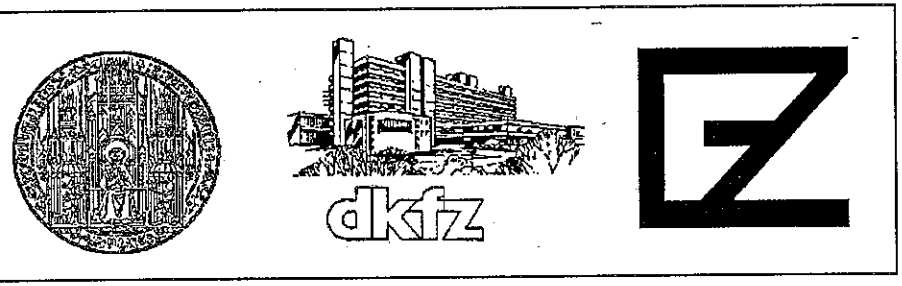
Programm und Kurzfassung der Beiträge



9. Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der
Deutschen Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 17. bis 19. Oktober 1996

Tagungsort

Kommunikationszentrum
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 280
D - 69 120 Heidelberg

Tel.: 06221 / 42 32 08
Fax: 06221 / 42 26 52
E-mail: m.stoehr@dkfz-heidelberg.de

Organisatoren

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

ISSN 0949 - 5347

Programm und Kurzfassung der Beiträge

9. Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der
Deutschen Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 17. bis 19. Oktober 1996

Tagungsort

Kommunikationszentrum
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 280
D - 69 120 Heidelberg

Tel.: 06221 / 42 32 08
Fax: 06221 / 42 26 52
E-mail: m.stoehr@dkfz-heidelberg.de

Organisatoren

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

ISSN 0949 - 5347

Inhaltsverzeichnis

Programm . . . . . *3 - 13*

Kurzfassungen:

Vorträge:

Tumorbiologie . . . . . *14 - 31*
und Tumordiagnostik

Qualitätskontrolle . . . . . *32 - 37*
und „Gute Laborpraxis“

Immunophänotypisierung . . . . . *38 - 50*
und Populationsanalytik

Bildanalyse . . . . . *51 - 56*
und Zelltopologie

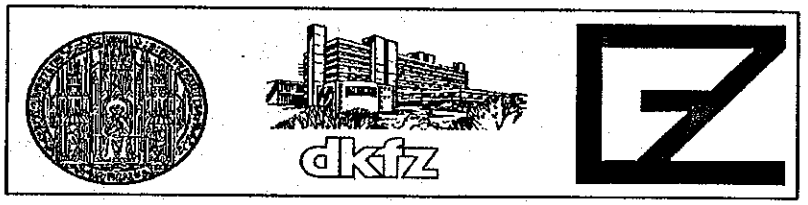
Mikroorganismen . . . . . *57 - 66*
und Bioprozeßtechnik

Neue Techniken, ... *67 - 79*
Verfahren und Konzepte

Poster . . . . . *80 - 97*

Mitteilungen der . . . . . *98 - 106*
Deutschen Gesellschaft für Zytometrie e. V.

Programm



9. Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der
Deutschen Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 17. - 19. Oktober 1996

Tagungsort
Kommunikationszentrum
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 280
D - 69 120 Heidelberg
Tel.: 06221 / 42 32 08 Fax: 06221 / 42 26 52
E-mail: m.stoehr@dkfz-heidelberg.de

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

Programm-Kommittee
Th. Bley, R. Knüchel, M. Nüsse,
F. Otto, P. Pürstner, M. Trendelenburg

Beginn: Donnerstag, den 17. Okrober 1996, 14.00 Uhr
Ende: Samstag, den 19. Oktober 1996, 15.00 Uhr
Beitrag: DM 50,--

Donnerstag, 17. Oktober 1996

14.00 BEGRÜßUNG UND ERÖFFNUNG

14.15 - 16.30 **SITZUNG IA: TUMORBIOLOGIE UND TUMORDIAGNOSTIK**
VORSITZ: *GOERTTLER - KÜHN*

14.15 - 14.30 1. RUHNKE M, DITZENBACH A, KÜHN W:
Unterscheidung von Ovarialtumoren mit DNA-Zytometrie

14.30 - 14.45 2. REICH O, PÜRSTNER P:
DNA-Diploidie, eine flußzytometrische Eigenschaft des Ovarialkarzinoms?

14.45 - 15.00 3. SCHÖLL W, REICH O, PIEBER D, GÜCER F:
Angiogenese in Ovarialkarzinomen: Erste Erfahrungen mit bildana lytischer Qunatifizierung der endothelialen Immunreakticität und ihrer möglichen prognostischen Bedeutung

15.00 - 15.15 4. COUMBOS A, RUHNKE M, YILDIRIM S, KÜHN W:
Grad der Aneupoidie (5c- und 9c-exceeding rate) als prognostischer Marker für das Mamma-Carcinom

15.15 - 15.30 5. EHEMANN V, EIFERT B, MÜNKEL K, LANGE A, OTTO HF:
Wertigkeit der Flußzytometrie bei malignen Gliomen

15.30 - 15.45 6. SENDLER A, GILBERTZ KP, RHEIN A, MATZEN K, FINK U, BECKER I, VAN BEUNINGEN D:
Proliferationskinetik von Magenkarzinomen *„in vivo"*

15.45 - 16.00 KAFFEEPAUSE

16.00 - 16.15 7. NOWAK R, OELSCHLÄGER U, RANGE U, EHNINGER G:
Die Inzidenz an Aneuploidien beim multipen Myelom korreliert nicht# mit dem Krankheitsstadium

16.15 - 16.30 8. KNÜCHEL R, FLEISCHMANN S, TIRNGIBL H, HOFSTÄDTER F:
Standardisierung von Zweiparameter-DNA-Zytometrie für das Kolonkarzinom

16.30 - 16.45 9. BROCKHOFF G, HOFSTÄDTER F, KNÜCHEL R:
Flußzytometrische Mehrparameter-Quantifizierung des EGFR an Harnblasenkarzinomen

16.45 - 17.00 10. PLAS E, JILCH R, THURY S, FISCHER M, PFLÜGER H:
Flußzytometrische Bestimmung von Cytokeratin 8-13 und p53 positiven Zellen beim Renalzellcarcinom

17.00 - 17.15 11. SCHNEKENBÜHL S, POLACKOVA J, NAGEL E, HEMMER J:
Numerische Aberration des Chromosomes 17 bei diploiden und aneuploiden Tumoren

17.15 - 17.30 12. MACHL AW, PLANITZER S, KUBBIES M:
Ein neuer retroviraler Vektor mit einem Zelloberflächenmarker für Fanconi Anaemie Gruppe C Gentherapie

17.30 - 18.45 **SITZUNG II: QUALITÄTSKONTROLLE UND NORMIERUNG**
VORSITZ: *SCHMITZ UND TEWS*

17.30 - 17.45 1. GRATAMA JW, KLUIN-NELEMANS JC:
Qualitätsbeurteilung der Immunphänotypisierung von Leukämien und Lymphomen

17.45 - 18.00 2. SERKE S:
Externe Qualitätssicherung "Retikulozyten" (INSTAND e.V.) - Überblick nach 3 Jahren Erfahrung

18.00 - 18.15 3. OTTO FJ, WESTHOFF U:
Erfahrungen aus den Ringversuchen zur Qualitätssicherung der flußzytometrischen DNA-Messung

18.15 - 18.30 4. SCHÄRFE G, LE GUILETT N, SCHÄRFE K:
Einsatz von elektronischen Cell Counter Analyse Systemen zur Qualitätskontrolle (5W-Regel: Wer hat was wann womit und warum gemacht ?)

18.30 - 18.45 5. Rothe G.:
Europäisches Konsensus Protokoll zur Flußzytometrischen Charakterisierung der Thrombozytenfunktion

18.45 - 19.00 KAFFEEPAUSE UND POSTERMONTAGE

19.00 - 20.00 **SITZUNG III: POSTERAUSTELLUNG**
VORSITZ: *HUTTER*

20.00 BIS ENDE EMPFANG DURCH DEN STIFTUNGSVORSTAND DES D K F Z

Freitag, 18. Oktober 1996

8.30 - 10.15 **SITZUNG IVA: IMMUNOPHÄNOTYPISIERUNG + POPULATIONSANALYTIK**
VORSITZ: *MEUER UND RADBRUCH*

8.30 - 8.45 1. JANßEN MN, KNECHTEN H, KNICKMANN M, RUBACK C, HIRZMANN I, BRAUN P:
CD69, ein neuer Marker zur Bestimmung der Akitivierbarkeit von Lymphozyten bei HIV-Ak positiven Patienten und bei Patienten mit Chronischem Müdigkeits- und Immundefekt-Syndrom (CFIDS) ?

8.45 - 9.00 2. KRÖPELIN M, SÜSAL C, DANIEL V, OPELZ G:
Blockierung der Bindung des HIV-1 Hüllglykoproteins (GP120) an CD4+ T Lymphozyten durch anti-HIV monoklonale Antikörper

9.00 - 9.15 3. ZWICK A, ORSÓ E, STÖHR J, AJZNER E, BARLAGE S, DROBNIK W, ROTHE G, ASLANIDIS C, SCHMITZ G:
Molekulare Charakterisierung von Plättchenfunktionsstörungen am Beispiel eines Patienten mit verminderter Expression von CD36 auf Thrombozyten und erhöhter Glykoprotein Ib-IX Expression

9.15 - 9.30 4. BÖHM I, BAUER R:
FACS-Analyse selektiv haut-infiltrierender Blutzellen nach einem antigenen Stimulus *in vivo*

9.30 - 9.45 5. BARLAGE S, ROTHE G, SCHMITZ G:
Flußzytometrische Analyse des Lyphomzellimmunphänotyps mittels automatisierter Clusteranalyse

9.45 - 10.00 6. MATIC GB, ROTHE G, SCHMITZ G:
Ein verbesserter flußzytometrischer Test zur Bestimmung des Anteils „retikulierter" Thrombozyten in Vollblut

10.00 - 10.15 KAFFEEPAUSE

10.15 - 12.00 **SITZUNG IVB: IMMUNOPHÄNOTYPISIERUNG + POPULATIONSKANALYTIK**
VORSITZ: *BAUER UND ROTHE*

10.15 - 10.30 7. THIEME B, KOOP F, HARBECK N, KOLBEN M, UGELE B, SCHNEIDER KTM, GRAEFF H:
Flußzytometrische Charakterisierung humaner Trophoblastzellen nach Isolation aus frischem Plazentagewebe

10. 30 - 10.45 8. NEUMÜLLER J, MENZEL J, DUNKY A:
In vitro Untersuchungen zum Lymphozyten-Homing bei entzündlichen rheumatischen Erkrankungen mittels Flußzytometrie und Bildanalyse

10.45 - 11.00 9. TÁRNOK A, HAMBUSCH J, KINZEL P, BORTE P, SACK U, SCHNEIDER P:
Immunologische Veränderungen im Verlauf von Herz- und Gefäß-operationen bei Kindern: Der Einfluß der Herz-Lungen-Maschine (HLM)

11.00 - 11.15 10. TÁRNOK A, NÖHRENBERG U, SCHUHMACHER S, VOLLMER HJ, RATHIEN F:
Flußzytometrische Messung von Proteinwechselwirkung mit fluoreszierenden Mikropartikeln

11.15 - 11.30 11. SCHEFFOLD A, ASSENMACHER M, SCHMITZ J, MILTENYI S, RADBRUCH A:
Nachweis von IFN-γ und IL-10 auf der Oberfläche sezernierender Zellen mittels magnetofluoreszenter Liposomen: spezifische Oberflächenmarker für Zytokinproduktion

11.45 - 12.00 12. MANZ RA, THIEL A, MILTENYI S, RADBRUCH A:
Flußzytometrische Analyse Antikörper-sezernierender Zellen

12.00 - 13.30 **SITZUNG IB: TUMORBIOLOGIE UND TUMORDIAGNOSTIK**
VORSITZ: *GÖHDE UND KNÜCHEL*

12.00 - 12.15 1. CORVER WE, FLEUREN JG, CORNELISSE CJ:
Verbesserte Ein-Laser-Messung von 2 zellulären Antigenen

12.15 - 12.30 2. PLANITZER S, MACHL AW, KUBBIES M:
Identifizierung DNA-Reparatur relevanter Gene bei Fanconi Anaemie am nicht-syngenen Zellmodell via Diffenrential Display

12.30 - 12.45 3. LÖHRKE B, PÖHLAND R, VIERGUTZ T, BECKER F:
Flußzytometrische Charakterisierung der Apoptose bei Lutealzellen aus frühen ovariellen Zyklusstadien

12.45 - 13.00 4. MELSHEIMER P, GRUNWALD K, FEKDMANN K, KLINGA K, RABE T, RUNNEBAUM B, RUMMEL HH:
Flußzytometrischer Nachweis von Aneuploidien humaner Granulosazellen in Follikelflüssigkeiten von Patientinnen nach *In Vitro* Fertilisation (IVF)

13.00 - 13.15 5. POGREBNIAK A, STOETZER OJ, WILMANNS W, NÜSSLER V:
Veränderungen in motichondrialem Potential der Zelle unter Einfluß von Apoptose induzierenden Substanzen

13.15 - 13.30 6. KUNZ-SCHUGHARDT LA, HEBBERSETT RC, FREYER JP:
Analyse der Mitochondrien-Funktion von aus 2D- und 3D-Kulturen isolierten Fibroblasten mittels Flußzytometrie

13.30 - 14.00 MITTAGESSEN

14.00 - 16.00 MITGLIEDERVERSAMMLUNG DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR ZYTOMETRIE

16.00 - 17.45 SITZUNG V: BILDANALYSE UND ZELLTOPOLOGIE
VORSITZ: *KUKULIES UND SCHWARZMANN*

16.00 - 16.30 1. Derenzini M:
Morphometric analysis of AgNOR proteins for cell doubling time evaluation in tumour pathology

16.30 - 17.00 2. Hutzler PJS:
Digitale Fluoreszenzmikroskopie: Konventionell und Konfokal

17.00 - 17.15 3. Rinke B, Edelmann P, Bradl J, Esa A, Schneider B, Hausmann M, Cremer C:
Axialtomographische Mikroskopie zur hochauflösenden Analyse der Interphase-Genomorganisation

17.15 - 17.30 4. von Steldern D, Miljc⊆ec M:
Ein neues Prinzip der konfokalen Mikroskopie: Strahlengangstabile Laser-Scanning-Mikroskopie

17.30 - 17.45 5. Nagorni M, Bradl J, Schneider B, Hausmann M, Cremer C:
Mikroskopiesteuerung, Bildaufnahme und -visualisierung per Netzwerk zur "online" Telemikroskopie über weite Distanzen

17.45 - 18.30 KAFFEEPAUSE MIT IMBISS

18.30 bis Ende SITZUNG VI: ANWENDERFORUM
VORSITZ: *BEISKER UND KREYSCH*

Samstag, 19. Oktober 1996

8.30 - 11.30 SITZUNG VII: MIKROORGANISMEN UND BIOPROZEßTECHNIK
VORSITZ: *BLEY UND WALLNER*

8.30 - 9.00 1. Sonnleitner B:
Nicht-invasive Bioprozeßanalytik: Populationsdynamik

9.00 - 9.15 2. Herrmann C:
Flußzytometrie von Phenol abbauenden Bakterien nach *in situ* Hybridisierung und DAPI-Färbung

9.15 - 9.30 3. Lösche A:
Streulichtmessungen an Bakterien: Modellrechnungen und Experimente

9.30 - 9.45 4. Nebe-von Caron G, Stephens P, Badley RA:
Beurteilung der Vitalitätsstadien von Bakterien mit Hilfe der Flußzytometrie und der Einzelzellsortierung

9.45 - 10.00 5. Ueckert J, Ter Steeg PF:
Bestimmung der Vitalitätsverteilung von *Lactobacillus plantarum* Zellen nach Inaktivierungsmaßnahmen mittels Flußzytometrie

10.00 - 10.15 KAFFEEPAUSE MIT IMBISS

10.15 - 10.30 6. Nebe-von Caron G, Anderson WA:
Keimung und Wachstum von Sporen charakterisiert mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und der Flußzytometrie

10.30 - 10.45 7. Schäfer H, Bruckmeyer B, Steinberg C, Beisker W:
Drei-Laser-FCM zur gleichzeitigen Messung von Photosynthesepigmenten und Proteingehalt von Phytoplanktonpopulationen in Seen und Flüssen

10.45 - 11.00 8. Pfündel E, Meister A:
Flußzytometrische Reinigung von Mesophyll- und Leitbündelscheiden-Chloroplasten aus verschiedenen Pflanzen mit C_4-Photosynthese

11.00 - 11.15 9. Moustafa M,. Wartenberg R, Sachsse W:
Mikroorganismen in Fruchtsaft-Konzentraten

11.15 - 11.30 KAFFEEPAUSE

11.30 - 13.15 SITZUNG VIIIA: NEUE TECHNIKEN, VERFAHREN UND KONZEPTE
VORSITZ: *HAAG UND POOT*

11.30 - 12.00 1. Crissmann HA, Sailer BL, Steinkamp JA:
Phase-sensitive flow cytometry: Lifetime-based technology for analyzing cells/chromosomes labeled with fluorescent probes

12.00 - 12.15 2. Beisker W, Klocke A:
Flußzytometrische Fluoreszenzlebensdauer Messungen: Prinzipien und erste Anwendungen

12.15 - 12.30 3. Rothe G, Schäfer B, Schmitz G:
Excimer-Fluoreszenz im Vergleich zu Depolarisation in der flußzytometrischen Charakterisierung von lateraler Membranmobilität

12.30 - 12.45 4. Wölfl G, Steinbach P, Bette J, Endl E, Hofstädter F:
Flußzytometrische Untersuchungen der Stoßwelleninduzierten Änderungen des Plasma-Membran Potentials an PC12 Zellen

12.45 - 13.00 5. Eckhardt R:
Nachweis intrazellulärer Enzymaktivität mittels Multi-Parameter-FCM

13.00 - 13.15 6. Severin E, Seidler E:
Fluß-Zytometrie von alkalischen und sauren Phosphatase-Aktivitäten -Vergleich der Diazo-Kupplungsreaktion und der Methylumbelliferon-Methode-

13.15 - 13.30 KAFFEEPAUSE

13.30 - 15.00 SITZUNG VIIIB: NEUE TECHNIKEN, VERFAHREN UND KONZEPTE
VORSITZ: *BEISKER UND EIPEL*

13.30 - 13.45 7. Brischwein M, Baumann W, Ehret R, Schwinde A, Kraus M, Wolf B:
Analyse zellulärer Signalverarbeitungsmechanismen mit elektrischen Mikrosensoren in Kombination mit Lichtmikroskopie: "Physiocontrol-Mikrosystem"

13. 45 - 14.00 8. Poot M, Gibson LL, Singer VL, Haugland RP:
Analyse der unterschiedlichen Wege zum apoptotischen Zelltod in lebenden Zellen mittels MitoTracker™ und SYTO™ Flußzytometrie

14.00 - 14.15 9. Poot M, Kruyt F, Joenje H, Singer VL, Haugland RP:
Analyse der Rolle des FAC-Gen bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose mittels einer neuen flußzytometrischen Methode

14.15 - 14.30 10. Malsch R, Piazolo L, Lianchum W, Timmermann A, Harenberg J:
Markierung und Analyse von rekombinatem Hirudin mit der Flow Cytometry

