielasek[2], Martin Stangel[3], Klaus V. Toyka[2], Hans-Peter Hartung[2], Ralf Gold [2]

[1]Abteilung Neurologie der Nervenklinik, Universität Rostock,
[2]Neurologische Klinik, Abteilung für Neuroimmunologie und Klinische Forschergruppe für Multiple Sklerose, Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
[3]Neurologische Klinik, Freie Universität Berlin

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein wichtiger Mechanismus der T-Zell-Elimination während der Ontogenese des Immunsystems, der Toleranzinduktion und der Limitierung von Autoimmunerkrankungen. Zu den Apoptoseinduktoren zählen neben Steroidhormonen und bestimmten Zytokinen (Tumornekrosefaktor) auch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite. Wir haben den Apoptose-induzierenden Effekt von H_2O_2 und $NO^{\bullet}$ auf aktivierte autoreaktive $CD4^+$ T-Zellen geprüft, die im Tiermodell die demyelinisierenden Erkrankungen Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) und Experimentelle Autoimmun-Neuritis (EAN) übertragen.
Für die Quantifizierung der apoptotischen Zellen wurde die Methode des *In-situ*-Tailing mit Fluoreszein-ddUTP und anschließender durchflußzytometrischer Analyse benutzt. Sowohl direkt appliziertes H_2O_2 (10µM - 300µM) als auch Sauerstoffmetabolite des Hypoxanthin/Xanthinoxidase-Systems bewirkten nach 6-18h Kultur eine dosisabhängige Apoptose von 13-33% der Zellen in enzephalitogenen und neuritogenen T-Zell-Linien. Die Prozentzahlen apoptotischer Zellen in Ovalbumin-reaktiven Kontroll-T-Zellen waren etwas niedriger (8-24%). $NO^{\bullet}$, freigesetzt aus dem Penicillaminderivat SNAP, induzierte maximale Apoptoseraten von 23% bzw. 38% in zwei verschiedenen enzephalitogenen T-Zell-Linien (reaktiv gegen Myelin-basisches Protein) und von 23% in einer neuritogenen T-Zell-Linie (reaktiv gegen das periphere Myelinprotein P_0). Ovalbumin-spezifische T-Zellen waren weniger sensitiv (9% apoptotische Zellen), hatten aber auch weniger In-vitro-Passagen durchlaufen.
Die Befunde lassen den Schluß zu, daß reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite, die von infiltrierenden Makrophagen bei entzündlichen demyelinisierenden Erkrankungen freigesetzt werden, eine krankheitslimitierende Rolle spielen könnten, indem sie aktivierte autoreaktive und Bystander-T-Zellen über Apoptoseinduktion eliminieren.

DNS - Verteilungen einiger Bakterienspezies: Einfluß von Wachstumsphase, Wachstumsrate und Nährstoffen

Susann Müller, Andreas Lösche und Thomas Bley

Projektgruppe Biosignale, Abteilung Biotechnologie,
Universität Leipzig, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig

Zustandsverteilungen in mikrobiellen Populationen und die Untersuchung von zustandsabhängigen Leistungen spielen in der biotechnologische Forschung bis heute noch keine große Rolle. Es ist aber wichtig, den Prozeß der Differenzierung einer Population in Subpopulationen mit deutlich verschiedenen Leistungen z. B. bezüglich der Überproduktion von Metaboliten zu verstehen. Dafür sind ein flow-cytometrisches Monitoring des DNS-Gehaltes und darauf aufbauend Kenntnisse über die Regulation des Zellzyklus erforderlich. Offensichtlich gibt es bei unterschiedlichen Bakterienspezies verschiedene Mechanismen für diese Regulation, die außerdem von Menge und Zusammensetzung der Nährstoffe im Medium abhängen.

Bakterien vermehren sich auf unterschiedlichen Medien mit verschiedenen Generationszeiten. Nur in der exponentiellen Wachstumsphase (dem Zeitraum ohne jegliche Limitation) synthetisieren die Zellen die DNS entsprechend dem Modell von Cooper und Helmstetter [Cooper, S. and Helmstetter, C. E. (1968) Chromosome replication and the cell division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* 31, 519-550]. Andernfalls ist die Wachstumsrate μ wesentlich kleiner als in der exponentiellen Phase. In Abhängigkeit von den Limitationsbedingungen gehen die Zellen zum C_1- oder C_2-Gehalt an DNS über.

Im Bakterium *Methylobacterium rhodesianum*, welches in der Lage ist, Poly-3-hydroxybuttersäure zu produzieren, haben alle Zellen den doppelten Gehalt an DNS, wenn sie in einem Batch-Prozeß auf Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert werden und das Wachstum durch Stickstoffmangel limitiert wird [Müller, S. et al. (1995) A flow cytometric approach for characterization and differentiation of bacteria during microbial processes. *Appl. Mirobiol. Biotechnol.* 43, 93-101 und Ackermann, J. et al. (1995) *Methylobacterium rhodesianum* cells tend to double the DNA content under growth limitations and accumulate PHB. *J. Biotechnol.* 39, 9-20]. Bei niedrigeren Wachstumsraten (Kultivierung auf Fructose) synthetisiert nur ein Teil der Zellen PHB, und nur diese Zellen scheinen in der Lage zu sein, den doppelten Gehalt an DNS zu synthetisieren.

Die Verteilung des DNS-Gehaltes von *Acinetobacter calcoaceticus* V69 beschreibt das typische Auftreten von Zellen, die sich am Anfang einer Batch-Kultivierung entsprechend dem Modell von Cooper und Helmstetter (1968) vermehren. Bereits zwei Stunden später treten Limitationsbedingungen ein. In der stationären Phase existieren sowohl Zellen mit dem einfachen als auch mit dem doppelten Gehalt an DNS.

Für *Escherichia coli* war die entkoppelte DNS-Synthese flow-cytometrisch nicht meßbar. Allerdings zeigte die Anwendung von Rifampicin auf die *E.-coli*-Zellen (entsprechend einer Methode von Skarstad, K. and Boye, E. (1993) Degradation of individual chromosomes in recA mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 5505-5509), daß exponentielles Wachstum nur in den ersten zwei Stunden stattfand. In diesem Zeitraum beträgt der DNS-Gehalt der Zellen wenigstens das zwei- oder vierfache. Wenn Ampicillin zugesetzt wurde, fanden wir den vier- und achtfachen DNS-Gehalt. In der stationären Phase haben alle Zellen einen C_1- oder C_2-Gehalt an DNS.

FLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER REZEPTOR-ZYTOSKELETT ASSOZIATION

B. Nebe, J. Rychly

Klinik für Innere Medizin, Universität Rostock

Die Assoziation von Membranrezeptoren und dem Zytoskelett kann durch Antikörper gegen den Rezeptor nachgewiesen werden, nachdem durch Triton X-100 haltigem Puffer die unlösliche zytoskelettale Fraktion extrahiert wurde. Die Interaktion von Rezeptoren mit dem Zytoskelett kann von großer Bedeutung für die intrazelluläre Signaltransduktion sein. Mit mikroskopischen Techniken konnten wir nachweisen, daß bei einer Hepatozytenzellinie die Assoziation von Integrinrezeptoren mit dem Zytoskelett durch Kreuzvernetzung mit einem Sekundärantikörper induzierbar ist. Um objektive Aussagen über quantitative Unterschiede machen zu können, entwickelten wir eine Methode zur Analyse in der Durchflußzytometrie.