14.30 - 14.45 11. Gratama JW, v.d.Linden R, de Beukelaer C, van de Winkel JGJ, Bolhuis RLH:
Zellaggregatbildung bei der Immunfluoreszenz-Routine: Relevanz des Fcγ-Rezeptorpolymorphismus für die klinische Flußzytometrie

14.45 - 15.00 12. Valet G, Van Driel BEM, Lyon H, Hansen U, Song J, Van Noorden RLH:
Abschätzung der Überlebensprognose colorektaler Krebspatienten mittels Muliparameter -CLASSIF1-Analyse des G6PDH Sauerstoff Intensitätstests sowie von SOD und Lipidperoxidasemessungen an Gefrierschnitten

ENDE

POSTERBEITRÄGE

1. DURM M, WOLF D, ALDINGER K, HAAR FM, CREMER C:
Schnelle FISH für repetitive und "painting" Proben

2. ELLWART JW, KARLS I:
Automatische Überwachung des Abrißpunkts am Cell Sorter mit Hilfe eines PC's

3. ESA A, TRAKHTENBROT L, HAUSMANN M, BEN-BASSAT J, CREMER C:
Fast-FISH und automatische digitale Bildanalyse numerischer Chromosomenaberrationen in Knochenmark- und Blutzellkernen hämatoonkologischer Patienten

4. HAßFELD S, FROMBACH R, WIEDENMANN R, ZÖLLER J:
Zellkulturvergleich der össären Rekonstruktionsmaterialien Polymaleinat Ionomer Zement und Polymethylmethacrylat

5. KLEINE TO, WERNER HJ, ALBRECHT J:
Zum Transfer von Lymphozyten durch die Blut/Liquor-Schranke des Menschen

6. KLEINE TO, SCHREIBER W, ALBRECHT:
Veränderungen von Lymphozytenpopulationen und ihrer Cell Homing Rezeptor-Kapazität im Blut nach totalem Schlafentzug beim Menschen

7. LENTFER H, WOLF D, CRONE M, ALDINGER K , HAUSMANN M, CREMER C:
Detektion von Chromosomenaberrationen nach H_2O_2/L-Histidin Behandlung mittels Slit-Scan Flußfluorometrie

8. NEBE T, HARTMANN K, PFIRRMANN W:
A New Flow Cytometric Assay for Basophil Degranulation

9. NEBE T, WUCHER J, BÜHL M, MAIER G, BRECHTEL I, HIRT W:
Comparison of Different Methods, Targets and Inducers of Apoptosis

10. NEBE T, KRANZPILLER S, ZUNFTMEISTER V, CIANFRIGLIA M, DORN-BEINEKE A:
Comparison of Different Techniques to Analyse Multi-Drug Resistance

11. NEBE T, MAIER G, HARTMANN K, BRECHTEL I, BECKER G:
Proliferation Versus Apoptosis: The Bilogical Activity of Thymic Peptides on Lymphocytes of Healthy Donors and HIV Patients

12. NEBE T, MAIER G, MÜLLER M, BRECHTEL I, HARTMANN K, THIENEL F, BUCHHOLZ B, FRIESE K, WILLER A, BECKER KP:
Proliferation and Apoptosis or Phagocytosis: The Supressive Effect of Autoantibodies on Lymphocytes of Healthy Donors and HIV Patients

13. OELSCHLÄGER U, NOWAK R, KREBS U, SCHAUB A, KÖPPEL C, HERBST R, STAMMINGER G, RIEMANN D, HINZE P, KLEINE HD, SIEGERT E, EHNINGER G:
Flußzytometrischer Nachweis geringer Mengen aneuploider Zellen im Knochenmark von ALL-Patienten

14. PETZOLD L, MÜLLER S, HUTTER KJ, BLEY T:
Industrielle Prozeßanalyse: Flow Cytometry in der Brautechnologie

15. SCHEER M, WEBER R, HOFELE C, JOOS S, BORN A, LICHTER P, ZÖLLER J, CREMER T:
Analyse von chromosomalen Imbalancen in Biopsien von oralen Plattenepithelkarzinomen und deren Vorläuferläsionen mittels Mikrodissektion, universaler DNA-Amplifikation und vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH)

16. SCHNEIDER B, BRADL J, KIRSTEN I, NAGORNI M, RINKE B, HAUSMANN M, CREMER C:
Abstandsmessungen von einzelnen Objekten im Interphasezellkern mit dem Wellenfeldmikroskop

17. SCHWARZMANN P, BINDER B, BURKART J, SCHMID J:
HISTKOM-Feldtest für Telepathologie und Telezytologie

ENDE

Tumorbiologie und Tumordiagnostik

Durchflußzytometrische Mehrparameter-quantifizierung des EGFR an Harnblasenkarzinomen

G. Brockhoff, F. Hofstädter,R. Knüchel
Institut für Pathologie der Universität Regensburg

Zielsetzung. Durchflußzytometrie in Form einer mehrparametrischen Analyse in Verbindung mit Beads zur Quantiizierung des EGFR Gehaltes sollte an frischen Harnblasenkarzinomen getestet und mit immunhistocheischen Färbungen des EGFR an Schnitten dieser Tumoren verglichen werden, um eine Verbesserung individueller Wachstumsfaktordiagnostik bei Tumorpatienten anzustreben.
Methoden. Für durchflußzytometrische Messungen wurde eine Dreiparameter-DNA Färbung mit Antikörpern gegen URO5 und EGFR verwendet (1). Quantum Simply Cellular Beads mit definierten antigenen Bindungsstellen(QSC,Sigma) wurden dem Färbeprozess beigefügt (2), um eine absolute Quantifizierung zu überprüfen. Messungen wurden am FACScan Gerät (Becton Dickinson) durchgeführt. Einzelzellsuspensionen aus definierten Kokulturen aus Fibroblasten und Tumorzellen(3), die mit und ohne EGF behan-delt waren und Einzellsuspesionen 25 urothelialer Tumoren wurden untersucht. Gefrierschnitte des Tumormaterials wurden parallel mit einer Dreistufen-Immunperoxidasemethode gefärbt. Die vergleichende immunhistochemische Quantifizierung erfolgte semiquantitativ, während Auswertung der Durchflußzytometrie mit dem Programm Lysis (BD)und der QSC -Software ergfolgte.
Ergebnisse. Adäquate Kompensation des Instrumentes führt zu reproduzierbaren Daten an einem Einlaser-Durchflußzytometer (DFZ). Eine zusätzliche absolute Rezeptorquantifizierung ist durch gleichzeitigen Einsatz von QSC-Beads in der Dreiparameteranalyse entsprechend den Daten, die vorab in der Zweiparameterfärbung (1) erhoben worden waren. Die Übertragung der Methode auf Patientenmaterial zeigt eine gute Trennung zwischen Stroma (Uro5 negativ) und Urothel (Uro5 positiv) mit jeweils meist unterschiedlichem Rezeptorgehalt.Die gleich-zeitige DNA-Färbung erlaubt eine Korrelation zu Ploidie und Proliferation und damit die Definition biologisch relevan-ter Subpopulationen. Beim Vergleich mit immunhistochemischen Färbungen ist die Sensitivität der DFZ insbesondere bei relativ niedrigem EGFR-Gehalt($2x10^4$)der Dreistufenimmunperoxidasefärbung überlegen.
Schlußfolgerung. Eine praktikable Methode zur absoluten EGFR-Färbung wurde erar-beitet, die gegenüber den gängigen ELISA-methoden den Vorteil der Trennung von Tumor und Stroma ermöglicht und im Gegensatz zur Immunhistochemie eine objektive und noch sensitivere Quantifizierung und gleichzeitige Zuordnung zu anderen Tumoreigenschaften erlaubt.

Brockhoff et al. Cytometry 17:75-83, 1994. Schuster et al. J Urol.151:1707-1711, 1994 Brockhoff et al. Anal Cell Path. in Druck, 1996

Verbesserte Ein-Laser Messung von 2 zellulären Antigenen und DNA-Ploidie durch den kombinierten Einsatz von Propidiumiodid und TO-PRO-3 Iodid.

Willem E. Corver, Gert Jan Fleuren and Cees J. Cornelisse
Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leiden, Holland.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß TO-PRO-3 Iodid (TP3) bei Verwendung eines Lasers mit 488 nm indirekt durch Energietransfer angeregt werden kann, wenn es zu einer Lösung mit Propidiumiodid (PI) hinzugegeben wird. Wir haben den kombinierten Einsatz von TP3 und PI im Hinblick auf eine Überwindung spektraler Überlappungsprobleme bewertet, wie sie bei der Verwendung von Fluoreszein Isothiozyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE) und PI für die simultane Verwendung von 2 zellulären Antigenen und DNA unter Einsatz eines Lasers gesehen werden. Eine Verdünnungsreihe von TP3 Konzentrationen (0.001 bis 16M) wurde in einer Suspension mit ungefärbten, Keratin 8/18-FITC-, und Keratin 8/18-PE-markierten MCF-7 Mammakarzinomzellen, bei denen die DNA mit PI gefärbt worden war (100 M). Die Korrektur der spektralen Überlappung von PE/PI in den Grünfluoreszenzdetektor (FL1) konnte vollständig kompensiert werden und erforderte nur 1.3% Kompensation bei einer TP3-Konzentration von 2.0M in der Anwesenheit von PI (100M). Die spektrale PI-Überstrahlung in den Orange-Fluoreszenz-Detektor (FL2) wurde bei gleicher PMT-Spannung von 76% auf 38% reduziert. Der CV des GO/G1-Gipfels des DNA Histogramms verringerte sich von 3.7% auf 2,96%. TP3 Konzentrationen von mehr als 4.0 M gaben weniger befriedigende Ergebnisse. Die Ratio von p53 gefärbten COV362.cl4 Ovarialkarzinomzellen und ungefärbten COV362.cl4 Zellen wurde von 13.3+/- 0.13 auf 10.3+/- 0.59 reduziert, nachdem die DNA mit PI gefärbt worden war und noch mehr nach PI/TP3 Färbung (7.56+/-0.32). Nach Dreifachfärbung mit Keratin8/18-PE als zusätzlichem Marker war die Signal-zu-Hintergrund-Ratio zwischen ungefärbten und p53 gefärbten Zellen jedoch niedriger als wenn die DNA nur mit PI gefärbt wird (4.48 im Vergleich zu DNA mit PI/TP3 = 6.61). Zusammenfassend stellen wir fest, daß die Zugabe von TP3 zu PI die kombinierte Messung von DNA Ploidie und Antigenexpression an epithelialen Zellfraktionen von heterogenen Zellpopulationen unter Verwendung eines Ein-Laser-Gerätes verbessert.

Grad der Aneuploidie (5c- und 9c-exceeding rate) als prognostischer Marker für das Mamma-Carcinom

Coumbos, A., Ruhnke, M., Yildirim, S. and Kühn, W.
Universitäts-Frauenklinik Klinikum Benjamin Franklin,
Freie Universität Berlin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin

Einleitung: Die DNA-Bildanalyse repräsentiert eine etablierte Methode zur biologischen Klassifikation des Mamma-Carcinoms. AUER klassifizierte maligne Mamma-Tumoren in vier Gruppen; entsprechend der Anzahl diploider, polyploider, triploider und aneuploider Zellen wurden die Carcinome in die Gruppen AUER I-IV eingeordnet. Da Hochrisiko-Carcinome der Gruppen AUER III und IV relativ häufig vorkommen (in unserer Untersuchung mehr als 80%), ist der prognostische Wert der Methode als schwierig einzuordnen. Wir untersuchten die prognostische Signifikanz der Anzahl aneuploider Zellen einer Tumorpopulation (5c- und 9c-exceeding rate).
Material und Methoden: Tupfpräparate von 252 malignen Mamma-Tumoren wurden nach FEULGEN gefärbt und mit Hilfe der CAS 200 DNA-Bildanalyse vermessen. Die Patientinnen wurden postoperativ in der onkologischen Ambulanz unserer Klinik nachbeobachtet. Der Aneuploidie-Grad wurde zum Krankheitsverlauf korreliert.
Ergebnisse: Die mediane Beobachtungszeit betrug 22 Monate. 215 Patientinnen (85%) waren gesund und rezidivfrei. 18 Patientinnen (7%) erlitten ein Rezidiv, 19 Frauen (8%) starben am Mamma-Carcinom. Wie Tab.1 demonstriert, waren 63% der gesunden Patientinnen der Gruppe AUER IV zuzuordnen, während verstorbene Frauen in 84% dieser Gruppe zugehörten. Tab.2 zeigt die mediane Anzahl aneuploider Zellen bei gesunden und verstorbenen Patientinnen. Der Wilcoxon Test für die Zellen >5c und >9c ist $p<0,0277$ bzw. $p<0,0026$. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl aneuploider Zellen in den Gruppen gesunder und am Rezidiv erkrankter Patientinnen. Verstorbene Frauen wiesen in 63% mehr als 4 Zellen >9c. Gesunde Frauen hatten nur in 31% mehr als 4 Zellen >9c. Die Kombination von mehr als 10 Zellen >5c und mehr als 2 Zellen >9c fand sich in 58% der verstorbenen Patientinne und in 31% der gesunden lebenden Frauen.
Zusammenfassung: Die Anzahl der Zellen >5c und vor allem >9c stellt einen prognostischen Marker für das Überleben der Mamma-Carcinom-Patientinnen dar. Die Metastasierungswahrscheinlichkeit kann mit der DNA-Bildanalyse noch nicht festgelegt werden, da das Beobachtungsintervall noch zu kurz ist. Eine längere Beobachtung müßte jedoch die Antwort auf diese Frage in nächster Zeit liefern.

Tabelle 1: Verteilung der Patientinnen in AUER-Gruppen

	AUER I	AUER II	AUER III	AUER IV
gesund (n=215)	3,3%	12,5%	21,4%	62,8%
Rezidiv (n=18)	6,3%	16,7%	11%	66%
verstorben (n=19)		5%	11%	84%

Tabelle 2: Mediane Anzahl aneuploider Zellen bei gesunden und verstorbenen Patientinnen

	>5c	>9c
gesunde lebende Pat.	12 cells	2 cells
verstorbene Pat.	21 cells	5 cells

Wertigkeit der Flow-Cytometrie bei malignen Gliomen

V. Ehemann, B. Eifert*, K. Münkel*, A. Lange, H.F. Otto
Pathologisches Institut und Neurochirurgische Klinik* der Universität Heidelberg

Zellzyklusanalysen sowie der DNA-Index geben Aufschluß über den Grad der Ploidisierung und das Wachstumsverhalten von Tumoren. Wir haben maligne Gliome flow-cytometrisch untersucht und auch als Primärkulturen analysiert. Die Ergebnisse wurden in Beziehung zum Tumortyp, zum Grading sowie zu cytogenetischen Merkmalen der Tumoren gesetzt.

30% der analysierten Gliome waren diploid, 70% zeigten aneuploide Tumorzellpopulationen. Die DNA-Indices ergaben eine heterogenes Bild von 1.0 bis 2,3. In der S-Phasen-Analyse zeigten sich Proliferationsaktivitäten von 0,7% bis zu 17%. Diploide Gliome weisen generell eine geringere S-Phasen-aktivität auf als aneuploide Gliome. 20% der aneuploiden Tumoren wiesen eine peridiploide Stammlinie mit einem DNA-Index von 1,1 auf (CV 1,4-1,9). Mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) konnte bei diesen peridiploiden Gliomen eine Trisomie des Chromosoms 1 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei malignen Gliomen eine enge Korrelation besteht zwischen DNA-Index, Proliferationsaktivität, Tumor-Grading und cytogenetischen Tumormerkmalen. Die DNA-Cytometrie stellt damit einen zusätzlichen objektiven Parameter in der Beurteilung der Gliome dar.

Standardisierung von Zweiparameter-DNA-zytometrie für das Kolonkarzinom

R.Knüchel, S. Fleischmann, H. Zirngibl, F. Hofstädter
Institut für Pathologie und Chirurgische Klinik und Poliklinik der Universität Regensburg

Hintergrund und Zielsetzung. Eine Möglichkeit der Präzisierung von Ploidie-und Proliferationsbestimmung mitttels Durchflußzytometrie besteht in der Tumorzellselektion durch Zwei- oder Mehrparameter-Fluoreszenzanalyse. Am Beispiel des humanen Kolon-karzinoms standardisieren wir in einer laufenden Studie die Zweiparameterfärbung von Zytokeratin und DNA, um die Meßergebnisse anschließend prospektiv durch Vergleich mit den klinischen Daten in ihrer Bedeutung für die onkologische Zusatzdiagnostik zu bewerten.

Material und Methoden. Wir erhielten 100 frische uneröffnete Kolektomiepräparate unter Schnellschnittbedingungen. Es wurden Proben von normaler Mukosa und von verschiedenen Arealen des Tumors entnommen,die für Referenzschnitte und Zellvereinzelung halbiert wur-den. Methanol fixierte Einzelzellsuspensionen wurden mit einer indirekten Immunfluoreszenz-technik gefärbt, bei der ein Antikörper gegen Zytokeratin (CK18, Immunotech) und eine Propidiumiodid(PI)-färbung zur Darstellung von DNA im Anschluß an RNAse Behandlung verwendet wurden. Ein Minimum von $2x10^4$ Ereignissen / Probe wurde an einem FACscan-Gerät (Becton Dickinson), ausgerüstet mit einem Pulsprozessor, gemessen. Der Gehalt Zytokeratin-positiver Zellen wurde bestimmt und vergleichend die Anteile von Proliferations-fraktionen und Ploidie an allen Zellen gegenüber den Zytokeratin-positiven Fraktionen vergli-chen und statistisch hinsichtlich signifikanter Unterschiede überprüft.

Ergebnisse. Normale diploide Zytokeratin-negative Zellen unterschieden sich in der Fluoreszenzintensität des PI nicht signifikant von denen diploider Zytokeratin-positiver Zellen, wodurch ein guter interner Standard für Ploidie einerseits und ein Ausschluß von Pseudoploidie durch Ganzzellpräparationen andererseits gegeben sind. Fünf Prozent der Fälle zeigten nach Gating abweichende Ploidie im Vergleich mit der Gesamtzellmenge. Auffallend war eine durchschnittlich geringere S-Phase-Fraktion (SPF) in der normalen Kolonschleimhaut nach Zytokeratin-Gating, gegenüber einer Zuanhme der SPF unter gleichen Bedingungen in den Tumorproben. Weiterhin ergab sich eine durchschnittlich höhere SPF in tetraploiden Tumoren gegenüber aneuploiden Tumoren.

Schlußfolgerung. Die Daten, insbesondere der SPF-Bestimmung von Tumor- und Normalgewebe entsprechen der Hypothese einer Präzisierung der DNA-Messung durch relative Tumorzellselektion. Insbesondere in Verbindung mit vorangehenden Referenzschnitten zur Bestimmung von Qualität des Tumors und Quantität des Tumorzellanteils sehen wir eine gute Möglichkeit durchflußzytometrische Ploidie- und Proliferationsbestimmungen zu präzisieren und für die klinische Anwendung zu standardisieren.

ANALYSE DER MITOCHONDRIEN-FUNKTION VON AUS 2D- UND 3D-KULTUR ISOLIERTEN FIBROBLASTEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

L.A. Kunz-Schughart[1,2], R.C. Habbersett[1], and J.P. Freyer[1]
[1]Los Alamos Natl. Lab., Life Sciences Division, Los Alamos, NM 87545, USA und
[2]Institut für Pathologie, Universität Regensburg, 93042 Regensburg

Embryonale Rattenfibroblasten unterschiedlicher Transformationsstadien stellen ein exzellentes, gut etabliertes Modell zur Analyse pathophysiologischer Veränderungen im Verlauf der onkogenen Transformation dar. Die vorliegenden Untersuchungen wurden an Monolayer- als auch Kurz- und Langzeit-3D-Kulturen zweier unterschiedlich immortalisierter Fibroblasten-Zellinien (**Rat1** und **M1**) und deren *T24Ha-ras*-transfizierten, hochtumorigenen Abkömmlingen **Rat1-T1** und **MR1** durchgeführt. Es ist bereits durch frühere Studien bekannt, daß sich diese eng-verwandten Zellinien signifikant in ihrem dreidimensionalen Wachstumsverhalten und der Proliferationskinetik unterscheiden, wobei die zelluläre Sauerstoff-Aufnahme im Sphäroid im wesentlichen durch die Proliferationscharakteristiken weniger durch den Transformationsgrad der Zellen beeinflußt zu sein scheint.

Zur Untersuchung von Mitochondrien-Masse und -Aktivität wurden Zellen aus exponentiell-wachsenden und konfluenten Monolayer-Kulturen sowie aus unterschiedlich großen Aggregaten (< 200 µm; 500-700 µm; > 1500 µm) isoliert und parallel mit den zwei Mitochondrien-spezifischen Fluorochromen 10N-Nonyl-Acridin-Orange (NAO) und Rhodamin 123 (Rh123) gefärbt. Vor der durchflußzytometrischen Messung an einem Los Alamos Multilaser/Multiparameter Durchflußzytometer mit integrierter Coulter-Volumen Meßeinheit wurden die Proben zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Die Datenanalyse erfolgte mittels eines lokal entwickelten Software-Programms. Zellzyklus-Verteilungen wurden aus DNA-Histogrammen mit Hilfe des MultiCycle AV Programms (Phoenix Flow Systems) kalkuliert.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß Unterschiede in der Mitochondrien-Aktivität pro Zelle hauptsächlich auf Veränderungen im Zellvolumen beruhen. Teilweise reflektiert die Rh123 Fluoreszenz/Zelle Differenzen in der zellulären O_2-Aufnahme von nicht- im Vergleich zu hoch-tumorigenen Fibroblasten. Die Tatsache, daß die Ratio 'Mitochondrien-Aktivität:Mitochondrien-Masse' sowohl als Funktion der Zeit in Monolayer-Kultur als auch mit zunehmendem Sphäroidvolumen ansteigt, könnte mit dem Auftreten einer ruhenden Zellpopulation und damit der Anreicherung Stoffwechsel-inaktiverer Zellen assoziiert sein. Dieses Resultat stimmt mit früheren Beobachtungen überein, die eine drastische Reduktion der RH123-Aufnahme von äußeren zu inneren Regionen in Rat1-T1 und MR1 Sphäroiden bei gleichbleibender Mitochondrien-Masse/Zellvolumen-Einheit beschreiben. Diese Arbeit wurde durch DFG grants Ku 917/1-1/2, NIH grant CA-51150 und das National Flow Cytometry Resource RR-01315 unterstützt.

Flußzytometrische Charakterisierung der Apoptose bei Lutealzellen aus frühen ovariellen Zyklusstadien

Berthold Löhrke, Ralf Pöhland, Torsten Viergutz, Frank Becker

Einleitung. Follikelzellen differenzieren sich zu progesteronproduzierenden Lutealzellen nach der Ovulation. Der entstehende Corpus luteum unterliegt einer Rückbildung, wenn die Befruchtung ausbleibt. Die Regression ist gekennzeichnet durch Verlust von Lutealzellen, wobei das Verhältnis von großen und kleinen Lutealzellen sich verschiebt. Dadurch wird wahrscheinlich, daß bestimmte Zellen einem physiologischen Zelltod unterliegen. Jedoch ist noch nicht völlig klar, ob Apotose oder Nekrose zu dem Verlust an bestimmten Zellen führen. Dies könnte vom Zyklusstadium beeinflußt sein. Gegenwärtig wird allgemein akzeptiert, daß das frühe apoptotische Stadium, das der Chromatinlyse vorangeht, durch mitochondriale und Plasmamembran- Veränderungen gekennzeichnet ist. Methoden. Lutealzellen vom Rind aus verschiedenen ovariellen Zyklusstadien wurden wie folgt charakterisiert:1) dsDNA Fragmentierungen über terminale Transferase (TdT-Test, Boehringer- Mannheim) 2) die Aufnahme von Propidiumjodid (PI) zur Analyse von Plasmamembranveränderungen 3) die Färbung durch $DiBaC_4(3)$ für die Messung von Transmembranpotentialänderungen (Ψ) 4) die Oxidation von Dihydrorhodamin (DHR) zu R123 als Maß der mitochondrialen Aktivität (Ψ von Mitochondrien). Ergebnisse. Der Vergleich von Lutealzellen am 5. Zyklustag mit dem 8. Tag zeigte, daß der Anteil von großen Lutealzellen mit dsDNA Fragmentierungen anstieg, während der Zellanteil mit R123-Fluoreszenz abnahm, d.h., die oxidative Aktivität bzw. das mitochondrial Ψ sich verringerte. Die Dissipation von Ψ ging einher mit einer Plasmamembrandepolarisation und erhöhter PI-Fluoreszenz. Eine Inkubation mit $PGF_{2\alpha}$(16 h) beeinflußte nicht die Fragmentierungsrate, sondern den Anteil an DHR-oxidierenden Zellen. Eine α_2-adrenerge Stimulation war nachweisbar (Hinweis auf intakte Plasmamembranen). Schlußfolgerungen. Die Ergebnisse sind vereinbar mit der Hypothese, daß große Lutealzellen apoptotische Merkmale aufweisen (deutliche Verringerung des mitochondrialen Ψ , Erhöhung der Plasmamembranpermeabilität, was zur Depolarisierung und zur erhöhten PI-Aufnahme führte).

Ein neuer retroviraler Vektor mit einem Zelloberflächenmarker für Fanconi Anaemie Gruppe C Gentherapie

Andreas W. Machl, Simone Plasitzer, Manfred Kubbies

Boehringer Mannheim GmbH, Biotechnology Therapeutics Research Center, 82377 Penzberg, Germany

Retrovirale Vektoren bilden effektive Transfersysteme für die stabile Integration therapeutisch relevanter Gene in das Genom proliferierender Zellen. In der Mehrzahl der für Forschung und klinische Studien verwendeten Vektoren wird Neomycin als Selektionsmarker verwendet. Um den zeitraubenden und möglicherweise toxischen G418-Selektionsschritt zu umgehen, konstruierten wir einen neuartigen Vektor, der l-NGFR (*low affinity nerve growth factor receptor*) als Zelloberflächenmarker zur Identifikation reparaturdefekter Fanconi-Anaemie-Zellen, deren Gendefekt mit dem FAC-Gen komplementiert wurde, besitzt. Der Vektor basiert auf dem MoMuL-Virus, enthält das l-NGFR Gen mit deletierter Signalpeptid-Region unter der Kontrolle des LTR-Promotors und das therapeutisch relevante FAC-Gen hinter einem SV40-Promotor. Es wurden hochtitrige virushaltige Zellkulturüberstände von FACS klonierten Verpackungszellinien verwendet, um in einem einzigen Versuchsansatz innerhalb von 48 Stunden mittels *Dual Laser Flow Cytometrie* primäre Transduktionsraten zu bestimmen, transduzierte Zellen zu identifizieren, sowie die Korrektur des Mitomycin C verursachten G2-Arrestes in Fanconi-Zellen nachzuweisen. Die primären Transduktionsraten wurden durch <l-NGFR> Antikörperfärbung mittels Flow Cytometrie bestimmt und betrugen für Fanconi Zellinien zwischen 5% und 30%, für CD34 positive Zellen 5% und für PBL's 15%. Die durch Mitomycin C induzierte Zellzyklusstörung in der G2-Phase wurde in Fanconizellen der Komplementationsgruppe C vollständig behoben, nicht jedoch in Zellen anderer Komplementationsgruppen. Zusätzlich zur Normalisierung der G2-Phasendauer wurde auch die Induktion von Zelltod durch Mitomycin C um den Faktor 3-10 verringert.

DURCHFLUßZYTOMETRISCHER NACHWEIS VON ANEUPLOIDIEN HUMANER GRANULOSAZELLEN IN FOLLIKELFLÜSSIGKEITEN VON PATIENTINNEN NACH IN-VITRO FERTILISATION (IVF)

P. Molsheimer[1], K. Grunwald[2], K. Feldmann[2], K. Klinga[2], T. Rabe[2], B. Runnebaum[2], H.H. Rummel[1]

1 Abteilung für Gynäkologische Morphologie, Universitäts-Frauenklinik, Vossstr. 9, 69115 Heidelberg
2 Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie, Universitäts-Frauenklinik Heidelberg

Fragestellung: Ziel der Studie war die Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Granulosazellen unter Gonadotropinstimulation in vivo. Untersucht wurde das Proliferationsverhalten von Granulosazellen in der Follikelflüssigkeit von Patientinnen nach hormoneller Stimulation im Rahmen eines In Vitro Fertilisationsprogramms (IVF).

Studiendesigne: DNA-Ploidy und Proliferationsindices von Granulosazellen in frischengewonnenen unfixierten Follikelnflüssigkeiten (n=119) von mit Gonadotropinen stimulierten Patientinnen (n=32) wurden durchflußzytometrisch nach einem standardisierten Protokoll für hochauflösende DNA-Messung mittels DAPI-Fluorochrom bestimmt. In den Follikelflüssigkeiten wurden die Konzentrationen der Hormone Testosteron, DHEAS, Östradiol, Progesteron, LH, FSH und Prolactin gemessen.

Ergebnisse: Aneuploide Zellen wurden in einer großen Anzahl von Follikeln (65/119) und Patietinnen (25/32) gefunden. Eine kleine Anzahl von Follikeln (8/119) und Patientinnen (7/32) enthielten multiploide Zellen. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen Proliferationsindices und Ploidy. Lichtmikroskopisch fanden sich überwiegend Granulosazellen in den Follikelflüssigkeiten. In keinem Fall fanden sich zytologisch malignitätsverdächtige Zellen. Signifikant niedrigere Konzentrationen von Testosteron, Progesteron und DHEAS in Follikeln mit aneuploiden Zellen konnten nachgewiesen werden.

Diskussion: Dies ist die erste Untersuchung mit Nachweis einer hohen Aneuploidy-Rate menschlicher Granulosa-Zellen in IVF Patientinnen. Die klinische Bedeutung der Beobachtung ist unklar. Weitere Untersuchungen sollten durchgeführt werden zum Nachweis einer möglichen Korrelation zwischen DNA-Ploidy von Granulosazellen und Nebenwirkungen der Gonadotropin Therapie (z.B. Überstimulationssyndrom) sowie den biologischen Parametern einer In-Vitro Fertilisation. Weitere Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, ob obige Daten neue Erkenntnisse liefern zu einem kürzlich international diskutierten Risiko von Kinderwunsch-Patientinnen nach Gonadotropinstimulation, an einem Ovarialcarcinom oder einem Granulosa-Zell Tumor zu erkranken.

DIE INZIDENZ AN ANEUPLOIDIEN BEIM MULTIPLEN MYELOM KORRELIERT NICHT MIT DEM KRANKHEITSSTADIUM

R. Nowak, U. Oelschlägel, U. Range und G. Ehninger
Technische Universität Dresden, Medizinische Klinik I, 01307 Dresden

Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung, bei der häufig Aneuploidien in der malignen Zellpopulation vorkommen. Hinsichtlich der Beziehung von Krankheitsstadium und dem Vorkommen von durchflußzytometrisch nachweisbaren Aneuploidien wurden gegensätzliche Ergebnisse beschrieben. Auch bei der Monoklonalen Gammopathie Unklarer Genese (MGUS) variiert der Prozentsatz der durchflußzytometrisch nachgewiesenen Aneuploidien zwischen 0% bis 50%. Ein Grund für diese Diskrepanzen ist der geringe Plasmazellanteil in den frühen Krankheitsstadien. Mittels gleichzeitiger Messung von DNS-Gehalt und CD38- oder B-B4-Expression konnten Aneuploidien auch bei geringem Plasmazellanteil nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von 60 Patienten mit einer monoklonalen Serumkomponente konnten keine Unterschiede zwischen Krankheitsstadium und Inzidenz an Aneuploidien festgestellt werden.

	MGUS	Multiples Myelom		
		Stadium I	Stadium II	Stadium III
Patientenzahl	11	15	6	26
Incidenz an Aneuploidien	5 (45%)	12 (80%)	4 (67%)	16 (61%)
Korrelationskoeffizient CD56+/Aneuploidie	0,886	0,7971	0,7903	0,1630
p-Wert für die Korrelation	<0,001	< 0,003	0,210	0,1630

In Übereinstimmung mit anderen Autoren korreliert auch in diesen Untersuchungen die CD56-Expression mit dem Prozentsatz an aneuploiden Zellen. Aber innerhalb der einzelnen Krankheitsstadien traten große Differenzen auf. Während die CD56-Positivität in den früheren Stadien mit dem Prozentsatz an aneuploiden Zellen korreliert, konnte in den späteren Stadien keine Beziehung nachgewiesen werden. Die klinische Bedeutung der Subgruppe der CD56 negativen aneuploiden Multiplen Myelome sollte untersucht werden.

Identifizierung DNA-Reparatur relevanter Gene bei Fanconi Anaemie am nicht-syngenen Zellmodell via Differential Display

Simone Planitzer, Andreas W. Machl und Manfred Kubbies

Boehringer Mannheim GmbH, Biotechnology Therapeutics Research Center, 82377 Penzberg, Germany

Konventionelle Subtraktions-Techniken oder DNA-Transfektionsstudien sind hauptsächlich angewandte Standardtechniken zur Identifizierung und Isolation DNA-Reparatur relevanter Gene bei Fanconi Anaemie (FA). Erst kürzlich wurde ein neues molekularbiologisches Verfahren entwickelt, mit dem die mRNA Expression zwischen einer mutierten Zellinie und einer syngenen Kontrolle verglichen werden kann. Mit diesem Differential Display Verfahren können innerhalb kürzester Zeit nahezu alle vorliegenden mRNA Spezies mit statistischen Primern verglichen werden. Dennoch können für die Analyse DNA-Reparatur defekter Mutanten bei Fanconi Anaemie keine syngenen Zellmodelle herangezogen werden. Theoretisch würde man erwarten, daß viele differentielle Banden beim Vergleich von FA Zellen mit nicht-syngenen Kontrollzellen aufgrund der Unterschiede in untranslatierten Bereichen auftreten. Dennoch konnten wir zeigen, daß die Verwendung nicht-syngener diploider Fibroblasten nicht die Anzahl differentieller Banden erhöht. Beim Screening von ca. 13000 c-DNA Banden wurden nur 0,5 % differentielle Banden zwischen FA und Kontrollzellen exprimiert. Die Fragmentlänge reichte von 350 bp bis 900 bp und 25 potentielle FA c-DNA Kandidatenbanden konnten ausgeschnitten und amplifiziert werden. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, daß nicht-syngene, normal diploide Zellkulturmodelle identischer ontogenetischer Herkunft, die durch hochauflösende BrdU/Hoechst-Technik im Flowzytometer zellproliferativ angeglichen wurden, erfolgreich mit der Differential Display Technik zur Identifizierung von DNA-Reparaturgenen verwendet werden können. Die Kandidatengene können nach Klonierung in einen Green Fluorescent Vector und dessen Transfektion in FA Zellen mittels FACS schnell auf eine mögliche Korrektur des DNA-Reparaturdefektes überprüft werden.

DURCHFLUßCYTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON CYTOKERATIN 8-18 UND P53 POSITIVEN ZELLEN BEIM RENALZELLCARCINOM

Eugen Plas, Ruth Jilch*, Sonja Thury*, Michael Fischer*, Heinz Pflüger
Abt. für Urologie und LBI für Urologie und Andrologie, KH Lainz, *Inst. für Laboratoriumsmedizin, KH Lainz Wien

Die DNA-Ploidie bei Tumoren des Urogenitaltraktes wird als zusätzliche Information für die Prognostik verwendet. Auch der Nachweis von epithelialen Antigenen und Proliferationsmarkern gewinnt an Bedeutung. Wir untersuchten die Möglichkeit des durchflußcytometrischen Nachweises von Cytokeratin 8-18 und p53-Antigen positiver Zellen beim humanen Renalzellcarcinom und korrelierten die Expression von Cytokeratin 8-18 und p53 im normalen Nierengewebe zu den Konzentrationen in zentralen und peripheren Tumorgewebe.

Bei 25 Patienten mit Renalzellcarcinom wurden, nach radikaler Tumornephrektomie, sowohl aus der Cortex des normalen Nierenparenchyms als auch aus dem zentralen und peripheren Tumorgewebe, Präparate entnommen. In allen Fällen wurde die DNA-Ploidie sowie die Bestimmung des prozentuellen Anteiles an Cytokeratin 8-18 positiven Zellen und p53 positiven Zellen mittels Durchflußcytometrie aus den Gewebeproben durchgeführt. Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension mit der Medimachine® (Fa. DAKO) aus den Operationspräparaten wurden 10^6 Zellen mit 1% Paraformaldehyd und 70% Methanol (-20°C) fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte eine Doppelfärbung erstens entweder mit FITC- markierten Anticytokeratin 8-18 (Becton Dickinson Inc.) oder mit Anti-p53 (DO-7, indirekte Färbemethode; Fa. DAKO) und zweitens mit Probidiumjodid für die DNA-Analyse. Bei der durchflußcytometrischen Messung wurden mindestens 30 000 Zellen pro Probe analysiert und mittels FACScan (Becton Dickinson, Inc.) und Cell FIT- Programm (Becton Dickinson, Inc.) ausgewertet.

Die DNA-Ploidie der Normalgewebe war in allen Fällen diploid, 7/25 Patienten (28%) hatten einen diploiden Tumor, bei 18/25 Patienten (72%) lag ein aneuploider Tumor vor. Von den aneuploiden Tumoren waren 5/18 hypoploid (27.8%) und 13/18 hyperploid (72.2%). Der Nachweis von Cytokeratin 8-18 positiven Zellen aus dem Normalgewebe, zentralen Tumorgewebe und peripheren Tumorgewebe gelang in allen Fällen. Die durchschnittliche Anteil an Cytokeratin 8-18 positiven Zellen betrug 43.69% ± 18.92SD im Normalgewebe, 26.34% ± 18.16SD im zentralen Tumorgewebe und 33.58% ± 24.6SD im peripheren Tumor. Der Unterschied zwischen Cytokeratin 8-18 positiver Zellen im Normalgewebe und zentralem Tumorgewebe war signifikant ($p<0.05$), hingegen zeigte sich zwischen Normalgewebe und peripherem Tumor kein signifikanter Unterschied ($p>0.05$). Der Nachweis von p53-positiven Zellen gelang in 75% aller Untersuchungen. Der Anteil an p53-positiven Zellen im Normalgewebe lag bei durchschnitlich 0.78% ± 0.81SD, im zentralen Tumor 0.91% ± 1.0SD und im peripheren Tumor 1.44% ± 1.6SD. Der Unterschied zwischen p53-positiven Zellen im Normalgewebe und zentralem Tumorgewebe war nicht signifikant ($p>0.05$), zwischen Normalgewebe und peripherem Tumor bestand ein signifikanter Unterschied ($p<0.05$).