Suspendierte Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Rezeptor inkubiert und mit einem Sekundärantikörper die Kreuzvernetzung durchgeführt. Danach wurden die Zellen in Triton haltigem Puffer extrahiert. Für den Nachweis der Rezeptoren wurde dann mit einem FITC markiertem Tertiärantikörper inkubiert. Die Analyse der extrahierten Zellen erfolgte im FACScan Durchflußzytometer. Die Extrakte zeigten eine deutlich abgrenzbare Population mit geringem Vorwärts- und Seitwärtsscatter im Dotplot. Die Analysen wiesen quantitative Unterschiede in der Rezeptorassoziation mit dem Zytoskelett beim Vergleich verschiedener Integrinrezeptoren nach. Darüberhinaus ließ sich ein Unterschied zeigen zwischen der Kreuzvernetzung bei 37° C. und 4° C. Aus den Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß die Durchflußzytometrie sich als geeignete Methode anbietet, um die Rezeptor-Zytoskelett Assoziation relativ zu quantifizieren.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERLÄSSLICHKEIT VON VIER MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN (MK) GEGEN HLA-B27 BEI DER HLA-B27 TYPISIERUNG MITTELS FLUSSZYTOMETRIE (FC) IM VERGLEICH ZUM KLASSISCHEN MIKROLYMPHOZYTOTOXISCHEN TEST (MLCT)

J. Neumüller, D.W.M Schwartz*, E. Dauber*, W.R. Mayr*
Ludwig Boltzmann Institut für Rheumatologie and Balneologie, Wien, Österreich
**Klinische Abteilung für Blutgruppenserologie, Universität Wien, Österreich*

Die Typisierung des HLA-B27 wird routinemäßig mittels MLCT, kann aber auch mittels FC durchgeführt werden. Obwohl eine kontroversielle Auffassung bezüglich des Werts dieser Bestimmung für die Diagnose der Spondylitis ankylosans besteht, wird dieser Test häufig von Rheumatologen angefordert. HLA-B27 besitzt für andere seronegativen Spondarthritiden wie der reaktiven oder der psoriatischen Arthritis zwar keinen diagnostischen Wert, könnte aber den Verlauf dieser Erkrankungen beeinflussen. Zweck dieser Studie war es, die Genauigkeit und Verläßlichkeit der FC-Methode unter Verwendung von 4 unterschiedlichen MAB gegen HLA-B27 zu untersuchen. Eine vergleichende Bestimmung des HLA-B27 und kreuzreagierender Spezifitäten wurde mittels MLCT durchgeführt.

Die FC-Typisierung des HLA-B27 wurde unter Verwendung einer speziellen Software, in Kombination mit Kalibrationsbeads zur entsprechenden Einstellung des Flußzytometers vorgenommen. Es wurden FITC-markierte monoklonale Antikörper (MAK) von den Firmen Becton & Dickinson (BE), Behringwerke (BE), One Lambda (OL) und Immunotech (IT) verwendet. Zur Bestimmung des kritischen Limits für die Fluoreszenzintensität (FI) zur Unterscheidung HLA-B27$^+$ und HLA-B27$^-$ Patienten, wurde einerseits ein durch die Software vorgegebener Grenzwert verwendet (der jedoch nur für den MAK von BD gültig ist), anderseits aber ein für die anderen MAK empirisch ermittelter Grenzwert (Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten (FI) der HLA-B27$^+$ Patienten minus 2 x die Standardabweichung) eingeführt. Die Präparation der Leukozyten wurde nach dem EDTA-Vollblut-Standardprotokoll durchgeführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation mit den verschiedenen FITC-konjugierten anti-HLA-B27 MAK und einer Gegenfärbung mit einem PE-markierten MAK gegen CD3 erfolgte eine Lyse der Erythrozyten. Die Bestimmung der Bindung der anti-HLA-B27 MAK an T-Zellen erfolgte im FL1-Einfachhistogramm nach automatischem Setzen eines Gates im Doppelhistogramm FSC x FL2.

Mit allen 4 MAK konnte eine gute Diskriminierung zwischen den FI-Werten HLA-B27$^+$ und HLA-B27$^-$ Patienten erreicht werden. Kreuzreaktionen mit HLA-B7 wurden bei allen MAK (mit Ausnahme des MAK von OL) beobachtet. In 2.4 % erbrachte dieser aber ein falsch-negatives Ergebnis. Falsch-positive Ergebnisse konnten jedoch bei den MAK von BD, BE und IT aufgrund von Kreuzreaktionen mit dem HLA-B7 beobachtet werden. Fehltypisierungenen können jedoch vermieden werden, wenn mehrere MAK, inklusive des nicht-kreuzreagierenden von OL, für die HLA-B27 Typisierung herangezogen werden.

Zählung rot fluoreszierender Mikropartikel mithilfe eines kleinen kompakten Flußzytometers zur Untersuchung des Transportes in Grundwasserleitern

Stefan Niehren*, Wolfgang Kinzelbach
Institut für Umweltphysik, Karl-Ruprecht-Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld 366, 69120 Heidelberg

Stefan Seeger, Jürgen Wolfrum
Phyikalisch-Chemisches-Institut, Karl-Ruprecht-Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld 253, 69120 Heidelberg

Zusammenfassung

In Risikoanalysen von Sondermülldeponien und nuklearen Endlagern ist das Wissen über die Stuktur von klüftigen und porösen Medien von endscheidender Bedeutung. Um solche Informationen zu erhalten, können gelöste Substanzen, Wärme oder Mikropartikel als Markierungstoffe in Grundwasserleitern eingesetzt werden. Tief rot eingefärbte Mikropartikel können hochspezifisch von natürlichen Kolloiden unterschieden werden, da organische und mineralische Substanzen nur zu kürzeren Wellenlängen hin fluoreszieren. Um nun solche Partikel kontinuierlich in einem Grundwasserleiter detektieren zu können, wurde ein kompaktes und transportables Flußzytometer entwickelt, das ausschließlich mit Halbleiterkomponenten ausgerüstet ist. Die Anregung des gewählten Farbstoffes JA22 geschieht mithilfe eines einmodigen Diodenlasers in dem Anregungsmaximum bei 623 nm. Der Farbstoff verfügt bei dieser Wellenlänge über eine Quanteneffizienz von 89.9%. Die Empfindlichkeit der Photonendetektion wurde gegenüber einem Photomultiplier um ein vielfaches erhöht, indem eine Einzelphotonen zählende Avalanchediode eingesetzt wird. Die Detektionswahrscheinlichkeit des Zytometers erreicht zur Zeit mindestens 25% bei einer Probestromflußrate von 20 ml/h und einem Untergrundsignal von <160 Partikeln/ml. Da ein an Biomoleküle ankoppelbares Derivat (MR200) des gewählten Farbstoffes JA22 existiert, der optisch identische Eigenschaften besitzt, scheint eine Anwendung des entwickelten Systems im biomedizinischen Bereichs denkbar und sinnvoll. Somit könnte ein neuer Parameter in der Zytometrie etabliert werden.

Durchflußzytometrische Analyse des T-Zell-Repertoires: Ein schnelles Verfahren zur Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den variablen Bereich der Beta-Kette des humanen αβ T-Zell Rezeptors

C. Otto, F. Struck, K. Littmann-Janßen, J. Collins, A. Lingnau, K.E.J. Dittmar

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Abt. Angewandte Genetik, D-38124 Braunschweig, FRG

Durchflußzytometrische Analysen des αβ T-Zell-Rezeptorrepertoires mit Antikörpern gegen variable Bereiche der Beta-Kette sind eine zeitsparende Alternative zur RT-PCR Analytik. Mit der Kniekehlenlymphknoten-immunisierungsmethode lassen sich innerhalb von 8 Wochen geeignete Antikörper gegen variable Regionen des αβ T-Zell-Rezeptors für durchflußzytometrische Messungen herstellen und charakterisieren. Als Immunogen wurden lösliche Hybridproteine (Human/Maus T-Zell-Rezeptor) verwendet, die im variablen Teil der murinen Beta-Kette humane Sequenzen enthalten. Pro Hybridprotein wurden 3 Mäuse durch sechs subkutane Injektionen im Einflußbereich der Nodi lymphatici poplitei immunisiert. Am 17.Tag wurden die Lymphknoten der Kniekehle entnommen, die freipräparierten Lymphozyten mit P3X63.Ag8.653 Myelomzellen fusioniert und in Selektionsmedium ausgesät. Nach 8 bis 10 Tagen wurden die Hybridomaüberstände (von circa 3 bis 5000 Klonen) mit spezifischen Oberflächentransfektanten durchflußzytometrisch auf hochaffine Antikörper getestet. Die Zellen positiver Überstände wurden direkt subkloniert.

Alle gefundenen Antikörper markieren eine Subpopulation der CD3 positiven T-Lymphozyten, z.B. erkennt der Antikörper 10D6 3-4% der CD3 positiven T-Lymphozyten gesunder Spender, der Antikörper 1C7 0,1-0,5%. Die Spezifität der Antikörper wurde durch RT-PCR Analyse der mRNA sortierter Blutlymphozyten überprüft. Zur Zeit werden die Bindungskonstanten dieser Antikörper mit BIAcore ™ (Pharmacia Biosensor) ermittelt und ihr Einsatz in der Histopathologie (Paraffinschnitte) untersucht.

Bindung an Leukozyten und intakte biologische Aktivität eines Fluoreszenz-markierten niedermolekularen Heparins.

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

Es wurden die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften eines niedermolekularen Heparins, welches am Molekülende spezifisch markierten wurde, ex vivo untersucht.

In unserer Studie wurde Fluoreszein-5-isothiocyanat (Fitc) spezifisch an LMM-Heparin-Tyramin gebunden. Dieses LMM-Heparin-Tyramin-Fitc besitzt eine Antithrombin Aktivität von 5 E/mg und eine Antifaktor Xa Aktivität von 70 E/mg.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie war es uns möglich, in vitro eine dosisabhängige Bindung von LMM-Heparin-Tyramin-Fitc an Leukozyten nachzuweisen. Das Fluoreszenz-markierte niedermolekulare Heparin band in steigendem Ausmaß an Leukozyten: Lymphozyten < Monozyten < Granulozyten.

Nach intravenöser Applikation von 150 aXa E/kg Körpergewicht von LMM-Heparin-Tyramin-Fitc in Sprague-Dawly Ratten wurden Blutproben gewonnen. Mit der Durchflußzytometrie wurde die in vivo Bindung des LMM-Heparin-Tyramin-Fitc an den Leukozyten bestimmt. Um die Blutkonzentrationen in µg/ml zu errechnen, wurden die Daten der in vivo Bindung und die Daten der in vitro Standardkurven verwendet.

Zusätzlich zu den durchflußzytometrischen Untersuchungen bestimmten wir die biologische Aktivitäten im Plasma des modifizierten Heparins. Es wurden die chromogenen Substrat-Teste S 2238 und S 2222 zur Bestimmung der Antithrombin Aktivität und der Antifaktor Xa Aktivität verwendet.

Die mit Hilfe der Durchflußzytometrie gemessene Pharmakokinetik der Blutkonzentration ist vergleichbar mit der Pharmakodynamik der Antifaktor Xa Aktivität in Plasma des Fluoreszenz-markierten niedermolekularen Heparins.

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

Optische Auflösung bei der Lichtmikroskopie in der Praxis und der Einsatz einer 2π-Drehvorrichtung

Bernd Rinke, Joachim Bradl, Bernhard Schneider, Michael Hausmann, Christoph Cremer

Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, D-69120 Heidelberg

Die optische Auflösung eines konventionellen Lichtmikroskopes oder eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes kann durch Berechnung der Punktbildfunktion bestimmt werden. Normalerweise werden hierzu ideale optische Bedingungen angenommen. Diese sind jedoch in der biologischen Anwendung oftmals nicht erfüllt, insbesondere dann, wenn biochemische Erfordernisse (z.B. Pufferbedingungen) die Präparateherstellung of dem Objektträger beeinflussen („Lichtmikroskopie in der Praxis"). Die Verwendung einer Quarzglas-Kapillare anstelle eines Objektträgers ermöglicht eine Drehung des biologischen Objektes, hat jedoch einen zusätzlichen Einfluß auf die räumliche Auflösung. Eine derartige 2π-Drehvorrichtung bietet jedoch Vorteile in der 3D-Mikroskopie. Beispielsweise läßt sich damit die optimale Perspektive zur Visualisierung eines Objektes herstellen. Durch Drehung um 90° läßt sich das Problem einer im Vergleich zur lateralen Auflösung reduzierten axialen Auflösung lösen. Um Effekte der Lichtmikroskopie in der Praxis auf die optische Auflösung abzuschätzen, wurden Punktbildfunktionen unter verschiedenen, nicht-idealen Bedingungen mithilfe fluoreszierender Kügelchen im Durchmesser unterhalb der Wellenlänge gemessen. Die Ergebnisse eines standardmäßigen Objektträgers wurden mit den Ergebnissen eines Kapillareneinsatzes für verschiedene Mikroskoptypen verglichen (konventionell, konfokal). Die Ergebnisse bestätigen, daß in der Praxis die Kapillare zu einer insgesamt verbesserten 3D-Auflösung führt. Effekte der Brechungsindexanpassung und der Lichtpropagation wurden mittels Computersimulation untersucht.

CD34-Expression durch humane Endothelzellen: Abhängigkeit von Proliferation und Zellzyklus?

O. Röhrig, C.L. Klein, T. van Kooten, F. Bittinger, C.J. Kirkpatrick
Institute of Pathology, University of Mainz, Germany

CD34 ist ein stark glycosysiertes Membranprotein, das sowohl von hämatopoetischen Stammzellen als auch von den meisten humanen Endothelzellen in vivo exprimiert wird. Es wurde gezeigt, daß CD34 Selektine bindet, und somit eine Rolle als Adhäsions- molekül bei der Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel spielen kann. Im Gegensatz zur in vivo-Situation, wo die meisten Endothelzellen CD34 exprimieren, wird die Expression von CD34 in Kultur sehr schnell herunterreguliert, so daß nur noch zwischen 10 und 30% aller Endothelzellen CD34 exprimieren. Da ein Großteil des Wissens der Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen aus der Untersuchung von in vitro kultivierten Endothelzellen stammt, ist die Validität dieser in vitro Modelle von größter Bedeutung und eine Voraussetzung für die Übertragbarkeit von Ergebnissen. Die in vitro beobachtete Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM, VCAM und E-Selektin in Ruhe und nach Stimulation verhält sich analog den Beobachungen in vivo. Somit erscheint die divergente Expression von CD34 der größte phänotypische Unterschied zwischen in vivo und in vitro zu sein. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde eine flowzytometrische Untersuchung an kultivierten humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt, die die Abhängigkeit der Expression von CD34 von der Proliferation und dem Zellzyklus auf Einzelzellebene klären sollte. Mit Hilfe von Zwei- und Dreifachmarkierung nach der BrdU-PI- Methode wurde die Expression von CD34 mit dem DNA-Gehalt und dem Zellzyklus korelliert.

Die Reinheit der isolierten Endothelzellen wurde durch intrazellulären Nachweis von Faktor VIII überprüft.

Zusätzlich wurden in Kultur CD34-positive Endothelzellen mit Hilfe der MACS- Separation immunomagnetisch angereichert und die Kinetik der CD34-Expression mit der von frisch isolierten CD34 positiven Edothelzellen verglichen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden zu einem besseren Verständnis der differentiellen Expression von CD34 führen und somit beitragen, die Validität von in vitro Modellen der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion zu erhöhen.

Durchflußzytometrische Untersuchungen bei Prostata Tumoren.