Der durchflußcytometrische Nachweis von Cytokeratin 8-18 Antigen in der Niere gelang sowohl im Normalgewebe als auch im Tumorgewebe, hingegen ließen sich p53 positive Zellen nur in 75% der Präparate nachweisen. Der höhere Anteil Cytokeratin-positiver Zellen im peripheren Tumor könnte durch den Verlust epithelialer Zellen im Tumorzentrum bedingt sein. Der Anstieg p53-positiven Zellen im peripheren Tumorgewebe deutet auf eine höheren Anteil an Mutationen in der Tumorperipherie hin.

VERÄNDERUNGEN IN MITOCHONDRIALEM POTENTIAL DER ZELLE UNTER EINFLUSS VON APOPTOSE INDUZIERENDEN SUBSTANZEN.

Pogrebniak A, Stoetzer OJ, Wilmanns W, Nüssler V

GSF-Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Institut für klinische Hämatologie, München

Einführung: Das mitochondriale Membranpotential (MMP) ist ein indirekter Indikator für mitochondriale Funktion (Sauerstoffutilisation). Veränderungen der mitochondrialen Funktion spielen bei der zellulären Proliferation und dem programmierten Zelltod eine wichtige Rolle. So findet die Generierung von Sauerstoffradikalen an mitochondrialer Membrane statt. Oxidativer Stress ist bekanntermaßen für den programmierten Zelltod nach Zytostatika- Behandlung mitverantwortlich.

Methoden: MMP-Bestimmung wurde mit der Hilfe von zwei Farbstoffen, nämlich 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) and Rhodamin-123 durchgeführt. Die Intensität der JC-1 und der Rhodamine Färbung korreliert mit dem Grad, der MMP Polarisation. Die Zellen wurden 30' bei 37 inkubiert und dann mit Hilfe der Lysis II Software am FACScan analysiert. Die Photomultipler waren FL1 für Rhodamin-123 und entsprechend FL1 und FL2 für JC-1. Daher waren nur die FL2 Werte relevant für die MMP-Bestimmung mit JC-1. Vier Zellinien (HL-60, Jurkat, Carpas, K562) wurden mit Etoposid (50-100 µmol) für 12 Std. inkubiert. Forward- und sidescatter wurden für die Abgrenzung vom Zelldebris verwendet. Die Zellvitalität wurde in einem Teil von unseren Experimenten mit Propidium Iodide (PI) bestimmt. Peak channel and mean Werte wurden für Bestimmung der Intensität der Fluoreszenz (Fl) herangezogen.

Ergebnisse: Das FSC/SSC-Bild zeigte zwei zellinienabhängig verschiedene Subpopulationen; eine mit hohem FSC (1) und andere mit niedrigem FSC und/oder hohem SSC (2) von Zellinien abhängig. Daher war die Population 1(P1) fast komplett PI-negativ und wies eine höhere Fluoreszenzintensität als P2 auf. Die Fluoreszenzintensität in PI-negativen Zellen vom P2 war ebenso hoch wie die Fl von toten Zellen. Deshalb werteten wir nur P1 aus. MMP-Entkoppler (CCCP) induzierten ein Abfall von JC-1 und Rhodamine Fluoreszenz.
Nach 7 Std. Inkubation mit Etoposid war die Fl von JC-1 angestiegen und blieb hoch bis der Zelltod auftrat. Dieses Phänomen war in allen vier Zellinien zu beobachten. Ein geringer Anstieg in Rhodamine Fl nach der Behandlung mit Etoposid war nur in K562 und in Jurkat zu sehen, währenddessen die Daten in Carpas and HL-60 inkonsequent waren. Möglicherweise erschweren Rhodamin-induzierte Alterationen in FSC/SSC die Unterscheidung von P1 und P2.

Schlußfolgerung: Im Gegensatz zu anderen Forschungsgruppen konnten wir nach letaler Etoposid-Therapie einen Anstieg des MMP beobachten. Unsere gating-Technik erlaubte uns dabei die Isolation der funktionell aktiven Zellpopulationen. JC-1 erwies sich als verlässlicher als Rhodamine, weil die Veränderungen früher auftreten und ausgeprägter sind. Vielleicht sind diese Veränderungen nur der Antwort auf Etoposide und nicht für durch andere Substanzen induzierte Apoptose spezifisch, weil Etoposide induziert keine Apoptose in K562-Zellen, aber ist für sie zytotoxisch.

DNA-Diploidie, eine flußzytometrische Eigenschaft des Ovarialkarzinoms?

Reich O, Pürstner P
Geburtshilflich-gynäkologische Universitätsklinik Graz

Hintergrund: Bei der multiparametrischen Beurteilung des malignen Potentials von Ovarialkarzinomen hat die durchflußzytometrische Bestimmung der DNA-Ploidie in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung erlangt. Bisher wird überwiegend davon ausgegangen, daß die Mehrzahl der Ovarialkarzinome vom Malignitätsgrad I einen diploiden DNA-Gehalt zeigen, während sich bei Karzinomen vom Malignitätsgrad II und III nicht-diploide Meßwerte finden. Von großer praktischer Bedeutung ist dabei, daß sowohl Auswahl, Anzahl und Qualität der Gewebeproben, als auch der Meßstandart und die Art der Dateninterpetation wesentlich die Ergebnisse beeinflussen. Göhde et al. (1) drückten 1995 die Vermutung aus, daß es bei den meisten malignen Tumoren keine diploiden Befunde mehr gibt, wenn unter optimalen Bedingungen gearbeitet wird.
Zielsetzung: Beantwortet werden soll, ob sich bei Anwendung hochauflösender Meßtechnik und Minimierung anderer möglicher Fehlerquellen DNA-diploide Ovarialkarzinome finden lassen.
Methode: Frischmaterial von 33 Ovarialkarzinomen wurde untersucht (26 serös, 3 endometrioid, 2 muzinös, 2 klarzellig; hoch differenziert n=5, mäßig differenziert n=12, schlecht differenziert n=16). Pro Fall wurden unter Beachtung der Makroskopie und in Abhängigkeit der Tumorgröße gezielt zwischen 3 und 8, durchschnittlich 5, Gewebsproben entnommen. Die Entnahme erfolgte spätenstens 30 Minuten nach der Operation. Nach Zweiteilung der Proben wurde je die eine Hälfte bei -70 C eingefroren, je die andere Hälfte zur Qualitätskontrolle formalinfixiert, paraffingebettet und HE-gefärbt. Für die DNA-Analyse wurde eine PAS III Zytometer (Fa. Partec, BRD) eingesetzt. An mindestens 20.000 Zellkernen pro Probe erfolgte eine DAPI-Färbung nach Göhde, modifiziert nach Otto. Zur Eichung des Gerätes und als interne Refferenz dienten humane Lymphozyten. Der mittlere Variationskoeffizient (CV) für sämliche gemessene G0/G1-peaks war <3%. Die Auswertung erfolgte mittels Multicycle software (Phenix Flow System). Zur Fallinterpretation wurde jeweils die Probe der ausgeprägtesten Abweichung vom diploiden Refferenzpeak herangezogen. Folgende Gruppen der Ploidie wurden unterschieden: diploid (DI: 0,97-<1,03), near diploid (DI: 1,03-<1,05; 0,95-<0,97), near tetraploid (DI: 1,9-2,1), hypoploid (DI: < 0,95), low aneuploid (DI: 1,05-<1,1), high aneuploid (DI: 1,1-<1,9; >2,1).
Ergebnisse: 33 von 33 (100%) Karzinomen zeigten einen nicht diploiden DNA-Gehalt. Dabei fanden sich in 31 von 33 (94%) Karzinomen high aneuloide, multiploide oder hypoploide Messungen. 2 Karzinome (6%) waren DNA near-diploid.
Schlußfolgerung: Die Ergebnisse legen nahe, daß bei Anwendung hochauflösender Meßtechnik ein nicht-diploider DNA-Gehalt eine weitgehend konstante Eigenschaft der Ovarialkarzinome ist. Deren alleinige Wertung liefert damit keinen wesentlichen Beitrag zur Bewertung des malignen Potentials dieser Tumoren. Hingegen behält die DNA-Ploidie bei Ovarialtumoren vom Borderlinetyp aufgrund geringerer netto DNA-Änderungen dieser Tumoren ihren klinisch hohen Stellenwert (2).

1. Göhde W. et al.: Die Bedeutung der Meßgenauigkeit bei der DNS-Zytophotometrie. Verh.Dtsch.Ges.Zyt. 19; 1995: 156-70
2. Reich O. et al.: Hochauflösende Durchflußzytometrie und p53 Immunoreaktivität bei epithelialen Ovarialtumoren vom Borderlinetyp im Stadium I. 8. Heidelberger Zytometrie Symposium. Kurzfassung der Beiträge. ISSN 0949-5347; 1995:p39

Unterscheidung von Ovarialtumoren mit DNA-Zytometrie

M. Ruhnke, A. Ditzenbach und W. Kühn
Abteilung für Gynäkologische Morphologie der Frauenklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin, Hindenburgdamm 30, D-12200 Berlin

Problemstellung: Borderlinetumore des Ovars sind schwer von proliferierten Adenomen auf der einen und gut differenzierten Karzinomen auf der anderen Seite zu unterscheiden. Die Diagnostik ist durch die geringe Übereinstimmung einzelner Untersuchungen gekennzeichnet. Im Gegensatz zu Ovarialkarzinomen, bei denen eine adjuvante Polychemotherapie integraler Bestandteil der Therapie ist, kann der Borderlinetumor durch alleinige Chirurgie behandelt werden. Um eine Übertherapie zu vermeiden sind reproduzierbare Methoden zur Unterscheidung der einzelnen Tumorentitäten notwendig.
Material und Methoden: Von 150 Ovarialtumoren (24 benigne, 53 borderline und 73 maligne Tumore) wurde der DNA-Gehalt bestimmt. Alle Präparate wurden von einem erfahrenen Pathologen (WK) reevaluiert. Schnitte von parafinisiertem Material wurden nach Feulgen gefärbt und mit einem CAS-200 Bildverarbeitungssystem analysiert. Die statistische Auswertung basiert auf der relativen Zellenzahl mit einem DNA-Gehalt von 2c, >5c und >9c und wurde mit dem U-Test durchgeführt. Untersucht wurden 14 proliferierte und 10 nicht proliferierte Adenome (benigne), 42 seröse und 11 mucinös Borderlinetumore, sowie 12 Grad I, 26 Grad II und 25 Grad III Ovarialkarzinome
Ergebnisse: Der relative Anteil von diploiden Zellen war 78% bei benignen und 31% bei borderline Tumoren. Die Ovarialkarzinome zeigten im Median keine diploiden Zellen. Bei Adenomen hatten 3%, bei Borderlinetumoren 20% und bei Karzinomen 43% der Zellen einen DNA-Gehalt >5c. Zellen mit einem DNA-Gehalt >9c (9%) fanden sich nur bei Malignomen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen proliferiertene und nicht prolifrierten Adenomen. Ebeso zeigten seröse und mucinöse Borderlinetumore keinen signifikanten Unterschied. Signifikant unterschiedlich war der Zellenateil mit einem DNA-Gehalt von 2c, >5c und >9c sowohl zwischen benignen und borderline, als auch zwischen borderline und malignen Tumoren. Proliferierte Adenome und Borderlinetumore unterschieden sich signifikant im relativen Anteil von 2c- und >5c-Zellen
Schlußfolgerung: Die DNA-Zytometrie ist eine zusätzliche Methode zur Unterscheidung von benignen, borderline und gut differenzierten malignen Ovarialtumoren.

Angiogenese in Ovarialkarzinomen: Erste Erfahrungen mit bildanalytischer Quantifizierung der endothelialen Immunoreaktivität und ihrer möglichen prognostischen Bedeutung

W. Schöll, O. Reich, D. Pieber, F. Gücer
Geburtshilflich-Gynäkologische Univ. Klinik Graz

Hintergrund und Fragestellung: Für das Wachstum eines Tumors und seiner Metastasen ist die Bildung von Blutgefäßen essentiell. Das Ausmaß dieser Angiogenese bestimmt die Oxygenierung und die Anlieferung von Substraten an die Tumorzellen und wird zu einem determinierenden Faktor für das Tumorwachstum. Ist die Tumorvaskularisation bildanalytisch quantifizierbar und ist ihre Zunahme Ausdruck gesteigerter Tumoraggressivität?

Material und Methodik: Patientinnen mit Ovarialkarzinomen desselben histologischen Typs, Gradings und Stadiums und derselben operativen und adjuvanten Therapie, jedoch völlig unterschiedlichen Krankheitsverlaufes (Versterben am Tumor innerhalb von 5 Jahren versus Rezidivfreiheit über 10 Jahre) werden bezüglich ihrer Tumorvaskularisation verglichen.

In paraffiniertem Material werden endotheliale CD34-, CD31- und Faktor VIII Antigene mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern markiert. Die Dedektion erfolgt durch ein Biotin-Streptavidin amplifiziertes System mit "Fast Red" als Chromogen. Jene Schnitte, die bildanalytisch vermessen werden, bleiben zur isolierten Darstellung der Gefäße ohne Gegenfärbung. Mittels CCD Camera wird ein digitales Graubild im Computer gespeichert. Nach programmierten Schritten der Bildvorverarbeitung ("dynamische Diskriminierung", Tiefpaßfilterung mit Subtraktion des Hintergrundes) wird ein Binärbild erstellt, in dem nur mehr Bildpunkte erfaßt werden, die den ursprünglich gefärbten Endothelzellen entsprechen. Hintergrund gelangt nicht zur Darstellung. Der prozentuale Flächenanteil, der von den Endothelien im eingesehenen Gesichtsfeld eingenommen wird, wird bestimmt. Infolge der Automatisierung der Methode können bei geringem Zeitaufwand mehrere Quadratmillimeter am Schnitt vermessen werden.

Ergebnisse: Karzinome mit schlechter Prognose zeigen im epithelnahen Tumorstroma Endothelzellflächenanteile bis über 10 %. Tumore mit klinischer Rezidivfreiheit haben im Vergleich dazu stromale Endothelflächenanteile unter 5 %. Bei Berücksichtigung der epithelialen Tumorkomponente werden bei beiden Karzinomformen Werte von 3% nicht überschritten.

Diskussion: Erste Ergebnisse bestätigen die in der Literatur vorliegenden Hinweise, daß das Ausmaß der Vaskularisation ein wichtiger prognostischer Faktor bei Ovarialkarzinomen sein kann. Der Einsatz der Bildanalyse kann die quantitative Erfassung der Vaskularisation gegenüber einer einfachen Gefäßzählung stark beschleunigen und objektivieren. Der Endothelzellflächenanteil ist reproduzierbar und unterliegt weniger Störeinflüssen als die Bestimmung des Flächenanteils des Gefäßlumens oder eine Gefäßzählung.

Literatur:
Hollingsworth H. C. et al.: Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Comment in Am J Pathol. 1995; 147(1):33-41
Simpson J. F. et al.: Endothelial area as a prognostic indicator for invasive breast carcinoma. Cancer 1996; 77:2077-85

Proliferationskinetik von Magenkarzinomen "in vivo"

A. Sendler*, K.-P. Gilbertz*, A. Rhein*, K. Matzen*, U. Fink*, I. Becker+, D. van Beuningen*

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

Der Stellenwert der potentiellen Verdopplungszeit Tpot als Prognosefaktor und/oder prädiktiver Parameter beim Magenkarzinom ist ungeklärt. Nach Zustimmung der Ethikkommission wurde 52 Patienten mit gesichertem Adenokarzinom des Magens präoperativ 200 mg Bromdeoxyuridin (BrdU) injiziert. Die Präparatentnahme erfolgte nach 5 - 7 Std. Die BrdU Inkorporation und der DNA Gehalt (BrdU/DNA assay) wurden durchflußzytometrisch gemessen. Folgende Parameter wurden bestimmt bzw. berechnet: Ploidie, S-Phase, BrdU Labelling Index (L. I.), Dauer der S-phase (Ts) und Tpot. Pathohistologisch wurde eine Referenzhistologie befundet und nach Laurén klassifiziert (intestinaler vs. nicht intestinaler Typ).

20 Tumore waren diploid, 32 Tumore aneuploid. Nach der Laurén Klassifikation gehörten 22 Adenokarzinome dem "intestinalen" Typ und 30 dem "nicht intestinalen" Typ an. Die Detection von BrdU war in 82 % (n = 43) der Fälle möglich, Ts und Tpot konnten in 71 % (n = 37) berechnet werden. Bei diploiden Karzinomen konnte BrdU in 75 % der Fälle nachgewiesen werden, die Berechnung von Tpot war in 55 % möglich. Der Median des BrdU LI war 16.1% (3.5 - 39.2 %), der Median von Ts war 12.5 Stunden (6 bis 80 Std.). Der Median von Tpot betrug 3.7 Tage (1.4 - 23.1 Tage). Nimmt man diesen Median als Grenze zwischen schnell und langsam proliferierenden Tumoren, waren 51% der Tumore schnell und 49 % langsam proliferierend.

LI BrdU, Ts und Tpot sind auch in dieser Untersuchung individuelle Parameter eines Karzinoms. Es fand sich keine Korrelation zu epidemiologischen, klinischen oder pathohistologischen Befunden. Ebenfalls fand sich keine Korrelation zur Ploidie und zur S-Phase der Tumore. Vor dem klinischen Einsatz von BrdU als prädiktivem Parameter muß die Sensitivität der Methodik erhöht werden.

Qualitätskontrolle und "Gute Labor Praxis"

Qualitätsbeurteilung der Immunphänotypisierung von Leukämien und Lymphomen

J. W. Gratama und J.C. Kluin-Nelemans für die
Dutch Study Group on Immunophenotyping od Hematological Malignancies (SIHON)

Ein Schema für die Qualitätsbeurteilung der Immunophänoptypisierung von Leukämien und Lymphomen darf nicht nur technische Aspekte der Analyse beinhalten, sondern auch die präanalytische (d.h. Auswahl der Reagenzien aufgrund einer vorläufigen klinischen Diagnose) sowie der postanalytischen Phase (d.h. Interpretation der Ergebnisse und des Arztberichts). Die *Dutch Cooperative Study Group on Immunophenotyping of Hematological Malignancies (SIHON)* wurde 1985 gegründet, um ein solches Schema für die Qualitätsbeurteilung aufzustellen. Seither wurden halbjährlich Sendungen verschickt, die aus tiefgekühlten Proben (im allg. mehr als 80% anomale Zellen) sowie einem ungefärbten Blutausstrich oder Cytospin bestanden, dem eine kurze klinische Beschreibung und eine vorläufige klinische Diagnose beigefügt waren. Die Teilnehmer wurden dazu aufgefordert, eine Immunophänotypisierung anhand ihrer eigenen Protokolle oder den durch SIHON formulierten Richtlinien (s.u.) durchzuführen, alle Antikörper-Resultate als % positive Zellen anzugeben (d.h. Anteil an der mononukleären Zellsuspension) und eine immunologische Diagnose dem Koordinierungslabor (Universitätskrankenhaus Leiden) zur Verfügung zu stellen. Nach der Datenauswertung durch das Koordinierungslabor wurden die Resultate bei halbjährlichen Plenarsitzungen präsentiert und diskutiert. Während dieser Sitzungen wurde Wert auf die angemessene Zusammensetzung der verwendeten Antikörper und eine geeignete Interpretation der Resultate gelegt.