K. Romanakis[1], B. Wullich[2], K. Becker[3], B. Kopper[3], und H. Zankl[1]
[1] Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik der Universität, 67663 Kaiserslautern
[2] Institut für Humangenetik der Universität, 68141 Homburg/Saar
[3] Klinikum der Stadt Kaiserslautern, 67655 Kaiserslautern

Es wurden insgesamt 76 Prostatatumoren nach Totaloperation durchflußzytometrisch untersucht. In 50 Fällen wurde sowohl eine Biopsie aus dem Tumorbereich als auch aus makroskopisch, bzw. histologisch tumorfreiem Gebiet entnommen. Bei 26 Tumoren wurden jeweils 2-4 Biopsien aus dem Tumorbereich und 1-3 Biopsien aus tumorfreien Arealen analysiert. An diesem Material sollte vor allem untersucht werden, wie oft innerhalb eines Tumors eine durchflußzytometrisch erfaßbare Heterogentität vorliegt. Außerdem war von Interesse, ob auch im normal aussehenden Umgebungsgewebe abnorme Zellen nachweisbar sind.

Nach einer modifizierten Methode von Otto (Methods in Cell Biology, 1990 Vol:33, 105-110) wurden die Prostatabiopsien zu Kernsuspensionen aufbereitet, mit DAPI gefärbt und mit einem Durchflußzytometer PAS III der Firma Partec (Münster) untersucht. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem Programm Multi-Cycle (Flow Systems, Phoenix). Die CV-Werte der Messungen lagen im Durchschnitt bei 1.86 ± 0,56.

Von den 76 untersuchten Tumoren waren 28 aneuploid. Diese 28 aneuploiden Tumoren unterteilten sich in 6 hypodiploide, 8 hyperdiploide, 3 triploide, 1 hypertriploid, 8 tetraploide und 2 hyperteraploide. Alle Biopsien aus dem Nichttumorbereich waren diploid.

Bei der Heterogenitätuntersuchungen stellten wir bei 8 der 26 Tumoren, in den verschiedenen Biopsien zusätzliche aneuploidien fest. Bei 2 dieser Tumoren waren innerhalb des Tumorareals neben der aneuploiden Biopsien 2 von 3 bzw. 3 von 4 der Biopsien diploid. Dieses Ergebnis weist auf die Notwendigkeit hin, zur Absicherung der histologischen Diagnose, mehrere Biopsien aus unterschiedlichen Arealen des Tumors zu entnehmen und evtl. durch durchflußzytometrische DNA-Analysen zu ergänzen.

Die Synthesephasefraktion der aneuploiden Zellpopulationen (bestehend aus S- + G2/M-Phase) lag durchschnittlich bei 16,6%. Bei 80% der diploiden Biopsien, die aus dem Tumorbeich stammen, wurde eine stark erhöhte mittlere Synthesephasefraktion (9.25%) im Vergleich zu den Biopsien aus tumorfreien Prostataarealen (5,9%) festgestellt. Aus dieser Differenz kann auf eine deutlich erhöhte Proliferationsrate, auch der diploiden Tumorzellpopulation geschlossen werden.

Neben der Heterogenitätsuntersuchung wurde die Auswirkung einer Collagenase-Behandlung bei der Gewinnung von Einzelzellsuspensionen untersucht. Hierbei wurden Tumorbiopsien von 22 Tumoren parallel zur Collagenasefreien Methode nach Otto mit Collagenase (8-16 Stunden) behandelt. Dabei stellten wir fest, daß aneuploide Zellpopulationen durch die Collagenase-Behandlung präferentiell verloren gingen bzw. quantitativ reduziert wurden. Da ähnliche Ergebnisse auch an anderen Tumoren erhoben wurden, sollte eine Collagenase-Vorbehandlung generell vermieden werden.

DNA-Zytometrie und Karyometrie an Cervikalen Intraepithelialen Neoplasien

M. Ruhnke, A. Coumbos und W. Kühn
Frauenklinik am Klinikum Benjamin Franklin der FU Berlin,
Hindenburgdamm 30, D-12200 Berlin

Mit DNA-Zytometrie und bildanalytischer Karyometrie können auffällige Zytologiebefunde in ein high- und low-risk Kollektiv unterteilt werden. Die Differenzierung basiert in der Hauptsache auf der Anzahl aneuploider Zellen mit einem DNA-Gehalt > 5c. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist der Vergleich bildanalytischer Untersuchungen an zytologischen und histologischen Präperaten.

Mit einem CAS 200 Bildverarbeitungssystem wurden 400 nach Feulgen gefärbte zytologische Abstriche und 78 Biopsien klinisch oder zytologisch auffälliger Patientinnen untersucht. Bestimmt wurden integrierte optische Dichte (IOD), Ploidie, Kernfläche, Kernform, Blobness und Entropie.

Die Mittelwerte der gemessenen Parameter sind in Tabelle 1 angegeben:

	IOD	Fläche	Form	Blob.	Entrop.
keine CIN	94,97	58,48	16,27	0,38	1,50
CIN 1	109,55	55,60	16,35	0,38	1,49
CIN 2	124,89	71,31	17,20	0,39	1,49
CIN 3	182,92	82,19	18,56	0,41	1,48

Bei Patientinnen ohne CIN zeigten 1,48% der Zellen einen DNA-Gehalt > 5c. Bei der CIN 1 hatten 5,13%, der CIN 2 5,47% und der CIN 3 6,37% der Zellen einen DNA-Gehalt > 5c. Der biologische und prognostische Unterschied der CIN 1 - 3 wird bei den Zellen mit einem DNA-Gehalt > 9c am deutlichsten. Bei den unauffälligen Histologien waren 0,067% der Zellen > 9c. Bei der CIN 1 waren es 0,26%, der CIN 2 0,16% und bei der CIN 2 3,33%.

Trotz methodischer Schwierigkeiten kann die bildanalytische Histometrie Cervikale Intraepitehliale Neoplasien differenzieren. Dabei sind die Unterschiede zwischen CIN 1 und 2 gering, zur CIN 3 jedoch deutlich. Dies spiegelt die bekannt ungünstige Prognose der CIN 3 wieder, wirft aberauch die Frage auf, ob die CIN 2 als high-grade lesion gewertet werden muß oder nicht.

Expression von Adhäsionsmolekülen aus der Immunglobulin-Superfamilie in humanen Nierenkarzinomzellinien. Schardt, C., Gerharz, CD., Gabbert, HE.. Institut für Pathologie, Düsseldorf, Deutschland

23 humane Nierenkarzinomzellinien vom klarzelligen (n=19) und vom chromophilen (n=4) Subtyp wurden auf die Expression von ICAM-1 (CD54), NCAM (CD56), Melanom-assoziertem Progressionsantigen MUC18 und das Carbohydratepitop HNK-1 (CD57) untersucht. Diese Adhäsionsmoleküle gehören alle in die Immunglobulin-Superfamilie und weisen in unterschiedlichem Ausmaß Homologien auf DNA- und Proteinebene auf. Der durchflußzytometrische Nachweis dieser Moleküle erfolgte mit einer indirekten Immunfluoreszenzmarkierung, ihre Molekulargewichtsbestimmung in der Westernblottechnik. ICAM-1, das auf Geweben epithelialen Ursprungs sowie in zahlreichen Tumoren nachgewiesen wurde, fand sich in 17 von 23 der Zellinien mit einem Molekulargewicht im Bereich 80-97 kDa. NCAM, das zuerst in embryonalen und neuroendokrinen Geweben beschrieben wurde, konnte in 16 von 23 Zellinien nachgewiesen werden. Allerdings fand sich nur die 140 kDa Isoform und nicht die oft polysialinisierte (embryonale) 180 kDa Isoform. MUC18, das sich ubqultär auf glatter Muskulatur kleiner Gefäße findet und ursprünglich in fortgeschrittenen, malignen Melanomen nachgewiesen wurde, fand sich in 9 von 23 untersuchten Zellinien, wies aber mit 135 kDa ein deutlich höheres Molekulargewicht auf als das in Melanomen beschriebene MUC18 mit einem Molekulargewicht von 113 kDa. Das HNK-1 Epitop, das auf NCAM und MUC18 zum Teil exprimiert wird, ließ sich auf keiner der untersuchten Zellinien nachweisen. Klarzellige Nierenkarzinomzellinien unterscheiden sich von den chromophilen Zellinien durch einen höheren Anteil und eine stärkere Expression für ICAM-1 und NCAM. Umgekehrt waren 2 von 4 chromophilen Zellinien verglichen mit 7 von 19 klarzelligen Zellinien MUC18-positiv. Obwohl Nierenzellkarzinome nicht neuroendokrinen Ursprungs sind, fanden wir eine de novo Expression für den neuroendocrinen Marker NCAM. MUC18, ein bisher nur in glatter Muskulatur und Melanomen beschriebenes Antigen, wurde von uns erstmals im Nierenkarzinom nachgewiesen.