Bis zum heutigen Tag wurden 16 Sendungen organisiert, die insgesamt 48 Proben enthielten. Die Analyse der Resultate ergab folgende Schlußfolgerungen:
-Die Marker mit den sich am häufigsten widersprechenden Ergebnissen war zytoplasmatisches CD22, TdT, CD11c, CD13, CD15, CD33, CD4 und CD7. Technische Probleme spielten die größte Rolle bei der Beurteilung von zytoplasmatischen CD22 und TdT. Widersprüchliche Ergebnisse für die myeloiden Marker CD13 und CD33 waren besonders häufig in ALL-Proben. Die aberrante Expression in diesen Fällen ist typischerweise mit einem schwachen Fluoreszenzsignal assoziiert, das die größte Quelle der Variablilität zwischen verschiedenen Labors darstellt. Das gleiche Argument gilt für die schwache Expression von CD4 und CD7 in vielen AML-Fällen.
-Die Qualität der immunologischen Diagnose war im allgemeinen sehr gut für die meisten Neoplasien reifer B-Zellen, normale ALL- und AML-Proben, mit mehr als 90% (fast) korrekter Diagnose. Ein häufiger Fehler, vor allem in den Anfangsjahren von SIHON war die Zuweisung von FAB-Klassifikationen M1-M6 auf der Grundlage immunologischer Ergebnisse. Nur die FAB-Klassifikation M0 und M7 kann mit Hilfe immunologischer Marker durchgeführt werden. Vor diesem Fehler wurde häufig in Plenarsitzungen gewarnt.
- Die Immundiagnose von T-Zell-Neoplasien war mit deutlichen Problemen behaftet (d.h. etwa 60% akzeptable Diagnose). Ein Hauptproblem war die falsche Interpretation des TdT-Immunfluoreszenzmusters oder, noch schlimmer, mangelnde Nachweisbarkeit von TdT überhaupt.
- Ungefähr 6% der immunologischen Diagnosen beruhten auf einem zu begrenzten Auswahl von Antikörpern, z. B. eine ALL-Diagnose ohne Bericht über die Nachweisbarkeit von CD34 und TdT.

Während der ersten zehn Jahre hat sich die Teilnehmerzahl bei SIHON von 12 auf 40 erhöht, wobei alle Laboratorien, die in den Niederlanden mit der Immunophänotypisierung von Leukämien und Lymphomen befaßt sind, beteiligt sind. Weitere Qualitätsverbesserungen sollen durch Konzentration auf die Tücken der Immundiagnose, wie oben zusammengefaßt, erreicht werden: mit Hilfe der halbjährlichen Begutachtung der Qualitätsbeurteilung und der themenorientierten Workshops.

Erfahrungen aus den Ringversuchen zur Qualitätssicherung der durchflußzytometrischen DNA-Messung.

Friedrich J. Otto, Ulrike Westhoff

Fachklinik Hornheide, Abteilung für Tumorforschung, 48157 Münster

In den letzten Jahren wurden insgesamt fünf Ringversuche zur Standardisierung und Qualitätssicherung der durchflußzytometrischen DNA-Messung durchgeführt. An den Versuchen nahmen bis zu 56 Labors teil. Die Teilnehmer wurden gebeten, die Proben aus ethanolfixierten tierischen und menschlichen Zellen nach ihren eigenen Methoden zu färben und zu messen. In den letzten zwei Versuchen wurden außerdem Standard-Färbeprotokolle erprobt, um die Heterogenität der Methoden zu verringern.

Bei allen Versuchen zeigten die Meßwerte und die aus den Histogrammen abgeleiteten Daten eine erhebliche Streuung. Die Meßgenauigkeit war in den Labors sehr unterschiedlich. Die höchste Meßgenauigkeit im Durchschnitt und die niedrigsten CV-Werte im einzelnen wurden mit HBO-Lampen-Geräten und DAPI-Färbung erzielt. Im Vergleich der aufeinanderfolgenden Ringversuche zeigte sich eine Tendenz zu steigender Meßgenauigkeit.

Durch die Anwendung von Standard-Färbeprotokollen wurde eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse erreicht. Das DAPI-Standardprotokoll erhöhte die Genauigkeit und Homogenität der Meßdaten und reduzierte die bei der Bestimmung der DNA-Indizes und S-Phasen-Anteile beobachteten Abweichungen. Das PI-Standardprotokoll ist noch verbesserungsbedürftig.

Im diesjährigen Versuch wurden zusätzlich gefärbte und fixierte Standardzellen eingesetzt, um die instrumentelle Genauigkeit und Stabilität zu kontrollieren. Die Ergebnisse zeigen, daß die Überwachung der instrumentellen Parameter ebenso wie die Standardisierung der Färbemethoden wirksame Maßnahmen darstellen, die Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern und zu sichern.

EUROPÄISCHES KONSENSUS PROTOKOLL ZUR DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN CHARAKTERISIERUNG DER THROMBOZYTENFUNKTION

G. Rothe für die European Working Group on Clinical Cell Analysis - Task Force on Platelet Analysis (J. Kappelmayer, R. Lenkei, G. Rothe, G. Schmitz)

Eine gesteigerte oder gestörte Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten spielt eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie von Thrombose und Hämostase sowie kardiovaskulären Erkrankungen. Neben qualitativen Veränderungen der Plättchenfunktion sind Veränderungen der Thrombopoese oder eine gesteigerte Elimination von Thrombozyten z. B. bei der autoimmunen Thrombozytopenie von großer klinischer Relevanz. Die Durchflußzytometrie wird zunehmend für die spezifische Charakterisierung von solchen phänotypischen Veränderungen an Thrombozyten eingesetzt, die ein Maß für zelluläre Aktivierung, die hämostatische Funktion oder die Reifung von Vorläuferzellen darstellen. Diese neuen Techniken erlauben die Untersuchung der in vitro Interaktion von Thrombozyten mit spezifischen Stimuli und deren Modifizierung während Thrombozyten-gerichteter Therapie sowie die Charakterisierung Thrombozyten-spezifischer Antikörper. In Folge der klinischen Einführung von Thrombopoietin wird auch die Überwachung der Reifung von Thrombozyten von zunehmender Bedeutung sein. Die zunehmende Komplexität dieser durchflußzytometrischen Techniken hat die Sensitivität und Spezifität dieser Assays erheblich gesteigert. Gleichzeitig macht ihre Anwendung durch eine zunehmend wachsende Zahl von Laboratorien eine technologische Standardisierung, die Erarbeitung von allgemeinen Testvorschriften und die Errichtung von externen Qualitätskontrollprogrammen notwendig.

Kürzlich starteten 16 Gruppen mit dem Tätigkeitsgebiet klinische Durchflußzytometrie aus 13 europäischen Ländern eine Initiative zur Erarbeitung des derzeitigen Konsensus über durchflußzytometrische Methoden im klinischen Laboratorium als Basis zukünftiger Qualitätssicherung und -kontrolle. Spezifische Protokolle sollen hierbei innerhalb von spezifischen Arbeitsausschüssen aus Mitgliedern der Gruppe und weiteren Wissenschaftlern aus den verschiedenen europäischen Ländern auf 6 Gebieten der technischen Standardisierung sowie 4 Feldern der klinischen Anwendung entwickelt werden.

In einer ersten aus einer Serie von Konsensuskonferenzen traf sich kürzlich ein Arbeitsausschuß zur Thrombozytenanalytik in Mailand, um ein Protokoll zur durchflußzytometrischen Immunphänotypisierung und Funktionsanalyse von Thrombozyten zu diskutieren. In diesem Protokoll werden spezifische Empfehlungen für die präanalytische Phase, Probenvorbereitung und Reagentien, die durchflußzytometrische Messung sowie die Datenanalyse aufbauend auf einer Beschreibung des derzeitigen Stands der durchflußzytometrischen Methodologie gegeben. Diese Empfehlungen sind ein Versuch, die Anwendung dieser neuen Techniken zu fördern sowie die Vergleichbarkeit zwischen Laboratorien zu steigern. Weiterhin sollte derartiger Konsensus in einem zweiten Schritt wertvoll sein für die Erarbeitung von Studienprotokollen mit dem Ziel der Bestätigung des klinischen Nutzens dieser Methoden für ihre verschiedenen Anwendungen.

Einsatz von elektronischen Cell Counter Analyser Systemen zur Qualitätskontrolle

5W-Regel : Wer hat was wann womit und warum gemacht? (GLP)

Schärfe System GmbH, Emil-Adolff-Straße 14, D-72760 Reutlingen

GLP- Gute Labor Praxis. In aller Munde, und dennoch bezeugen die vielen Fragen aus der Praxis, daß es nicht ganz so einfach ist. Ein Bereich, mit dem sich die GLP befaßt, ist das Innenleben der Laboratorien und dessen Handling. Hierzu gehören z.B. Materialien und Reagenzien, oder Geräte, die zur Gewinnung von Daten dienen.

Die im Labor gewonnenen Daten und Ergebnisse müssen „gleich und vergleichbar" sein. Voraussetzung hierfür ist, daß auch die Methoden gleich und vergleichbar sind.

Es wird veranschaulicht, welche Eigenschaften ein Cell Counter Analyser System mit sich bringen muß, um als GLP-konforme Methode in Frage zu kommen.

Daß „das Gleiche" nicht immer „dasselbe" ist, wird anhand von Beispielen aus der Praxis erläutert.

Externe Qualitätssicherung "Retikulozyten" (INSTAND e.V.) - Überblick nach 3 Jahren Erfahrung

Stefan Serke , Virchow-Klinikum der Humboldt-Universität zu Berlin, Abteilung Innere Medizin und Poliklinik, Hämatologie und Onkologie, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, FAX: + 49. 30. 45 05. 39 14

Die Bestimmung unreifer Erythrozyten, der Retikulozyten, stellt eine Routine-Methode der hämatologischen Labordiagnostik dar. Die Retikulozyten stellen in der Regel nur einen sehr kleinen Teil aller roten Blutkörperchen dar. Daher ist die mikroskopische Bestimmung dieser Retikulozyten aus Gründen der Zählstatistik wenig präzise und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist gering. Als Alternative zu der mikroskopischen Methode sind eine Reihe von durchflußzytometrischen Methoden in den letzten Jahren eingeführt worden. Diese Techniken basieren auf mit DNS bzw. RNS stöchiometrisch reagierenden Farbstoffen. Die Präzision und die Reproduzierbarkeit bei Anwendung einer jeden dieser Techniken ist exzellent, da regelhaft mehrere zehntausend Erythrozyten pro Messung erfaßt werden. Im Auftrag von INSTAND e.V. habe ich die Externe Qualitätssicherung für die Bestimmung der "Retikulozyten" mittels Mikroskopie und mittels Durchflußzytometrie organisiert. Zu vier Zeitpunkten wurden jeweils identische Proben für alle Methoden ausgesandt (1x: 1994; 2x: 1995; 1x: 1996). Die Bestimmungen der Teilnehmer der Mikroskopie lagen im Bereich erwarteter Werte. Bei Mittelwerten von 1,5% bis 3,5% betrug der Variationskoeffizient (VK) bei etwa 350 Teilnehmern ungefähr 40%.

Als besonders interessant und für die klinische Diagnostik relevant erscheinen mir die systematischen Unterschiede, welche sich für die einzelnen durchflußzytometrischen Methoden darstellten. Beispielsweise betrugen bei einer Aussendung (Oktober 1995) die Mittelwerte mit einer Methode 1,1% (VK 35%, Probe A) und 1,7% (VK 13%, Probe B), während mit einer anderen Methode die entsprechenden Werte 2,5% (VK 55%; Probe A) und 4,4% (VK 36%; Probe B) betrugen.

Meiner Meinung nach stellen die durchflußzytometrischen Methoden zur Bestimmung der Retikulozyten keinen wesentlichen Schritt in Richtung auf eine standardisierte Bestimmung der Retikulozyten dar.

Immunophänotypisierung und Populationsanalytik

Durchflußzytometrische Analyse des Lymphomzellimmunphänotyps mittels automatisierter Clusteranalyse

S. Barlage, G. Rothe, G. Schmitz
Institut für Klinische Chemie, Universität Regensburg, Deutschland

Die durchflußzytometrische Analyse hämatopoetischer Neoplasien hat sich zu einer wichtigen Methode im Rahmen der klinischen Routinediagnostik entwickelt. Die multiparametrische Analyse von Antigenkoexpressionsmustern und Antigendichten ermöglicht hierbei die Detektion und Charakterisierung selbst kleiner aberranter Zellpopulationen. Die Komplexität der Analytik verlangt jedoch eine Standardisierung sowohl der durchflußzytometrischen Methodik an sich, als auch die der nachfolgenden Datenanalyse. Hinsichtlich einer Standardisierung der Datenverarbeitung wurden daher die Möglichkeiten einer kommerziell erhältlichen Clustersoftware („Attractors", Becton Dickinson) für den Einsatz in der Datenanalyse von Dreifarbimmunphänotypisierungen aus Blut- und Knochenmarksproben getestet. 45 Patientenproben wurden hinsichtlich des Nachweises sowie einer weitergehenden Charakterisierung des Lymphomzellimmunphänotyps analysiert (B-CLL (23), Haarzelleukämie (7), Plasmozytom (5) Immunozytom/cc/cb-Lymphom/varia (10)). Hierzu wurden sämtliche Proben anhand eines einheitlichen Protokolles vorbereitet und gemessen. Jeweils 29 verschiedene Antikörperspezifitäten wurden in 3-Farbkombinationen mit der Vollblutprobe inkubiert, gefolgt von einer Lyse der Erythrozyten. Die Diagnose eines B-NHL wurde anhand der Analyse der Klonalität über einheitliche Expression eines Immunglobulinleichtkettentyps (kappa oder lambda) in Kombination mit einer genaueren Feststellung des Immunphänotyps (Expression von CD19, CD22, FMC7, CD23, CD5, CD103, CD25, CD11c, Oberflächenimmunglobulin) gestellt. Plasmozytomzellen wurden anhand der klonalen, cytoplasmatischen Leichtkettenexpression diagnostiziert. Die automatisierte Erkennung der Zellpopulationen wurde mit Hilfe vordefinierter Parameter-"Muster" in 2-Parameterdarstellungen von Scatter- und Fluoreszenzsignalen erreicht. Im Unterschied zu in ihrer Lage vorgegebenen Regionen in konventionellen Datenanalysetechniken erfolgt die Identifikation von Zellen hierbei anhand ihres Abstandes zu einem variablen Zentrum der Population, das wiederum in einer vorgegebenen Region gesucht wird. Weiterhin erfolgt die Zuordnung von Zellen konkurrierend nach Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zu mehreren voneinander unabhängig vorgegebenen Populationen. Die Abgrenzung von Subpopulationen wurde durch hierarchisch strukturierte Sub-"Cluster" erreicht. Hierdurch konnten sämtliche charakteristischen physiologischen und aberranten Phänotypen erfaßt, bzw. nicht-lymphatische Zellen von physiologischen und aberranten Lymphozytenclustern abgegrenzt werden. Die Größe der Populationen wird schließlich in einem als Spreadsheet vordefinierten Befundbogen gemittelt. Diese Art der Datenanalyse führt zu einer wesentlich verbesserten Standardisierung der Analytik, verbunden mit einer höheren Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen einzelnen Proben als auch verschiedenen Laboratorien. Die Definition patienten- und populationsspezifischer Cluster sollte zudem zu einer verbesserten Therapiekontrolle hinsichtlich des Nachweises residualer Zellen führen.

FACS-Analyse selektiv Haut-infiltrierender Blut-Zellen nach einem antigenen Stimulus in vivo

BÖHM I, BAUER R

Universitäts-Hautklinik Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25, D-53105 Bonn

Die Kontaktdermatitis, ein typisches Beispiel einer allergischen Spättypreaktion, entsteht durch komplexe Interaktionen von Epidermal- und aus dem Blut stammenden Haut-infiltrierenden Zellen (skin infiltrating cells cells = SIC). Immunkompetente Epidermalzellen und Antigen-präsentierende Zellen bewirken durch Freisetzung verschiedener Zytokine und Mediatoren ein selektives Einwandern Antigen-spezifischer T-Zellen und anderer Effektor-Zellen.
Um Einblick in die qualitative and quantitative Zusammensetzung der SIC zu bekommen, analysierten wir flow-zytometrisch die zellulären Bestandteile spongiotischer Vesikel positiver Routine-Epikutantestreaktionen und nicht-iatrogen entstandener Kontaktdermatitiden. Frisch gewonnene SIC wurden mit einem Panal mAbs in der Zweifarbtechnik angefärbt und die Ergebnisse mit denen des peripheren Blutes verglichen.
Unsere Ergebnisse zeigen, daß Lymphozyten den Hauptanteil der SIC bei der Kontaktdermatitis, nicht aber von Patch-Test-Reaktionen ausmachten. 70 - 86% der SIC aus Kontaktdermatitiden waren CD3+ CD4+, während nur 36% aus den Patch-Test-Reaktionen T-Helfer Zellen waren. CD4+ SIC konnten als Memory-Zellen mit der Markerkonstellation CD45RO+ CD25+ HLA-DR+ identifiziert werden. CD3+ CD8+ Zellen fanden sich in der Haut im gleichen Verhältnis wie im peripheren Blut. Monozyten ließen sich nur in Patch-Test- Reaktionen nachweisen. Sie zeichneten sich nicht durch eine spezielle Expression von Aktivierungsmarkern aus. Erstaunlicherweise fanden sich neutrophile Granulozyten zu 14 - 74% (durchschnittlich 49%) in der Vesikelflüssigkeit. Diese Zellen exprimierten zu 46% CD45RA auf der Oberfläche, während dieses Antigen nur bei 26% der peripheren Blutneutrophilen gefunden wurde. Schließlich konnten wir eosinophile Granulozyten im Vesikelinhalt nachweisen. Insgesamt waren die Eosinophilenzahlen im Hautinfiltrat nur gering im Vergleich zum peripheren Blut erhöht. Nur bei einem Fall fanden wir 5% Eosinophile im peripheren Blut, aber 27% in der Vesikelflüssigkeit.
Die quantitative und qualitativ Analyse von SIC erbrachte beim Vergleich von nicht-iatrogen enstandenen Kontaktdermatitiden und von Patch-Test-Reaktionen, 1) daß Lymphozyten in der Vesikelflüssigkeit der Kontaktdermatitis dominieren und 2) daß Patch-Test-Reaktionen zusätzlich Monozyten, Neutrophile und Eosinophile in annähernd gleicher prozentualer Zusammensetzung wie im peripheren Blut enthalten. Allerdings exprimierten SIC stärker als im peripheren Blut Aktivierungs- und Proliferationsmarker.

CD69, ein neuer Marker zur Bestimmung der Aktivierbarkeit von Lymphozyten bei HIV-Ak positiven Patienten und bei Patienten mit Chronischem Müdigkeits- und Immundefekt-Syndrom (CFIDS)?

Janßen M. N., Knechten H., Knickmann M., Ruback C., Hirzmann I. und Braun P.
PZB-Aachen, Blondelstraße 9, 52062 Aachen

CD69 (activation-inducer molecule, AIM) ist ein homodimeres Glykoprotein, das sich konstitutiv auf Thymozyten und Thrombozyten befindet und auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen und Neutrophilen exprimiert wird. Bedingt durch die Exprimierung auf Lymphozyten innerhalb von 60 Minuten nach Aktivierung, bietet sich CD69 als Antigen für die durchflußzytometrische Bestimmung der Aktivierbarkeit von Lymphozyten an.
Im Rahmen eines Forschungsprojektes wurde bei HIV-Ak+Patienten (n=78), Patienten mit CFIDS (n=37) und einem Normalkollektiv (n=49) anhand der CD69-Exprimierung untersucht, ob sich Unterschiede in der Aktivierbarkeit der Lymphozyten zeigen.
Das heparinisierte Vollblut der Probanden wurde innerhalb von 4 Stunden nach Abnahme mit 20 µg/ml Phytohaemagglutinin versetzt. Weiterhin wurden eine Negativkontrolle mit PBS durchgeführt. Beide Ansätze wurden für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (y1/y1/CD3, CD4/CD69/CD3 und CD8/CD69/CD3; FastImmune™ , Becton Dickinson) 15 Minuten gefärbt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mindestens 15 Minuten lysiert und mittels CellQuest im FACScan analysiert.
Grundsätzlich fand sich bei allen Patienten eine Aktivierung der untersuchten Zellpopulationen nach Mitogenzugabe ($P<0.001$). Bei den HIV-Ak+ Patienten konnte, im Vergleich zum Normalkollektiv, eine signifikante Minderaktivierbarkeit der Helfer-/Inducer-Zellen beobachtet werden. Bezogen auf das Normalkollektiv waren die gemessenen Relativwerte der CD69+ Suppressor- / Zytotoxischen Zellen in der HIV-Ak+ Gruppe sowohl vor, als auch nach Mitogenzugabe niedriger. Das Kollektiv der CFIDS-Patienten unterschied sich nicht signifikant von der Gruppe der Normalprobanden. Tendentiell war aber auch hier eine Verminderung der Akivierbarkeit in beiden Zellpopulationen zu beobachten.
Im weiteren Verlauf unseres Forschungsprojektes werden die verschiedenen Stadien einer HIV-Infektion auf die Aktivierbarkeit der CD4+ und CD8+ Lymphozyten hin untersucht.

BLOCKIERUNG DER BINDUNG DES HIV-1 HÜLLGLYKOPROTEINS (GP120) AN CD4+ T LYMPHOZYTEN DURCH ANTI-HIV MONOKLONALE ANTIKÖRPER

Kröpelin, M., Süsal, C., Daniel, V., und Opelz, G. Universität Heidelberg, Institut für Immunologie, 69120 Heidelberg, Deutschland

Ziele: HI-Viren, auf infizierten Zellen exprimiertes gp120 oder freies Glykoprotein binden hauptsächlich an CD4+ T Zellen und führen zu Fehlfunktion und/oder Reduktion der CD4 Zahlen. Es war unser Ziel, die CD4-Bindungsstellen (BS) des Hüllproteins zu bestimmen, und die gp120-CD4 Interaktion durch monoklonale Anti-gp120 Antikörper (MAbs) zu blockieren.

Methoden: CD4+ Lymphozyten des peripheren Blutes gesunder Volontäre wurden nach Ficoll-Hypaque Gradienten Zentrifugation und Markierung mit CD19-FITC (B-Zellen), CD16-PE (NK Zellen) und Leu-2a-PE (CD8+ Zellen) in einem FACStar Plus sortiert. Negativ selektierte CD4+ T Zellen wurden in Abwesenheit oder Gegenwart der Anti-CD4 MAbs Leu-3a, OKT4a oder IOT4a, oder des humanen MAb F105 und/oder des Maus MAb 87-135/9 (Niedrig, M. u.a.) inkubiert. Die rgp120-FITC Bindung an CD4+ Zellen wurde durch FACScan (BD) Analyse bestimmt.

Ergebnisse: An CD4+ T Zellen gebundenes rgp120-FITC hinderte Leu-3a und OKT4a daran zu binden, hingegen wurde die IOT4a-Bindung weniger beeinträchtigt. Rgp120 hat 2 Hauptkontaktstellen für CD4, die durch Anti-gp120 MAbs blockiert werden konnten. Im Gegensatz zum MAb F105, von dem bekannt ist, daß er an eine diskontinuierliche Stelle bindet, der die konstanten Regionen 4 und 5 des viralen gp120 einschließt, erkannte der MAb 87-135/9 ein gp120 Epitop in der konstanten Region 1 (C1). 87-135/9 hinderte rgp120 daran, an CD4+ Zellen zu binden; diese Aktivität war dosisabhängig und synergistisch. ELISA-Tests zeigten, daß sich die gp120BS von 87-135/9 auf dem gp120 Peptid HEDIISLWDQSLK (Aminosäuren 105-117) befindet. Im Vergleich zu F105 betrug die Blockierungskapazität 50%.

Schlußfolgerungen: Eine passive Immuntherapie unter dem Einsatz von Anti-gp120 CD4BS MAbs oder eines bispezifischen Antikörpers könnte Vorteile für HIV/AIDS Patienten haben, und/oder eine antivirale Behandlung mit Medikamenten unterstützen.

Korrespondenz an: marianne.kroepelin@krzmail.krz.uni-heidelberg.de

Durchflußzytometrische Analyse Antikörper-sezernierender Zellen

R. A. Manz[1] , A.Thiel[1] , S. Miltenyi[2] and A. Radbruch[1], Institut für Genetik, Universität zu Köln, 50923 Köln und Miltenyi Biotec GmbH, 51429 Bergisch Gladbach.

Plasmazellen sind die Effektorzellen der humoralen Immunantwort. Wegen ihrer geringen Frequenz und dem weitgehenden Fehlen von Oberflächenmarkern stammt jedoch der größte Teil unseres Wissens über diese Zellen aus Versuchen mit Zellinien. Wir haben eine Methode entwickelt, um lebende Zellen, die ein bestimmtes Produkt sezernieren, mit Antikörpern gegen dieses Produkt zu färben und damit der Durchflußzytometrie zugänglich zu machen (Manz et. al., PNAS 92, 1921, 1995). Hier beschreiben wir den Nutzen dieser Methode zur Isolierung und Analyse von Antikörper-sezernierenden Zellen aus Mäusen in einer spezifischen Immunantwort gegen Ovalbumin. In der Milz und im Knochenmark sind weniger als 0.1 % Ovalbumin spezifische Plasmazellen enthalten. Nach der Anreicherung der Antikörper-sezernierenden Zellen wurde der Phänotyp der Ovalbuminspezifischen Plasmazellen im zeitlichen Verlauf nach einer Immunisierung bestimmt.

Ein verbesserter durchflußzytometrischer Test zur Bestimmung des Anteils „retikulierter" Thrombozyten in Vollblut

G.B. Matic, G. Rothe, G. Schmitz

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität, Regensburg

„Retikulierte" Thrombozyten enthalten typischerweise Reste von Nukleinsäuren (hauptsächlich RNA). Es wurde gezeigt, daß „retikulierte" Thrombozyten die jüngsten zirkulierenden Thrombozyten darstellen. Zwei Fluoreszenzfarbstoffe werden gegenwärtig in der Durchflußzytometrie zur Färbung von „retikulierten" Thrombozyten verwendet: Thiazol Orange und Auramin Orange färben neben DNA auch RNA. An Nukleinsäuren gebunden vervielfacht sich die Fluoreszenz beider Farbstoffe.
Die Farbstoffe permeieren intakte Zellmembranen und unfixierte Thrombozyten reichern sie kontinuierlich an. Wenn Thrombozyten vor der Färbung mit (Para-) Formaldehyd fixiert werden, kann eine halbwegs stabile Sättigung nach ein- bis zweistündiger Inkubation erreicht werden. In bisherigen Veröffentlichungen wird hauptsächlich plättchenreiches Plasma zur Messung verwendet. Die beschriebenen Methoden variieren hinsichtlich der Inkubationszeiten, Definition des Schwellenwertes zur Unterscheidung RNA-negativer und positiver Plättchen, der Verwendung fixierter oder unfixierter Zellen und der Konzentration der Farbstoffe.
Die Verwendung plättchenreichen Plasmas ist arbeitsaufwendig und Selektion oder Verlust von Subpopulationen ist nicht sicher auszuschließen. Die publizierten Inkubationszeiten bewegen sich zwischen 3 Minuten bei unfixierten Thrombozyten und 2 Stunden bei fixierten Zellen. Die kurze Inkubationszeit erlaubt, wenn manuell gearbeitet wird, keine zeitgenaue Probenzufuhr, wogegen die lange Inkubationszeit sehr zeitaufwendig ist. Wir haben eine Methode entwickelt, die Thrombozyten unfixiert und schnell zu färben, und die Färbung dann durch eine Formaldehydfixation zu stabilisieren. Verdünntes Vollblut wurde mit Thiazol-Orange und einem Phycoerythrin-markierten Anti-Thrombozytenglykoprotein-Antikörper inkubiert. Die Inkubationszeit in Gegenwart von Thiazol Orange betrug 15 Minuten. Nach der Fixation war die Fluoreszenz für mindestens zwei Stunden stabil.
Mit der Verwendung von Vollblut wurden alle Nachteile des plättchenreichen Plasmas vermieden. Der Schwellenwert konnte unter Zuhilfenahme nicht-gefärbter Proben ermittelt werden, und die Normalwerte bewegten sich im Bereich zwischen 10 und 15% „retikulierter" Thrombozyten. Wenn bei einer Gesamtüberlebenszeit von 10 Tagen eine Überlebenszeit „retikulierter" Thrombozyten von 1-2 Tagen zugrundegelegt wird, sind diese Werte plausibel und erlauben auch die Diagnose verminderter „retikulierter" Thrombozyten.

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUM LYMPHOZYTEN-HOMING BEI ENTZÜNDLICHEN RHEUMATISCHEN ERKRANKUNGEN UNTER VERWENDUNG VON FLUSS-ZYTOMETRIE UND BILDANALYSE

J. Neumüller (1), J. Menzel (2), A. Dunky (3)
(1) Ludwig Boltzmann Institut für Rheumatologie and Balneologie, Wien, (2) Institut für Immunologie, Universität Wien, (3) 5. Abteilung für Innere Medizin, Wilhelminenspital, Wien, Österreich

Die Pathologie der Arthritis psoriatica (AP) ist durch Veränderungen der synovialen Mikrovaskulatur charakterisiert. Bei diesem Prozeß binden Entzündungszellen an Endothelzellen (EZ) der postkapillaren Venulen der synovialen Subintima.
Vier Punkte waren für diese Studie ausschlaggebend: 1. Die Untersuchung des Phänotyps der Lymphozyten (LZ) von AP-Patienten mittels Fluß-Zytometrie (FC) unter besonderer Berücksichtigung von Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen. 2. Untersuchungen über die Adhäsion von LZ von AP-Patienten an ruhende oder an (mit Thrombin, IFN-γ oder LPS) aktivierte Umbilicalvenen-EZ (HUVEC) , wobei das Verhältnis Feulgen-gefärbter adhärierender LZ-Zellkerne zu denen von HUVEC bildanalytisch erfaßt wurde. 3. Die Bestimmung der Synthese von IL-6 und IL-8 in den Überständen der cokultivierten Zellen 24 Std. nach dem Inokulum mittels Immunfluoreszenz und quantitativ auf "Einzelzellniveau" durch FC sowie in den Überständen der Kulturen mit kommerziellen ELISA-Tests. 4. Die Frage, ob Zelladhäsion und Zytokinproduktion durch monoklonale Antikörper (MAK) gegen LZ- oder EZ-spezifische MAK gehemmt werden können.

Bei AP-Patienten trat gegenüber Kontrollpersonen an $CD3^+$ LZ eine erhöhte Oberflächenexpression von CD11a, b und c und CD44, jedoch eine verringerte Oberflächenexpression von CD49d/CD29, CD49e/CD29 und zellgebundenem Fibronectin (FN) auf. Die Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR waren bei AP-Patienten leicht erhöht. AP-Patienten zeigten eine allgemeine Erhöhung der Zelladhäsion, die nach IFN-γ Stimulation durch MAK gegen CD11a und CD18 blockiert, durch MAK gegen CD54 verringert, durch Behandlung der HUVEC mit MAK gegen FN, CD62E und CD106 aber verstärkt war. Bei AP-Patienten trat infolge des Zellkontaktes zwischen LZ und HUVEC eine höhere IL-6 und IL-8 Produktion auf. Dieser Effekt war zwar auch bei ruhenden HUVEC nachweisbar, wurde aber durch deren Aktivierung vergrößert. IL-6 wurde hauptsächlich von HUVEC aber auch in geringerer Quantität von LZ synthetisiert, IL-8 hingegen nur von HUVEC, wobei parallel zur Synthese von IL-6 nach Inkubation mit LZ- oder EZ- spezifischen MAK Veränderungen der Zelladhäsion auftraten.
Diese Experimente zeigen, daß bei AP-Patienten der Haupt-Adhäsionsweg durch die Interaktion von CD11a/CD18 (auf EZ) mit dem CD54 (auf LZ) zustandekommt und eine Synthese proinflammatorischer Zytokine zur Folge hat. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß einige der pathologischen Veränderungen der synovialen Mikrovaskulatur bei AP-Patienten durch Veränderungen der Homing-Prozesse entstehen könnten.

§Institut für Genetik, Universität Köln, Deutschland, #Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland.

Nachweis von IFN-γ und IL-10 auf der Oberfläche sezernierender Zellen mittels magnetofluoreszenter Liposomen: spezifische Oberflächenmarker für Zytokinproduktion.

A. Scheffold§, M. Assenmacher§, J. Schmitz#, S. Miltenyi# and A. Radbruch§

...Ein wichtiger Teil der regulatorischen T Zellfunktionen wird durch spezifische Zytokine vermittelt. Trotz der großen klinischen Relevanz der von T Zellen ausgeprägten Zytokinmuster stand bislang kein Oberflächenmarker zur Verfügung, der die Identifizierung von Subpopulationen von Zellen ermöglicht, die bestimmte Zytokine produzieren. Die Verwendung magnetofluoreszenter Liposomen machte den Nachweis von IFN-γ und IL-10 auf der Oberfläche aktivierter, menschlicher und muriner T Zellblasten, sowie menschlichen und murinen Zellinien, die mit der entsprechenden Zytokin-cDNA transfiziert wurden, möglich. Die Zytokine werden nur in sehr geringen Mengen auf der Oberfläche exprimiert und sind mittels konventioneller Immunfluoreszenz nahezu nicht nachzuweisen. Die Oberflächenexpression ist direkt mit der Produktion/Sekretion der Zytokine korreliert. T Zellen, die aufgrund ihrer Oberflächen-IFN-γ-Expression aus einer gemischten TH1/Th2 Kultur isoliert wurden, sezernierten in den 24 Stunden nach Sortierung nahezu das gesamte im Überstand nachweisbare IFN-γ aber nur sehr geringe Mengen IL-4 und IL-5. Zudem läßt sich in allen Zellen, die positiv auf der Oberflächen sind, das entsprechende Zytokin auch intrazellulär nachweisen. Die Rezeptorbindungsstellen der Oberflächen-Zytokine sind nicht besetzt und die bekannten Zytokinrezeptoren sind nicht an der Oberflächen-Verankerung beteiligt.

Immunologische Veränderungen im Verlauf von Herz- und Gefäßoperationen bei Kindern: Der Einfluß der Herz-Lungen-Maschine (HLM)

Tárnok A., Hambsch J., Kinzel P., Borte P., Sack U., Schneider P.
Klinik für Kinderkardiologie, Herzzentrum Leipzig GmbH - Universitätsklinik - Russenstr. 19, 04275 Leipzig, Deutschland

Kinder, an denen eine Operation mit der HLM vorgenommen wurde, können postoperative ein *„capillary-leak-syndrome"* (*CLS*) entwickeln. Kinder nach Operationen ohne HLM zeigen ähnliche aber weniger ausgeprägte Veränderungen. In dieser Studie sollte bestimmt werden, ob spezifische immunologische Veränderungen bei mit HLM operierten Kindern vorliegen. Dazu wurden Immunphänotypisierung an 10 Kindern mit und 10 ohne HLM Operation durchgeführt. Es wurden prä-, intra- und postoperativ Blutproben entnommen und durchflußzytometrisch analysiert.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen zwischen Operationen mit und ohne HLM keine signifikanten Unterschiede in der Populationskinetik von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Gleichfalls ähnlich waren die Veränderungen der T- und B-Lymphozyten sowie der natürlichen Killerzellen. Als deutliche Unterschiede erwiesen sich aber während der HLM-Zeit 1. die massive Zunahme des Anteils naiver im Verhältnis zu memory T-Zellen um das 2-3-fache ($CD45RA^+/CD45RO^+$), 2. der Abfall des Verhältnisses von Helfer zu zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+4^+/CD3^+8^+$) um 30%, sowie 3. eine Abnahme der HLA-DR Expression auf Monozyten um 90%. Diese Abweichungen deuten auf einen modulierenden immunsuppressiven Einfluß der HLM hin. Der unmittelbare Einfluß dieser Veränderungen auf das *CLS* läßt sich allerdings aus den bisherigen Daten nicht direkt ableiten.

Kinder mit HLM Operation wurden in eine Gruppe ohne und eine mit postoperative Komplikationen gruppiert. Postoperative Komplikationen sind u.a. Ödematisierung und Perikarderguß. Die Kinder mit Komplikationen hatten präoperativ erhöhte CD4/CD8 und CD45RA/CD45RO Verhältniswerte. Bei ihnen nahm während der Operation das CD4/CD8 Verhältnis deutlich ab ($p<0,05$), während sich das CD45RA/CD45RO Verhältnis nicht signifikant änderte. Dagegen nahm dieser Wert bei der Komplikationsfreien Gruppe zu ($p<0,005$) und war das CD4/CD8 Verhältnis nicht signifikant verändert. Die bisherigen Ergebnisse deuten auf präoperative immunologische Unterschiede zwischen beiden Gruppen hin und sind möglicherweise als prognostische Parameter von Bedeutung.

Durchflußzytometrische Messung von Proteinwechselwirkung mit fluoreszierenden Mikropartikeln

Támok A[1], Nöhrenberg U[1], Schulzpacher S[2], Vollmer HJ[2], Rathjen F[2]
[1]Klinik für Kinderkardiologie, Herzzentrum Leipzig GmbH - Universitätsklinik - Russenstr. 19, 04275 Leipzig, [2] Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch

Neuronale Adhäsionsmoleküle, die während der Embryonalentwicklung exprimiert werden sind essentiell für die korrekte Wegfindung des Axons zu ihrem Zielorgan und für neuronale Verschaltung. Die Kenntnis der Wechselwirkung dieser Moleküle ist wichtig für das Verständnis ihrer Funktion im Organismus. Adhäsionsmoleküle können können 1. mit sich selber (homophil) oder 2. mit anderen Molekülen (heterophil) adhärieren und damit das Axon über definierte Wege durch das Gewebe leiten.

Wir haben für die Bestimmung der Wechselwirkung ein einfaches und zuverlässiges Verfahren am Durchflußzytometer mit fluoreszierenden Mikropartikel (Beads) eingesetzt und verfeinert. Dieses Verfahren gestattet neben der Feststellung homo- oder heterophil Interaktion auch eine Abschätzung der Bindungsstärke zwischen den Molekülen. Mit Hilfe von Antikörpern gegen Domänen der Moleküle oder mit molekularbiologisch erzeugten Fragmenten kann eine Charakterisierung der Bindungsbereiche erfolgen.