Morphometrische und densitometrische Bildanalyse an fluoreszenzgefärbten Blasenkarzinomzellen

Wolfgang Schildbach, Elmar Endl, Pia Steinbach, Gabriele Fauser, Josef Rüschoff, Ferdinand Hofstädter
Institut für Pathologie, Universität Regensburg, D-93042 Regensburg

Das nucleolar organizer region (NOR-) Protein p120 wird während der G1-, S-, und G2-Phase des Zellzyklus in den Nukleolen exprimiert. Die Expression scheint mit „Hyperaktivität" der Nukleolen einherzugehen und wird als Indikator für Malignität oder Proliferationsverhalten von Tumoren diskutiert. Ziel unserer Untersuchung ist es deshalb, die räumliche Verteilung von p120 in verschiedenen Zellzyklusphasen mit dem konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM) und per Bildanalyse zu quantifizieren und Korrelationen der untersuchten Parameter zum Proliferationsverhalten verschiedener Zellinien *in vitro* festzustellen.
Es wurde eine *C++* - Klassen - Bibliothek mit Bildverarbeitungsoperationen entwickelt, die es möglich macht, quantitative Aussagen über dreidimensionale Fluoreszenzmuster zu gewinnen. Die Bibliothek umfaßt morphologische Operatoren, morphometrische und densitometrische Meßverfahren, connected-Components-Algorithmen, und Routinen zur schnellen Konvolution und Dekonvolution mittels schneller Fouriertransformation (FFT). Für die jeweilige Anwendung müssen kurze Anwenderprogramme geschrieben werden, die typischerweise die Bilddaten laden, eine Segmentierung und eine connected-components-Analyse aufrufen sowie für jedes erkannte Objekt verschiedene Größen wie Fläche, Formparameter oder integrierte Fluoreszenz messen. Ferner können hier vorhandene Subobjekte (beispielsweise Nukleolen im Zellkern) erkannt und für jedes dieser Subobjekte zusätzlich dessen Distanz zum Rand des umschließenden Objekts bestimmt werden.
Für die vorliegende Arbeit wurde p120 in den unterschiedlich differenzierten Blasenkarzinomzellinien MGH-Ut, RT4 und J82 mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) dargestellt und der Kern mit 7-Aminoactinomycin D (7AAD) gegengefärbt. Wir führten am konfokalen Laserrastermikroskop eine 2-Kanalmessung durch, wobei die FITC-Fluoreszenz mit einem 535nm-Bandpaßfilter und die 7AAD-Fluoreszenz durch einen 665nm-Langpaßfilter detektiert wurde. Im Rotkanal konnten einzelne Zellkerne direkt über Schwellwertverfahren segmentiert werden, überlappende p120-Dots im Grünkanal nach Konvolution mit einem Marr-Hildreth-Operator.

Mit dieser Bibliothek erstellte Programme leisten eine Analyse von CLSM-Bildern mit automatisierter Zellkernerkennung und Identifizierung subnukleärer Strukturen. Wir haben die Daten an am Flow Zytometer parallel durchgeführten Messungen und Sorts verglichen; die aus vorsortierten Zellen gewonnenen Daten sind kompatibel mit den zugrunde liegenden Sortparametern.

Endomitose-Chromosomen in den Nährzellkernen von Chrysomya rufifacies

Michael Schöttke

Zoologisches Institut der Universität Kiel, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel

Während der Oogenese von Chrysomya rufifacies (Diptera, Calliphoridae) vervielfachen die Nährzellen durch Endoreplikationen ihren DNA-Gehalt. Im Verlauf dieses Prozesses durchlaufen die Nährzellkerne im Oogenese-Stadium 2 zwei aufeinanderfolgende Endomitosezyklen, die sich in der Struktur der Chromosomen und ihren DNA-Gehalten deutlich unterscheiden. Im ersten Endomitosezyklus werden "gepaarte" Chromosomen sichtbar, in denen die Einzelchromatiden über ihre ganze Länge eng assoziiert sind. Diese "gepaarten" Chromosomen kontrahieren zunehmend und erreichen über die Endoprometaphase schließlich ihre maximale Kondensation in der Endometaphase. Ohne vorherigen Zerfall in die Einzelchromatiden, d. h. ohne eine Endoanaphase, dekondensieren die "gepaarten" Chromosomen und nehmen retikuläre Interphase-Kernstruktur an. Auf diesem Stadium findet dann die nächste Endo-S-Phase statt. Danach kondensieren die Chromosomen erneut, liegen dann jedoch als "gebündelte" Chromosomen mit einer gelockerten Assoziation der Einzelchromatiden vor. Am Ende des zweiten Endomitosezyklus zerfallen die "gebündelten" Chromosomen in einer Endoanaphase in ihre Einzelelemente und gehen erneut in die retikuläre Interphase-Struktur über. Im Normalfall erfolgen diese beiden Endomitosezyklen auf dem 32 C- und 64 C-Niveau. In relativ wenigen Kernen werden beide Endomitosezyklen einen Endozyklus früher (16 C, 32 C) oder später (64 C, 128 C) durchlaufen. Die "gepaarten" und die "gebündelten" Chromosomen sind innerhalb der Endomitosezyklen auf die Endomitose-Phase beschränkt, während die retikulären Kerne die Interphase mit der Endo-S-Phase und der Endo-G-Phase repräsentieren. In den späteren Oogenese-Stadien wurden in Chrysomya rufifacies keine weiteren Endomitose-Chromosomen beobachtet, die weiteren Endoreplikationen sind also nicht mehr mit sichtbaren Strukturveränderungen im Chromatin verbunden.

Neben den Gesamtkern-Messungen waren an insgesamt 14 Kernen mit "gepaarten" Chromosomen auch Einzelchromosomen-Messungen möglich. Der Vergleich der relativen DNA-Gehalte der sechs Chromosomen der Endomitosen mit den Werten von Neuroblasten- und Oogonienmitosen lieferte wie schon bei den Gesamtkern-Messungen keine Hinweise auf eine selektive Replikation einzelner Chromosomen oder Chromosomenabschnitte in diesem Stadium der Oogenese.

Telemikroskopie - Ein Werkzeug zur Fernauswertung von zytologischem Material

P. Schwarzmann, J. Schmid, C. Schnörr, B. Binder
Institut für Physikalische Elektronik, Universität Stuttgart

Telemikroskopie läßt eine örtliche Trennung zwischen Mikroskop und dem Benutzer bzw. einer Bildauswerteanlage zu. Die Technik ist geeignet um einmal aufwendige Mikroskopausrüstungen gemeinsam zu nutzen und zum anderen um am Ort des Mikroskops auswärtiges Expertenwissen verfügbar zu haben, wie es z.B. in der Telepathologie der Fall ist.

Abhängig vom zulässigen Aufwand, können für die Verbindung das ganze Spektrum der öffentlichen Fernmeldeeinrichtungen beginnend bei ISDN über n x ISDN, Ethernet, FDDI bis zu ATM-Breitbandnetzen mit Realtimefähigkeit verwendet werden. Der limitierende Einfluß der Kanalkapazität betrifft praktisch nur die Bildübertragung.

In der Telemikroskopie wird ein möglichst hoher Eindruck der Oneline-Fähigkeit bzw. Realtimefähigkeit angestrebt. Das Stichwort hierzu heißt Telepräsenz. Dies bezieht sich nicht nur auf die eigentliche Bildübertragung sondern vor allem auch auf eine möglichst vollkommene Fernbedienung aller Mikroskopfunktionen wie Objektivwechsel, Fokussierung, Beleuchtung, Filter, Kamerabedienung usw.