Es wurden neuronale Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie bzw. der Tenascin-Familie, aus Hühnerhirn auf ihre Adhäsionseigenschaften untersucht. Immunaffinitätsgereinigte Moleküle wurden an fluoreszierende Mikropartike (Covaspheres oder Dynabeads, Duke Sci.Corp.; Durchmesser=0,5µm, CV der Fluoreszenz < 5%) kovalent bzw. nicht-kovalent gekoppelt. Für die Untersuchung der heterophilen Interaktion wurden verschiedene Moleküle jeweils an Beads mit unterschiedlicher Fluoreszenzfarbe (blau, rot oder grün) gekoppelt. Die Messungen erfolgten am Durchflußzytometer (EPICS ELITE, Zellsorter; FACScalibur, Durchflußzytometer). Aus den gemessenen Partikelzahlen wurde die entsprechende Anzahl Beads errechnet. Aus diesen Werten wurde der Prozentsatz aggregierter Beads, sowie die mittlere Aggregatgröße bestimmt.

Homophile Interaktion wurde u.a. bei NgCAM, NCAM und NrCAM gefunden, wobei die Aggregation NgCAM>NrCAM>NCAM war (*Neuron*, 11: 1113, 1993). Heterophile Interaktion konnte in den folgenden Kombinationen festgestellt werden: NrCAM/F11, Tenascin-R/F11 (*Neuron* 10: 711,1993). Die Nähere Untersuchung der Bindungsdomäne von Tenascin-R mit F11 mit Fragmenten von Tenascin-R ergab, daß die 3. aus 8 Fibronektin III Domänen des Moleküls für die Adhäsion verantwortlich ist (*J Cell Biol*, 130:473, 1995). Die an Mikropartikeln festgestellten Bindungseigenschaften konnten in Zellkulturmodellen bestätigt werden. Unsere Untersuchungen zeigen, daß die durchflußzytometrische Analyse der Adhäsion fluoreszierender Mikropartikel ein einfach handhabbares und zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung von Proteininteraktionen ist.

Durchflußzytometrische Charakterisierung humaner Trophoblastzellen nach Isolation aus frischem Plazentagewebe

Thieme B., Koop F., Harbeck N., Kolben M., *Ugele B., Schneider KTM., Graeff H. und Schmitt M. Frauenklinik der Technischen Universität München, *1. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Proteolysefaktoren z.B uPA,uPAR, MMP und deren Inhibitoren spielen bei der physiologischen und der pathologischen Trophoblastzellinvasion in die Uteruswand eine wichtige Rolle: *Ziol et al.(1992); Kolben et al.(1994); Librach et al.(1994); Cross et al., Science (1994).* ***Fragestellung:*** Ist es möglich, Trophoblastzellen der Plazenta zu isolieren, auf Einzelzellebene durchflußzytometrisch zu untersuchen und so Erkenntnisse über Proteolysesysteme und Regulationsmechanismen bei der Trophoblastzellinvasion in die Uteruswand zu verschiedenen Schwangerschaftszeitpunkten und bei Schwangerschaften mit pathologischer Trophoblastzellinvasion zu gewinnen ? ***Methode:*** Frisches Plazentagewebe wurde unmittelbar nach der Geburt präpariert und mit Scheren zerkleinert, die Zellverbände enzymatisch (DNase und Trypsin) aufgelöst und die resultierende Zellsuspension über einen Percollgradienten getrennt (modifiziert nach *Kliman 1986*). Die die Trophoblastzellen enthaltenden Zell-Banden wurden abgenommen, die Zellen mehrfach gewaschen und mit 1% Paraformaldehyd fixiert. Nach der Reaktion mit verschiedenen Antikörpern wurden sie durchflußzytometrisch (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. ***Ergebnisse:*** Trophoblastzellen reagieren spezifisch mit Antikörpern gegen CK 8,18 (Medac, Hamburg), ß HCG und hPL (Dako, Hamburg). Die wenigen, die Trophoblastzell-, population verunreinigenden Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD3, CD15 (Dako), CD45 (Caltag, San Franzisko) und einem Fibroblasten-Antikörper (Sigma, München) identifiziert. Mehrfarben-Fluoreszenz-Messungen bestätigten, daß Trophoblastzellen in einer Reinheit von über 95 % aus nativem Plazentagewebe gewonnen werden können. Isolierte unfixierte Trophoblastzellen können bis zur Ausbildung von Syncytien in Kurzzeitkultur von 2 bis 3 Tagen genommen werden, damit Oberflächenantigene, die bei der Trypsinbehandlung zerstört werden, wieder auf der Zelloberfläche erscheinen. ***Schlußfolgerung:*** Die hier beschriebene Methode erlaubt quantitative Untersuchungen an frisch isolierten oder kultivierten Trophoblastzellen auf Einzelzellebene mittels Durchflußzytometrie. Zur Zeit werden Trophoblastzellen aus Plazentagewebe normaler Schwangerschaften des 1. Schwangerschaftsdrittels und zum Geburtstermin und aus Plazentagewebe von Schwangerschaften mit Störung der Trophoblastinvasion miteinander verglichen und auf ihren Gehalt an Proteolysefaktoren untersucht. Dies soll dazu beitragen, ein tieferes Verständnis der grundlegenden Vorgänge bei physiologischer und pathologischer Trophoblastzellinvasion zu gewinnen.

Molekulare Charakterisierung von Plättchenfunktionsstörungen am Beispiel eines Patienten mit verminderter Expression von CD36 auf Thrombozyten und erhöhter Glykoprotein Ib-IX Expression.

A. Zwick, E. Orsó, J. Stöhr, E. Ajzner, S. Barlage, W. Drobnik, G. Rothe, C. Aslanidis and G. Schmitz

Institut für Klinische Chemie and Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität Regensburg,
D-93042 Regensburg

Hereditäre Thrombozytopathien wie z. B. das Bernard-Soulier-Syndrom oder die Glanzmann-Thrombasthenie sind häufige Ursachen hämorrhagischer Diathesen. Eine fehlende Glykoprotein-Expression, die Expression eines funktionell defekten Glykoproteins und ein funktioneller Defekt des Liganden sind verschiedene Erscheinungsformen dieser Erkrankungen. Aus diesen Gründen erfaßt die durchflußzytometrische Analyse der konstitutiven Expression von Glykoproteinen (GpIb, IIb/IIIa) nur einen Teil dieser Defekte. Eine wesentliche Verbesserung stellt hier die funktionelle Analyse von Thrombozyten über die Veränderung der Expressionsdichten von Glykoproteinen sowie die Bindung der endogenen Liganden Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor nach in vitro Stimulation von Vollblut z. B. mit ADP oder einem Thrombin-Rezeptor spezifischen Peptid (TRAP-6) dar. Der kürzlich wenig auffällige durchflußzytometrische Untersuchungsbefund eines Patienten mit manifester hämorrhagischer Diathese zeigte jedoch, daß auch das optimierte Testsystem Defekte der hämostatischen Funktion von Thrombozyten nur inkomplett erfaßt.
Der von uns betreute Patient zeigt klinisch eine lebenslang bestehende milde hämorrhagische Diathese, die mit einer verlängerten Blutungszeit, Thrombozytopenie, leicht vergrößertem mittleren Plättchenvolumen und einer gestörten Thrombozytenaggregation nach Zugabe von Kollagen einhergeht. Bei den üblichen gerinnungsphysiologischen Untersuchungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollpatienten.
Die erweiterten durchflußzytometrischen Analysen erbrachten eine stark verminderte (20%) Expression von CD36 (GpIV), dem Thrombospondinrezeptor, auf Thrombozyten und Monozyten in Kombination mit erhöhter Expression von GpIX und GpIb, als Teil des vWF-Rezeptors.
Im Rahmen der weiteren Charakterisierung dieser gestörten Glykoprotein-Expression mittels molekularbiologischer Methoden konnte die Existenz multipler CD36 mRNA Splice Varianten zusätzlich zur normalen CD36 Form nachgewiesen werden.
Schlußfolgernd ergibt sich aus diesen Analysen, daß eine veränderte Oberflächenexpression von Glykoproteinen nicht nur auf genetische Mutationen sondern auch auf gestörte mRNA-Reifung zurückzuführen sein kann bleiben. Zum zweiten werden bei der ausschließlichen Betrachtung der Thrombozytenaggregation bezüglich Fibrinogenbindung wichtige endotheliale Adhäsionsprozesse z.B. zwischen CD36 und Kollagen nicht erfaßt.

Bildanalyse und Zelltopologie

Morphometric analysis of AgNOR proteins for cell doubling time evaluation in tumor pathology

Massimo Derenzini

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Bologna, Italy

In the past few years a great effort has been made by pathologists in order to obtain a better biological characterization of cancer lesions. Particular attention has been paid to precisely define cell kinetics of human tumors. Indeed, the growth rate of a cancer mass has an important effect on the patient clinical outcome. The tumor growth rate is conditioned by the number of proliferating cells and the rapidity of their proliferation. The former variable can be evaluated by using the following methods: Ki67/MIB1 immunostaining, [^{3}H]-thymidine or bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation, and DNA flow cytometry. The rapidity of cell proliferation can be evaluated by measuring the tumor potential doubling time by *in vivo* BrdU incorporation followed by DNA flow cytometry, or by the quantitative analysis of AgNOR proteins. The AgNOR protein parameter has been recently introduced in tumor pathology for the evaluation of the rapidity of cell proliferation. The AgNOR proteins, which are located in the nucleolus during interphase, are selectively stained by silver in routinely processed cyto-histological samples and precisely quantified by image analysis. Nucleolin and protein B 23 are the main AgNOR proteins. They are involved in ribosomal biogenesis. In cells stimulated to proliferate the AgNOR protein quantity progressively increases from the G1-phase, reaching the maximum value at the end of the S-phase of the cell cycle. Therefore, it is not surprising that the AgNOR protein quantity is also related to the number of cycling cells. On the other hand, the importance of the AgNOR protein parameter for cell kinetics evaluation is due to the fact that, in continuously proliferating cells, the AgNOR protein quantity is strictly related to the rapidity of cell proliferation. The evidence of this relationship comes from the following studies. 1) Using *in vitro* cultured human cancer cell lines characterized by different doubling times (DT), it was shown that differences of only 4 hours in the DT were enough to determine significative variations of the AgNOR protein amount (greater the AgNOR protein quantity, faster the cell proliferation); 2) the DT of 24 human carcinoma xenografts growing in nude mice was significantly related to the AgNOR protein quantity ($r=0.903$; $p<0.001$); and 3) the DT of 18 human hepatocellular carcinoma nodules evaluated by measuring the volume variations over a fixed period of time by "real time" ultrasonography was inversely related to the AgNOR protein quantity measured in liver biopsies at the time of diagnosis, ($r=0.68$M $p<0.001$).

A significant correlation has been found between AgNOR protein expression of tumor lesions and patient survival. In many cancers the AgNOR protein variable showed an independent predictive value when entered in multivariate analysis together with the well-established prognostic indexes commonly considered for each type of cancer.

Digitale Fluoreszenzmikroskopie: Konventionell und Konfokal

Peter J.S. Hutzler, GSF - Forschungszentrum, Oberschleißheim

Zur quantitativen Erfassung von Fluoreszenzbilddaten stehen grundsätzlich zwei Verfahren zur Wahl, wobei die Entscheidung wesentlich vom mikroskopischen Präparat, insbesondere dessen Dicke, abhängt.

Ist ein Präparat so dünn, daß mit dem gewählten Objektiv alle wesentlichen Informationen gleichzeitig scharf dargestellt werden können, dann ist die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie mit integrierender, evtl. gekühlter CCD-Kamera zur Bilderfassung vorteilhaft. Der Einsatz einer solchen Kamera hoher Empfindlichkeit mit geringem Rauschen erlaubt selbst die Erfassung sehr lichtschwacher Signale, die durch das Okular für das Auge kaum mehr wahrnehmbar sind. Bei Verwendung einer monochromen Kamera mit Empfindlichkeit von UV bis Infrarot ist die Anzahl der trennbaren Fluoreszenzkanäle nur noch ein Problem der Fluorochrome und der Anregungs- / Emissionsfiltersätze.

An dicken Präparaten, bei denen die relevanten Informationen nicht mit einer Fokuseinstellung scharf abgebildet werden können, zeigt die konfokale Laser Scanning Mikroskopie ihre Stärke. Die konfokale Filterung unterdrückt Hintergrundlicht von 'out of Focus' Ebenen und erlaubt somit eine sequentielle Erfassung von Präparatebenen unterschiedlicher Tiefe als 'optische Schnittbilder'. Aus einer Sequenz solcher optischer Schnittbilder lassen sich Bilder erweiterter optischer Tiefenschärfe errechnen, aber auch Stereobildpaare zur räumlichen Präsentation, sowie Sequenzen von Richtungsprojektionen zur räumlichen Animation mikroskopischer Objekte.

Die Vor- und Nachteile der beiden Verfahren zur digitalen Fluoreszenzmikroskopie werden an biomedizinischen Beispielen erläutert.

Mikroskopiesteuerung, Bildaufnahme und -visualisierung per Netzwerk zur "online" Telemikroskopie über weite Distanzen

Matthias Nagorni, Joachim Bradl, Bernhard Schneider, Michael Hausmann, Christoph Cremer

Institut für Angewandte Physik, Univeristät Heidelberg, Albert-Überle-Str. 3-5, D-69120 Heidelberg

Die Bildaufnahme mit digitalen CCD-Kameras, die Langzeitintegration ermöglichen (Fa. Kappa, Gleichen, Germany), wurde unter dem Betriebssystem Linux für PC's für die 3D-Aufnahme von Zellkernen und die 2D-Aufnahme von Metaphaseplatten in der Fluoreszenzmikroskopie realisiert. Da die Kamera direkt das analoge Bildsignal digitalisiert, ist kein Framegrabber mehr notwendig. Die Bilddaten werden mit einer ISA-Bus Karte transferiert und unter X-Windows dargestellt. Mit der bisher entwickelten Software können Bilder visualisiert, analysiert und auf Festplatte gespeichert werden. Alle notwendigen Programme zur Initialisierung und Bedienung der Kamera existieren als Einzelroutinen. Damit kann die Automatisierung zur Aufnahme ganzer Bildsequenzen leicht erreicht werden, beispielsweise durch ein "Unix Shell Script". Durch das X-Windows System können einzelne Bilder auch auf anderen Workstations innerhalb eines Netzwerkes dargestellt werden, die dieselbe graphische Darstellung nutzen. Dies wurde via Internet getestet. Als Beispiel für die Telemikroskopie über weite Entfernungen diente die Strecke Braunschweig-Heidelberg. Andere Möglichkeiten liegen in der Verwendung von ISDN oder einem Modem mit z.B. einem PPP-Protokol. Damit wird es möglich, die gesamte Bildaufnahme von einer entfernten Workstation durchzuführen, sofern - wie bei dem hier genutzten Aufbau - das Mikroskop über den Bildaufnahme Computer gesteuert wird. Dies dürfte beispielsweise bei den neuen Geräten von Zeiss (Axiophot) oder Leica (DM RB) möglich sein.

Axialtomographische Mikroskopie zur hochauflösenden Analyse der Interphase-Genomorganisation

B.Rinke[1], P.Edelmann[2], J.Bradl[1], A.Esa[1], B.Schneider[1], M.Hausmann[1], C.Cremer[1,2]
[1] Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg
[2] Interdisziplinäres Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen (IWR), Universität Heidelberg

Hochauflösende mikroskopische Verfahren in Verbindung mit digitaler Bildanalyse werden es ermöglichen, Hypothesen und Modelle zu testen, in wie weit die Aktivität/Inaktivität von Genen korreliert mit deren räumlicher Anordnung zu anderen DNA-Abschnitten in einem Chromosomenterritorium oder relativ zu Proteinen, die für Transkriptions- und Replikationsmechanismen entscheidend sind [1]. Ein prinzipielles Problem der konventionellen und konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ist das richtungsabhängige Auflösungsvermögen. So ist die Auflösung in Richtung der optischen Achse um einen Faktor 2 schlechter als die laterale Auflösung in der Fokalebene.

In einer realitätsnahen Anordnung konnte die Auflösung von mit FITC markierten Signalen in mit Propidiumjodid gegengefärbten Lymphozytenzellkernen auf 430 nm lateral und 860 nm axial abgeschätzt werden [2]. Das Verhältnis zwischen axialem und lateralem Auflösungsvermögen bleibt somit auch unter praktischen Bedingungen erhalten. Aus diesem Grunde ist es von erheblicher Bedeutung, die zu untersuchenden Objekte drehbar zu lagern, um durch mindestens zwei zueinander senkrechte Aufnahmen die schlechtere Z-Achsenauflösung zu kompensieren [3]. In einem neuen Ansatz werden die Objekte auf eine Glasfaser gebracht [4]. Anhand von fluoreszierenden Latexbeads wird aufgezeigt, daß selbst für relativ einfache Objekte eine physikalische Drehung in die optimale Aufnahmelage von großem Nutzen ist. Die 3,15 Mikrometer großen Beads wurden nach Adsorption auf einer Borosilikatglasfaser in einem 9:1 Glyzerin-Wasser-Gemisch eingebettet. Weiterhin wurde ein Standarddeckglas mit ca. 160 µm Dicke verwendet. Es ist gelungen, von einer auffälligen Konformation dreier Beads, um jeweils 90 Grad gedrehte, vollständige konfokale Schnittbildserien zu erstellen. In zwei Positionen waren somit zwei Beads dicht untereinander, während diese in der 0-Gradposition nebeneinader zu liegen kamen und erst so getrennt wahrnehmbar sind. Hätte man keine Drehoption zur Verfügung gehabt, so wären selbst anhand der konfokalen Daten nur zwei Objekte aus den Bildserien zu segmentieren gewesen und nicht drei. Der Beaddurchmesser entspricht dem typischen Durchmesser von fluoreszenzmarkierten Chromosomenterritorien im Interphasezellkern [5].

Durch die Adaption der neuen Drehvorrichtung an das LEICA TCS 4D konnte die Einsatzfähigkeit der Mikroaxialtomographie (MAT) auf dem Gebiet der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie demonstriert werden. Von entscheidender Bedeutung bei der quantitativen Beurteilung von dicht beieinander liegenden fluoreszierenden Gebieten ist die Möglichkeit, den größten Abstand im projizierten Epifluoreszenzlichtbild durch Drehung mit MAT einzustellen. Der Fehler der Abstandsbestimmung wird somit minimiert.

[1] T.Cremer et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. LVIII (1993) 777-792
[2] B.Rinke et al., Fluorescence Microscopy & Fluorescent Probes, ed. J.Slavik, Plenum Press (1996) 169-173
[3] J.Bradl et al., J. Microsc. 176 (1994) 211-221
[4] J.Bradl et al., Proc. SPIE 2628 (1996) 140-146
[5] B.Rinke et al., Bioimaging 3 (1995) 1-11

Ein neues Prinzip der Konfokalen Mikroskopie: Strahlengangstabile Laser-Scanning Mikroskopie

von Steldern DU [1], Miliçev M [2]

[1] BioTechnologie Consulting, D-69181 Leimen; [2] MG Microscope GmbH, D-69245 Bammental

Die Prinzipien der konfokalen Mikroskopie beinhalten nach dem Stand der Technik ein sukzessives Abtastverfahren der Probe, bei dem der Probenträger auf einem Kreuztisch in *X*, *Y* und *Z*- Achse verfahren wird, oder der fokussierte Beleuchtungsstrahl die *X*- und *Y*-Achse abtastet, eine Höhenveränderung der Schärfeebene wiederum durch den Probenträger bewerkstelligt wird (Abb. 1 bzw. Abb. 2). Die Rekonstruktion von 2-D oder 3-D Abbildungen muß aus den gespeicherten Daten der Einzelpunktmessungen erfolgen und benötigt zur Betrachtung ein zusätzliches bildgebendes Medium.