Am Institut für Physikalische Elektronik wurden sowohl Anlagen mit Breibandnetzen als auch für das normale ISDN-Telefonnetz realisiert. Erprobt werden die Anlagen einmal mit einer wissenschaftlichen Fragestellung (Nutzung der UV-Mikroskopie in der Zellbildanalyse) und zum anderen in einer klinischen Anwendung (Durchführung eines Feldtests zur Erprobung der Telepathologie).

Dieses Werkzeug wird es in Zukunft erlauben in den Diagnoseprozeß von Zellmaterial neben dem das Material entnehmenden Operateur und dem auswertenden Pathologen in ein solches Telepathologienetz auch quantitativ auswertende Bildverarbeitung mit einzubeziehen, ohne daß an allen Kliniken alle Abteilungen gleichzeitig vorhanden sein müssen.

Das Vorhaben wird von der Robert-Bosch-Stiftung und der Deutschen Telekom AG gefördert.

INDUKTION VON ZELLZYKLUS-STÖRUNGEN UND MIKROKERNEN IN HUMANEN KERATINOZYTEN NACH UV B- UND γ-BESTRAHLUNG

Weller E.M.[1], Hain J.[1], Jung T.[1], Kinder R.[2], Köfferlein M.[3], Burkart W.[1] and Nüsse M.[2]

[1] BfS-Inst. f. Strahlenhygiene, [2] GSF-AG Durchflußzytometrie, [3] GSF - Inst. f. Biochemische Pflanzenpathologie, 85762 Oberschleißheim, Germany

Zellkinetische Untersuchungen nach UV B- bzw. γ-Bestrahlung von asynchronen humanen SCL-2 Keratinozyten wurden mittels zweidimensionaler BrdU/Hoechst-Propidium Jodid Durchflußzytometrie durchgeführt. Exponentiell wachsende Keratinozyten, die mit 800 J/m^2 UV B (λ > 295 nm) bestrahlt wurden, zeigten einen temporären Block in der S- und in der G2/M-Phase des ersten Zellzyklus. Die zellkinetischen Störungen nahmen mit der UV B-Dosis zu. Wellenlängen λ > 335 nm (UV A) hatten keinen Effekt auf die Zellzyklus-Progression. Im Gegensatz dazu wurde nach Bestrahlung von SCL-2 Zellen mit 4 Gy ^{137}Cs γ-Strahlen nur ein G2-Block induziert. Sobald sich die ersten Zellen geteilt hatten, nahm der Anteil der Mikrokerne pro Zellkern (Nmn/Nn) in γ-bestrahlten Zellen zu, bis eine Sättigung erreicht war, nachdem sich alle Zellen, die vorher in der G2-Phase arretiert waren, geteilt hatten. Wurden die Zellen nach γ-Bestrahlung in Gegenwart von 1 mM Caffein kultiviert, akkumulierten die Zellen nicht in der G2-Phase; ein zusätzlicher Anstieg der Mikrokern-Häufigkeit wurde jedoch nicht beobachtet. Die UV B-bedingten Zellzyklus-Störungen wurden durch Caffein zwar vermindert, aber nicht aufgehoben. Im Vergleich zur γ-Bestrahlung wurde in UV B-bestrahlten Keratinozyten eine moderate Zunahme der Mikrokerne beobachtet. In Gegenwart von Caffein stieg die Mikrokern-Häufigkeit jedoch um ein Vielfaches an. Die unterschiedlichen Effekte auf Zellzyklus-Kinetik und Mikrokern-Induktion deuten auf unterschiedliche Mechanismen der DNS-Schädigung hin, die zumindest teilweise über verschiedene Signaltransduktionswege repariert werden.

Sortieren von Bakterien für PCR-Analyse

G. Wallner[1], S. Spring[2], B. Fuchs[2], W. Beisker[1], und R. Amann[2]

[1] GSF-Forschungszentrum, AG Durchflußzytometrie, D-85764 Oberschleißheim

[2] TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, D-80290 München

Bakterien wurden aus komplexen Mischpopulationen in Umweltproben mit Hilfe eines Durchflußzytometers mit Sortiereinrichtung (FACStar^{Plus}) abgetrennt, um ihre rDNA (für ribosomale RNA kodierende DNA) durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren. Die Amplifikate wurden durch Filterhybridisierung oder DNA-Sequenzierung weiter untersucht.

Sehr große magnetotaktische Bakterien (>10 µm) in magnetischen Anreicherungen aus Seesediment konnten anhand ihrer starken Vorwärts- und Seitwärts-Streulichtsignale durch 'Flow Sorting' von kleineren Zellen und von auf die PCR hemmend wirkenden Sedimentbestandteilen abgetrennt werden. Die sortierten Zellen wurden direkt in die PCR eingesetzt. Die Amplifikate wurden kloniert und sequenziert. Eine vergleichende Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene erlaubte die Verwandtschaftsbestimmung dieser magnetotaktischen Bakterien, obwohl sie nicht kultiviert werden konnten.

In noch komplexeren Gemischen aus einer Vielzahl verschiedener Bakterienarten bietet die fluoreszente in situ Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Sonden eine Möglichkeit, bestimmte Subpopulationen (einzelne Arten oder phylogenetische Gruppen) eindeutig durchflußzytometrisch zu identifizieren und für weitere Untersuchungen auszusortieren. Mit dieser Methode konnten wir zum Beispiel bestimmte Gruppen von Bakterien aus dem Belebtschlamm einer Kläranlage für anschließende PCR-Amplifikation und Filter-Hybridisierung sortieren.

Durch die Kombination von durchflußzytometrischer Sortierung und PCR können bestimmte Subpopulationen auch aus komplexen Mikroorganismen-Gemeinschaften molekularbiologisch untersucht werden, ohne sie vorher in Reinkultur erhalten zu müssen.

Oxidativer Streß und NO• induzieren Apoptose in myogenen Zellen der Ratte

Uwe K. Zettl[1,2], Eilhard Mix[1], Jürgen Zielasek[2], Martin Stangel[3], H. Meyer-Rienecker[1], Klaus V. Toyka[2], Hans-Peter Hartung[2], Ralf Gold[2]

[1]Abteilung Neurologie der Nervenklinik, Universität Rostock,
[2]Neurologische Klinik, Abteilung für Neuroimmunologie und Klinische Forschergruppe für Multiple Sklerose, Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
[3]Neurologische Klinik, Freie Universität Berlin

Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) und Stickstoffoxidradikale (NO•) spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebszerstörung, Gewebsregeneration und Abwehr von Infektionen. Sie sind potente Induktoren der Apoptose in lymphoiden Zellen. Wir haben untersucht, ob ROS und NO• auch in myogenen Zellen Apoptose induzieren, weil der apoptotische Zelluntergang bei entzündlichen und degenerativen Muskelerkrankungen vorkommt und die reaktiven Metabolite von infiltrierenden Makrophagen *in vivo* in großen Mengen freigesetzt werden können.

Myoblasten wurden aus Skelettmuskeln erwachsener Lewis-Ratten gewonnen, *in vitro* mehrere Wochen kultiviert und zu Myotuben fusioniert. Sowohl Myoblasten als auch Myotuben wurden den folgenden reaktiven Substanzen ausgesetzt:

(1) der ROS-Prototypsubstanz Wasserstoffperoxid (H_2O_2),
(2) dem ROS-freisetzenden Hypoxanthin/Xanthinoxidase-System (HX/XO) und
(3) dem NO•-Liberator S-Nitroso-N-Azetylpenicillamin (SNAP).

Die Apoptose wurde nach morphologischen Kriterien (DNA-Kondensation, apoptotische Körper) und DNA-Gelelektrophorese (charakteristisches Strickleitermuster) beurteilt. Die quantitative Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen erfolgte mit molekularbiologischen Methoden: (1) Tailing der DNA-Strangbrüche mit Fluoreszein-ddUTP und durchflußzytometrische Analyse (bei Myoblasten) und (2) *In-situ* Nick-Translation (bei Myotuben). Nach 16h Inkubation mit H_2O_2 (10^{-5} - $3x10^{-4}$M), HX (10^{-4} - $5x10^{-4}$M) und SNAP (10^{-3}- $5x10^{-3}$M) wurde ein dosisabhängiger Anstieg apoptotischer Myoblasten auf maximal 40% bei den höchsten H_2O_2- und SNAP-Konzentrationen beobachtet. Die Apoptose konnte mit Radikalfängern von H_2O_2 und NO•, Katalase und Hämoglobin, spezifisch gehemmt werden. Apoptose von Myotuben wurde bei $3x10^{-4}$M H_2O_2 gesehen beobachtet.

Die Befunde zeigen, daß ROS und NO• in der Lage sind, in myogenen Zellen Apoptose zu induzieren. Das könnte zum Zelluntergang bei entzündlichen und degenerativen Myopathien beitragen.

Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie

Deutsche Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Informationen an die Mitglieder (1995)

Dies ist im wesentlichen eine Zusammenfassung der Rundschreiben (Frühling und Sommer) der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie.

Informationsknoten im Internet

Die beiden **Internet** Gopher **Informationsknoten: cytogerm** und **cytoesacp** für die Deutsche und Europäische Zytometriegesellschaft werden durch einen zusätzlichen **CYTORELAY Server-Knoten** im www-Net ergänzt. Dieser Knoten enthält die zur Zeit vollständigste Liste der weltweit verfügbaren Gopher und www Knoten und verkürzt den Weg zu den amerikanischen Knoten.
Der URL ist:
http://www.biochem.mpg.de/research-groups/valet/cytorel.html

DGZ-Jahrestagung und Vorstandswahlen

Das Wahlergebnis der schriftlichen Vorstands- und Beiratswahl für 1995/96 liegt inzwischen vor. Von 179 wahlberechtigten Mitgliedern haben 103 Mitglieder ihre Stimme abgegeben, davon waren 94 gültig. Das entspricht einer Wahlbeteiligung von 57,5%.

Der **neue Vorstand:**

Vorsitzender:	Prof. Dr. Andreas Radbruch, Köln
Stellv. Vorsitzender:	PD Dr. Jörg Hemmer, Ulm
Schriftführer:	Prof. Dr. Georg Feichter, Basel
Schatzmeister:	Dipl. Ing. Peter Schwarzmann, Stuttgart

Dem **Beirat** gehören jetzt an:

Dr. Friedrich Otto, Münster	(Amtszeit bis Ende 1995)
Prof. Dr. Stefan Meuer, Heidelberg	(bis Ende 1995)
Dipl. Ing. Peter Pürstner, Graz	(bis Ende 1996)
Prof. Dr. Michael Trendelenburg, Heidelberg	(bis Ende 1996)
Dr. Thomas Bley, Leipzig	(bis Ende 1997)
Dr. Michael Nüsse, München	(bis Ende 1997)

Kassenprüfer sind Herr Dr. Thomas Nebe, Mannheim und Herr Dr. Wolfgang Ulrich, Stuttgart.

Die **Abstrakts** der DGZ-Jahrestagung 1994 sind im J.Anal.Cell.Pathology abgedruckt, also zitierfähig, und liegen als Belegexemplar dem Brief bei. Die Druckkosten werden aus den Mitteln der Gesellschaft bestritten.

8. Heidelberger Zytometrie Symposium der DGZ (1995)

Die Tagung findet vom **19. - 21. Oktober 1995 in Heidelberg** wie gewohnt im DKFZ statt, unter der bewährten Leitung von Herrn Stöhr und Herrn Hutter. Die Tagung beginnt am Donnerstag, den **19.10.95 um 14.00 Uhr.** Die Teilnehmergebühr für die Jahrestagung beträgt 50,- DM. Präsentiert werden **Vorträge und Poster mit Posterdiskussion.** Außerdem wird erstmals ein **Anwenderforum** angeboten, es soll der Diskussion praktischer Probleme, vor allem der Operatoren dienen. Die Vorstellung und Diskussion der **Ringversuche** soll in den entsprechenden Fachsitzungen erfolgen, und nicht mehr getrennt am Samstag.

Mitgliederversammlung

Die Mitgliederversammlung findet dieses Jahr bereits um 14.00 Uhr am Freitag, den 20. Oktober 1995 statt. Als besonderer Tagesordnungspunkt ist die erstmalige Verleihung der Ehrenmitgliedschaft an Prof. Dr. Klaus Goerttler zu nennen.

Mitgliederbeitrag

Leider haben dieses Jahr noch nicht alle Mitglieder ihren **Jahresbeitrag 1995 von 20,- DM** bezahlt. Die Bankverbindung der Gesellschaft lautet:

Postgiroamt Karlsruhe
Konto Nr.: 849/756
BLZ: 660 100 75

Bitte deutlich (auf dem Durchschlag) den Namen und Adresse angeben, damit Herr Schwarzmann die Zahlung gut zuordnen kann.

Zytometriekurs unserer Gesellschaft

Erstmals wurde von Michael Nüsse und seinen Mitarbeitern an der GSF München (Oberschleißheim) vom 26.-29.6.95 ein Zytometriekurs organisiert, der die **Grundlagen der Zytometrie** und ihre weitgefächerte **Anwendung** in Biologie und biomedizinischer Grundlagenforschung vermittelte. 22 Teilnehmer haben dieses Angebot genutzt, welches von den Firmen Becton- Dickinson, Coulter, Miltenyi-Biotec und Partec vorbildhaft durch Geräte und Reagenzien unterstützt wurde.

Tagungen im Rahmen der DGZ

Vom **6.-8. September 95** fand der 6. Workshop Flowzytometrie in dem Universitätsclub der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn statt. Themenschwerpunkte waren **Allergologie - Infektionsimmunologie** und **Stammzelltransplantation - Grundlagenforschung.**

Vor der Tagung am **19. Oktober 1995** findet im DKFZ und vom DKFZ initiiert ein **Festsymposium für Herrn Prof. K. Goerttler** statt. Beginn ist **10.00 Uhr.**

Desweiteren findet am **19. Oktober 1995** von **10^{00} Uhr bis 13^{00} Uhr im DKFZ in Heidelberg** ein Treffen der AG Zytometrie und bildgebende Verfahren statt. Themenschwerpunkt der Sitzung ist **Transplantationsmonitoring.**

Sonstige Zytometrie Tagungen und Kurse

Eine äußerst rege Kurstätigkeit im Bereich der klinisch orientierten Zytometrie spiegelt das zunehmende Interesse an unserem Gebiet wieder. Auf folgende Kurse und Tagungen wurde hingewiesen:

- **Regensburger** Tagung (Klinische Diagnostik; **30./31. März**, Prof. Schmitz, Dr. Rothe, Tel. 0941-944-6201)

- Tagung in **Münster** (Schwerpunkt Transfusionsmedizin; **14./15. Juni**, Dr. Gutensohn, Tel. 040-4717-3430)

- Die Arbeitsgruppe **Durchflußzytometrie der DGTI** Sektion "Monoklonale Antikörper/ Gentechnik" traf sich am **Mittwoch, den 23. August 95 in Frankfurt.** Schwerpunkte waren Aspekte der Qualitätssicherung im durchflußzytometrischen Labor.

- Am **26.-29.5.95** fand eine ISAC gesponserte Veranstaltung statt. International Working Symposium on **Tumor Heterogeneity:** Biological Basis and Clinical Relevance in Kananaskis, Alberta, Canada.

- In Porto, Portugal, fand ein **FEBS Advaced Course** on: Analysis of Cell Biochemistry by Flow Cytometry vom **17.-21.7.95** statt.

- Vom **18.-22. September 95** fand an der **University of Cambridge** ein **Flow Cytometry Course** statt.

- Vom **27.-29. September 95** lief in **Reims** (Champagne) der **2e Congres Annuel, Association Francaise de Cytometrie.**

- Das **Annual Meeting Italian Cytometric Society (GIC)** im Centro Congressi Cocumella in **Sant Agnello di Sorrento** fand vom **18.-20. Oktober 95** statt.

- 4th International Conference on the **Computerized Cytology** and Histology Laboratory, Chicago Illinois, USA, **17.-20. March 1996**, Drake Hotel. Informationen: International Academy of Cytology, FAX: 001/312/9470290 oder bei Herrn Prof. U. Schenck, München, FAX: 089/ 4140-4876.

- Der **XVIII Congress of the International Society for Analytical Cytology** findet statt vom **13.-18. April 96** im Palacongressi (Congress Center) in **Rimini**, Italy. Die Kontaktadresse lautet: Justine Parker, Executive Direktor, Internatinal Society for Analytical Cytology, P.O. Box 7849, Breckenrigde, CO 80424 USA, Tel.: 970/453-2058 oder -1894, Fax: 970/453-2636

weitere DGZ-Aktivitäten

Die Gesellschaft hat bisher vier **Kongreßstipendien** (zu je 1000,- DM) vergeben können. Die Stipendien betreffen natürlich nur Zytometrie-orientierte Veranstaltungen und können nur von Mitgliedern beantragt werden. Anträge können beim Vorstand eingereicht werden. (Die Regelung bezüglich der Antragsfristen soll neu geregelt werden; näheres auf der Mitgliederversammlung).

Auf der letzten Mitgliederversammlung wurde beschlossen den Verein in Deutsche Gesellschaft für Zytometrie umzubenennen. Bis zur nächsten Jahrestagung in Heidelberg sind alle Mitglieder aufgerufen Vorschläge für ein **neues Logo** beim Vorsitzenden einzureichen. Für die besten Entwürfe wird es **Preise** geben, mit Wahl durch die Teilnehmer der Tagung.

e-mail Adressen

Es wäre schön, wenn wir möglichst viele Mitglieder über e-mail erreichen könnten. Deshalb hier die Bitte, sollten Sie Ihren Anschluß noch nicht uns mitgeteilt haben, schicken Sie mir eine kurze email.

Andreas Radbruch:
Telefon **+49-221-470-3419**
Telefax **+49-221-470-4970**
email **andreas@genetik.uni-koeln.de**

1. Münchener Zytometriekurs
26. - 29. Juni 1995

Vom 26. - 29. Juni 1995 fand der 1. Münchener Zytometriekurs „Grundlagen und Anwendungen von Durchflußzytometrie und Bildanalyse" im GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg bei München, statt. Er wurde von der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie und der GSF von Michael Nüsse, AG Durchflußzytometrie (durchflußzytometrische Anwendungen) und Peter Hutzler, AG Biomedizinische Bildanalyse (bildzytometrische Anwendungen) organisiert. Ziel dieses Kurses war es, moderne durchfluß- und bildzytometrische Verfahren praktisch zu erlernen. Es wurden eine Reihe von grundlagenorientierten Untersuchungen an lebenden und fixierten Zellen (Säugetierzellen, Algen, Bakterien, Hefen) zu Proliferationsverhalten, Funktionszustand (Ca^{++}, Respiratory Burst etc.), Zellkern- bzw. Chromosomenstruktur, Mikrokerne, Apoptose, Gen-Expression, Immunmarkierung, FISH, etc. angeboten. Schwerpunkt dieses Kurses waren nicht-klinische Anwendungen von Durchfluß- und Bildzytometrie. Eine Vielzahl von Präparations-, Analyse- und Zellsortierungsexperimenten wurde durchgeführt. 24 Referenten, zum Teil auch aus dem Ausland (Italien, Schweden, USA) demonstrierten 27 verschiedene Experimente, die zum Teil auch außerhalb des Geländes der GSF in Großhadern, GSF-Institut für Hämatologie, und Martinsried, MPI für Biochemie stattfanden. An den Vormittagen wurden Vorträge angeboten, zum Teil Übersichtsreferate zu verschiedenen Themenbereichen, zum Teil aber auch Einführungen in die Experimente, die an den Nachmittagen durchgeführt werden konnten.

Die folgenden Geräte standen während des Kurses für Experimente und Demonstrationen zur Verfügung: FACStar+ mit zwei Lasern, FACScalibur (Becton Dickinson), Coulter XL (Coulter Electronics), zwei PAS III (PARTEC), MACS (Miltenyi), Confokales Laser Scanning Mikroskop (Zeiss), Laserpinzette, SAMBA, CAS (Bildzytometrie). Dank gebührt den Firmen Becton Dickinson, Coulter Electronics und PARTEC, die Personal und Geräte zur Verfügung stellten.

Die 21 Teilnehmer, die sich zu dem Kurs angemeldet hatten, konnten je nach Interesse zwischen den einzelnen Experimenten wählen, die jeweils mindestens zweimal angeboten wurden. Da mehrere Durchflußzytometer mit qualifizierten Operatoren zur Verfügung standen, konnten die präparierten Proben an verschiedenen Geräten vergleichend gemessen werden. Die große Anzahl von Referenten verbunden mit dem hohen Interesse der Teilnehmer führte zu einer intensiven Diskussion der vorgeführten Experimente und Techniken.

Es ist geplant, einen ähnlichen Zytometriekurs im Frühjahr des nächsten Jahres (Ende Mai/Anfang Juni 1996) wieder bei der GSF anzubieten. Interessenten wenden sich bitte an:
Dr. Michael Nüsse, GSF-AG Durchflußzytometrie, 85758 Oberschleißheim.
Tel: 089-31873433, Fax: 089-31873349, E-mail: NUESSE@GSF.DE.

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ZYTOMETRIE e.V.

AUFNAHMEANTRAG

(Bitte ausgefüllt an die Geschäftsstelle senden)

Die Gesellschaft für Zytometrie wurde als interdisziplinäre Vereinigung von Wissenschaftlern der Durchfluß- und Bildzytometrie sowie der Zellsortierung 1989 mit Sitz in Heidelberg gegründet.
Das Ziel der Gesellschaft ist die Förderung der Weiterentwicklung und Anwendung der Zytometrie und die Veranstaltung wissenschaftlicher Tagungen und Kurse. Der Jahresbeitrag beträgt 20 DM für persönliche Mitglieder und 200 DM für fördernde Mitglieder (z.B. Firmen).

Vorsitzender: Prof.Dr.A.Radbruch, Köln
Stellv.Vors.: PD Dr.J.Hemmer, Ulm
Schriftführer: PD Dr.G.Feichter, Basel
Schatzmeister: Dipl.Ing.P.Schwarzmann, Stuttgart
Wiss.Beirat: PD Dr.Th.Bley, Leipzig
Dr.Nüsse, München
Prof.Dr.M. Trendelenburg, Heidelberg
Dipl.Ing.Pürstner, Graz
Prof.Dr.S.Meuer, Heidelberg
Dr.F.Otto, Münster (Stand 1995)

Geschäftsstelle: Prof.Dr.A.Radbruch, Inst.f.Genetik d.Universität, Weyertal 121
50931 Köln, **Tel:** 0221/470-3419, **Fax:** 0221/470-4970
Email: andreas@genetik.uni-koeln.de

Bankverbindung: **Kto:** 849/756, Postgiroamt Karlsruhe, **BLZ:** 660 100 75

Name: _____
Name Vorname Titel Fachr.Studienabschluß

Institution: _____

Straße: _____

Ort: _____

Telefon (bitte mit Vorwahl): _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

Befürwortung: Unterschrift von 2 Mitgliedern
1. _____
Unterschrift Name in Druckbuchstaben
2. _____
Unterschrift Name in Druckbuchstaben

Datum/Unterschrift: _____