Hier wird nun ein konfokales Abtastverfahren vorgestellt (Prinzip siehe Abb. 3), das auf einer Patentmeldung aus dem Jahre 1991 basiert (Patent erteilt: DE 41 13 297) und bei dem das Objekt sowie sämtliche optischen Elemente im Strahlengang zwischen Objekt und einer Punktlichtquellen-Matrix sowie der Detektor-Matrix in ihrer Anordnung zueinander festgehalten werden. Das Objekt wird durch Ansteuerung der einzelnen Punktlichtquellen sukzessiv ausgeleuchtet und durch die Detektor-Matrix mit jeweils den entsprechenden Punktlichtquellen zugeordneten Blendenöffnungen beobachtet.

Prinzipieller Gerätevergleich

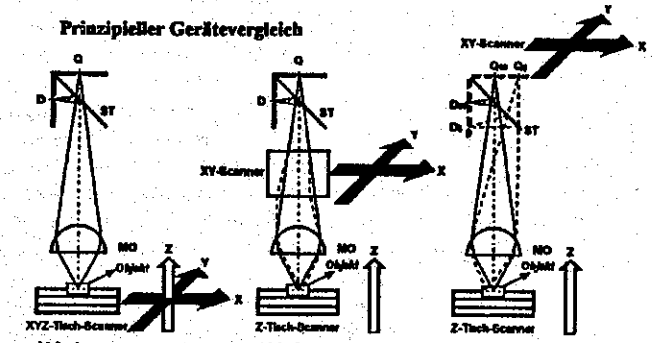


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 3

Aus dieser gegebenen Anordnung resultieren die folgenden Vorteile gegenüber dem Stand der Technik:

- Die primäre Erzeugung von zweidimensionalen konfokalen Bildern ist ohne jegliche elektronische Nachbearbeitung realisierbar (die elektrononische Bilderstellung ist zusätzlich möglich). Diese Bilder sind also direkt/indirekt physiologisch wahrnehmbar und können auch z.B. fotografiert werden.
- Absolute Reproduzierbarkeit der Koordinaten innerhalb einer Ebene. Die Erstellung präziser Abbildungen in weitaus größerer Geschwindigkeit eröffnet die Möglichkeit, dynamische Vorgänge in der Zelle besser zu verfolgen.
- Erstmalige Möglichkeit zur Erzeugung von konfokalen 2-D Bildern auch in Durchlichtanordnung. Eine weitere Konsequenz des neuen Systems ist es auch, daß sich die Erzeugung von Durchlichtbildern auch bei klassischen Scannern mit Hilfe des neuen Systems nachrüsten läßt (Durchlichtoption).

Mikroorganismen und Bioprozeßtechnik

Flow Cytometrie mit Phenol abbauenden Bakterien nach in situ Hybridisierung and DAPI-Färbung

C. HERRMANN

Abteilung Biotechnologie, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

Alcaligenes eutrophus JMP134 und *Acinetobacter sp.* zeichnen sich durch ihre Potenz zum Abbau von Acetat und aromatischen Kohlenwasserstoffen (Phenole und Benzoate) aus. Die Substrataffinität und die Populationsdynamik beider Stämme wurden durch rRNA- und DNA-Fluorochromierung mit der Flow-Cytometrie untersucht.

Für die in situ Hybridisierungsexperimente wurden kurze synthetische Oligonukleotide (aus 15-20 Nukleotiden) eingesetzt, die an die komplementären Sequenzen auf der 16S rRNS bzw. der 23S rRNS binden. Eine Eubakteriensonde, zwei gruppenspezifische Sonden, eine genus-spezifische und eine stammspezifische Sonde wurden eingesetzt um *Acinetobacter sp.* und *Alcaligenes eutrophus* JMP134 zu detektieren und zu identifizieren.

Beim Einsatz einer fluoreszenz-markierten spezifischen Sonde ergaben nur die Proben aus exponentiell wachsenden Stadien ein detektierbares Signal. Durch eine Signalverstärkung wurden alle Wachstumsstadien der Kultur (lag-, exponentielle und stationäre Phase) detektierbar.

Beide Bakterienstämme konnten im Fluoreszenzmikroskop durch Sonden, die mit unterschiedlichen Farbstoffe markierte waren (CY3 und Fluorescein), differenziert werden. In den flow-cytometrischen Experimenten konnten Mischpopulationen aus beide Stämme durch unterschiedliche Signale nach DAPI-Färbung getrennt werden. Bei Transient-State-Kultivierungen von *Acinetobacter sp.* zeigte sich eine lineare Korrelation von Wachstumsrate (0,05 h^{-1} - 0,3 h^{-1}) und rRNA-Gehalt. Zellen von *Alcaligenes eutrophus* JMP134 wurden nach Phenol- und 2,4-Dichlorphenoxyacetat-Streß in Nutristat-Kultivierungen untersucht. Mit steigender Konzentration des aromatischen Substrates sank die Wachstumrate des Stammes sowie das flow-cytometrisch gemessene Signal (rRNA-Gehalt).

Streulichtmessungen an Bakterien: Modellrechnungen und Experimente

Andreas Lösche

Projektgruppe Biosignale, Abteilung Biotechnologie, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig, Permoserstr. 15, D-04318 Leipzig

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie kann die Populationsdynamik von Bakterien in biotechnischen Prozessen untersucht werden. Man erhält Informationen von den einzelnen Zellen sowohl über die Messung der Fluoreszenzintensität von spezifisch markierten Zellbestandteilen und -inhaltsstoffen als auch über das Streulichtverhalten bei verschiedenen Streuwinkeln. Dabei unterscheidet sich das Streulichtverhalten von Zellen, die etwa die Größe von Bakterien haben (1...2 µm), deutlich von dem von größeren Zellen wie Gewebezellen (10...20 µm).

Die Winkelabhängigkeit der Streulichtintensität hängt u.a. von der Anregungswellenlänge und der Partikelgröße ab. Bei kleinen Streuteilchen (kleiner als etwa 1/10 der Anregungswellenlänge) ist die Streulichtintensität in alle Richtungen etwa gleich (Rayleigh-Streuung). Bei größeren Streuteilchen kommt es zu Interferenzen, und die Streulichtintensität in Vorwärtsrichtung ist größer als in die anderen Raumrichtungen. Zur Berechnung des Streulichtverhaltens ist hier nur die exakte MIE-Theorie anwendbar. Bei noch größeren Streuobjekten (größer etwa als die 10fache Anregungswellenlänge, z.B. Hefe- oder Gewebezellen) kann auch die Beugungstheorie angewendet werden; die Streuintensität entspricht etwa der Beugungsintensität an einer Kreisscheibe.

Für die Berechnung des Streulichtverhaltens von Bakterienzellen ist bei Anregung mit sichtbarem Licht also die exakte MIE-Theorie notwendig. Wichtige Parameter dabei sind der Brechungsindex der Zellen, der u.a. auch von der Vorbehandlung der Zellen (Fixierung) abhängt, und die Struktur der Zellwand. Während bei einem für Bakterien typischen Brechungsindex ein fast linearer Zusammenhang zwischen Zellgröße und Streulichtintensität besteht (Streuwinkel entsprechend dem optischen Aufbau des Durchflußzytometers der Projektgruppe Biosignale), kann eine Vergrößerung des Brechungsindex (z.B. durch Fixieren der Zellen) zu einem nicht mehr eindeutigen Zusammenhang der zwei Parameter führen.

Die Messung von Streulicht als zusätzlicher Parameter zu Fluoreszenzmessungen liefert wichtige Informationen bei der Untersuchung von mikrobiologischen Meßobjekten. Mit Hilfe von Modellrechnungen können dabei verschiedene Effekte gedeutet und erklärt werden.

Mikroorganismen in Fruchtsaft-Konzentraten

M. Moustafa, R. Wartenberg und W. Sachsse

AG Zytogenetik- Uni. Mainz

Die zunehmende Fälle von verdorbenen Fruchtsäften, besonders im Sommer, beruhen meistens auf Kontamination mit säure- und hitzestabilen Mikroorganismen. Die Ausgangsprodukte stammen überwiegend sowohl aus ost- und südeuropäischen als auch aus afrikanischen und lateinamerikanischen. Die Vorbereitung solcher Säfte ist mit Erhitzung verbunden. Dennoch können gewisse Mikroorganismen, besonders die Sporenbildenden, die hohe Temperatur überleben. Auch die Sterilisationsschritte während der Abfüllung führen nicht zur Abtötung dieser Zellen.

Aus Fruchtsaft-Konzentraten verschiedener Herkunft (Süd-Italien, Turkei und Argentinien) haben wir lebende Hefen nach eine Inkubationszeit von 3 Std. bei 60° C isoliert. Sowohl die DNA- Menge (GC-Gehalt) als auch die Wachstumsrate der isolierten Zellen im Vergleich zu Saccharomyces Cerevisiae wurden flußzytometrisch untersucht. Auch die Alkohol- und Milchsäure-Konzentrationen wurden bestimmt. Eine Fettsäure- Bestimmung wurde ebenfalls durchgeführt. Bei allen Untersuchungen zeigt die hitze -stabile Hefe (im Vergleich zu S. Cerevisiae) folgende Ergebnisse:

- ☐ erhöhter GC-Gehalt ((3,8 +/- 0,2) %)
- ☐ erniedrigte Wachstumsrate bei 35°C
- ☐ gehemmte alkoholische Gärung (0,3 Vol%)
- ☐ gesteigrte Milchsäure-Gärung (0,75- 0,82 g/l)
- ☐ erhöhte Öl -Säure- Konzentrationsverschiebung.

Diese Resultate weisen auf hitzestabile Hefen hin , die in der Lage sind, die Vorbehandlungen und die Serilisationsverfahren zu überleben. Sie werden im Fruchtsaft weiter wachsen und sowohl Trübung als auch Geschmacksveränderungen verursachen. Weitere Untersuchungen mit Hilfe von Gentechnik-Verfahren (Primer-Synthese und DNA-Hybridisierung) sind notwendig, nicht nur für die Charakterisierung sondern auch für die Klassifizierung dieser Species und ihrer Mutanten.

Keimung und Wachstum von Sporen charakterisiert mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und der Durchflußzytometrie

G. Nebe-von Caron* und W.A. Anderson, Unilever Research, Colworth Laboratory, Sharnbrook, Beds., MK44 1LQ United Kingdom

Seit mehreren Jahren studieren wir die Vitalität vegetativer Bakterien mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und der Zytometrie. Aufgrund der Vorteile dieses Verfahrens gegenüber wachstumsabhängigen Methoden wollten wir seine Anwendbarkeit zur Analyse von Sporen untersuchen. Zur Charakterisierung ihres Wachstumsverhaltens haben wir Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung der Membranintegrität und des Membranpotentials verwendet.

Die im Phasenkontrast sichtbare Änderung von hell zu dunkel korrelierte mit der Aufnahme von Ethidiumbromid als Supravitalfärbung. Der Wechsel von der Spore zur vegetativen Zelle war von einer Erhöhung der DNA-Färbung begleitet, gefolgt von der Polarisierung dargestellt durch den Ausschluß von Bis-Oxonol. Permeabilisierte Sporen zeigten auch die Aufnahme von Propidiumjodid, aber erst nach der rehydrierung der Zelle.

Beurteilung der Vitalitätsstadien von Bakterien mit Hilfe der Durchflußzytometrie und der Einzelzellsortierung.

G. Nebe-von Caron*, P. Stephens und R.A.Badley
Unilever Research, Colworth Laboratory, Sharnbrook, Beds., MK44 1LQ, UK

Aufgrund der Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen im Bereich der Zytometrie hat sich die schnelle Detektion und Vitalitätsbestimmung von Bakterien in letzter Zeit erheblich verbessert. Wir haben kürzlich beschrieben, daß vier Vitalitässtufen unterschieden werden können: 1. Reproduktion oder Wachstum, 2. Metabolische Aktivität, 3. Integrität und 4. Permeabilisation der Zelle. Bisher durchgeführte Sortierexperimente haben gezeigt das nicht alle intakten Zellen direkt anwachsen, daß aber Zellen die keine metabolische Aktivität aufweisen, kultivierbar sein können. Um die Interferenzen durch aktive Farbausschleusung sowie die Abwesenheit metabolischer Signale wie Enzymaktivität oder Membranpotential ausgehungerter Zellen zu umgehen, wurde eine Färbetechnik mit drei Farbstoffen entwickelt, die diesen Problemen Rechnung trägt. Sie erlaubt eine weiterführende Charakterisierung der intakten Zellen durch: aktiven Ausschluß von Ethidiumbromid (EB) (metabolisch aktive Zellen), Aufnahme von EB aber Ausschluß von Bis-Oxonol (BOX) (nicht pumpende aber polarisierte Zellen), sowie die Aufnahme beider Farbstoffe (depolarisierte Zellen). Permeabilisierte Zellen wurden durch die Aufnahme von Propidiumjodid (PI) identifiziert. Die Färbetechnik wurde mit Hilfe eines elektronisch programmierbaren individuellen Zellsortierers (EPICS Elite) und ausgehungerter *Salmonella typhimurium* Zellen validiert. Einzelne Zellen aus den verschiedenen Gruppen wurden direkt auf Agarplatten sortiert.

Färbung	Zellzustand	Wachstum
EB-; BOX-; PI-	aktiv pumpend	91%
EB+; BOX-; PI-	nicht pumpend	85%
EB+; BOX+; PI-	depolarisiert	35%
EB+; BOX+; PI+	permeabilisiert	0%
EB-; BOX+; PI-	'Ghosts'	0%

Die meisten metabolisch aktiven und inaktiven Zellen, sowie ein signifikanter Anteil der depolarisierten Zellen wuchsen auf den Agarplatten an. Dies zeigt, daß die von verschiedenen Autoren vorgeschlagene Messung der Depolarisation zwar ein empfindlicher Indikator für die Schädigung von Zellen ist, nicht aber den Zelltod anzeigt.

Durchflußzytometrische Reinigung von Mesophyll- und Leitbündelscheiden-Chloroplasten aus verschiedenen Pflanzen mit C_4-Photosynthese

E. Pfündel[1,2] und A. Meister[1],

[1]Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben.
[2]Universität Leipzig, Institut für Botanik, Johannisallee 21, D-04103 Leipzig

Wie berichteten in einer vorhergehenden Arbeit über eine neue Methode zur durchflußzytometrischen Gewinnung von reinen Mesophyll- (MES) und Leitbündelscheiden- (BS) Chloroplasten aus der C_4-Art Mais (Pfündel und Meister (1996) Cytometry 23, 97-105). Die Methode basiert auf der Detektion der Chlorophyll-Autofluoreszenz zweier spektraler Emissionsbereiche. Im vorliegenden Beitrag wird diese Methodik auf 15 Pflanzenarten mit C_4-Photosynthese ausgedehnt (Pfündel *et al.* (1996) Plant Physiol., im Druck). Die Arten repräsentieren 2 biochemisch unterschiedliche Typen der C_4-Photosynthese: den NADP-Malat-Enzym- und den NAD-Malat-Enzym-Typus. In den beiden biochemischen Typen unterscheiden sich die Fluoreszenz-Eigenschaften von MES- relativ zu BS-Chloroplasten. Durch die Kombination unserer durchflußzytometrischen Analyse und konventioneller Techniken zur Anreicherung von MES- und BS-Chloroplasten wurden bestimmte Muster von Partikel-Populationen erhalten, die zur Identifizierung des biochemischen Typs der C_4-Photosynthese herangezogen werden können. Weiterhin konnten mit Hilfe der Durchflußzytometrie deutliche Unterschiede der Fluoreszenz-Charakteristika innerhalb der beide C_4-Typen nachgewiesen werden. Diese Befunde wurden durch Fluoreszenzspektroskopie bestätigt und zeigen, daß innerhalb eines C_4-Typs unterschiedliche Membranzusammensetzungen in MES- und in BS-Chloroplasten bestehen.

Drei-Laser-Durchflußzytometrie zur gleichzeitigen Messung von Photosynthesepigmenten und Proteingehalt von Phytoplanktonpopulationen in Seen und Flüssen

Schäfer, H[1,2]; Brucknieyer, B.[1,2]; Steinberg, C.[2] and Belsker, W.[1]
(1): GSF - Durchflußzytometrie
Ingolstädter Landstr 1, D-85764 Neuherberg, Germany
(2): Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei
Müggelseedamm 310, D-12587 Berlin, Germany

Mit einem kommerziellen FACStar[plus] haben wir ein Verfahren zur gleichzeitigen Messung von Chlorophyllgehalt, Chlorophyllpigmentgruppen und Proteingehalt von Phytoplanktonpopulationen mit einem Drei-Laser-Aufbau entwickelt. Chlorophyll Pigmentgruppen können durch Anregung bei 632nm und 528nm quantifiziert werden. Als dritte Wellenlänge dient ein 488nm Laser zur Anregung von FITC zur gleichzeitigen Proteingehaltsbestimmung der Algen. Als Triggerparameter haben wir Chlorophyll bzw. Phycocyanin benutzt, angeregt mit einem 50 mW HeNe Laser bei 632nm. Kollinear mit diesem Strahl spiegeln wir einen 488nm Argonlaser mit 15mW Leistung ein zur Anregung von FITC. Die Analyse der akzessorischen Pigmente erfolgt durch den Vergleich der Fluoreszenz nach Anregung mit 632nm mit der Fluoreszenz angeregt durch einen dritten Laser bei 528nm (Argon-Ionen Laser mit 100-200mW Leistung, hiermit kann auch Phycoerythrin gemessen werden). Um den Aufbau zu erleichtern, werden mit Hilfe eines Dove-Prismas die Strahlen der 488 und 632nm Laser mit denen des 528nm Lasers, der eigentlich als erster Laser eingebaut ist, vertauscht. Somit werden die 632 und 488nm Laser als erste Laser und der 528nm Laser als zweiter Laser passiert. Wegen der nur 15mW des 488nm Lasers im Verhältnis zu den 50 mW des 632nm Lasers ergeben sich keine Störungen bei der Messung der Pigmentgruppen. Verschiedene Planktonpopulationen wie Diatomeen, Chrysophyceen und Dinoflagellaten (mit Carotinoiden) können von Chlorophyceen und Euglenophyceen ebenso wie von phycoerythrinhaltigen Cyanophyceen und Cryptophyceen unterschieden werden.

In unserem Bericht zeigen wir als Anwendung des Verfahrens Messungen verschiedener Phytoplanktonpopulationen von der Wörnitz und von sauren Braunkohletagebaurestseen. Diese Daten zeigen die Anwendbarkeit der beschriebenen halbtaxonomischen Methode in Limnologie und aquatischer Ökotoxikologie.

Nicht-invasive Bioprozessanalytik: Populationsdynamik

Bernhard Sonnleitner
Institut f Biotechnologie, ETH Zürich

Mikrobielle Populationen werden vielfach statistisch gleich verteilt, also nicht segregiert behandelt, was aufgrund ihrer Grösse plausibel ist. Auch die Annahme eines Fliessgleichgewichtes erleichtert die mathematische Analyse mikrobieller Kulturen wesentlich. Ein echtes Fliessgleichgewicht stellt aber eine künstliche Situation dar und ist nicht die Regel. Ebenso haben bereits kleine Änderungen der Umgebungsbedingungen grosse Auswirkungen auf die Populationsdynamik.

Am Beispiel einer Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, werden solche Aspekte untersucht. Dabei ist es wichtig, dass die Dynamik der Kulturen nicht durch die Analytik geändert oder geprägt wird, es braucht also nicht-invasive Analytik. Und dafür eignen sich insbesondere cytometrische Verfahren.

Hefekulturen haben ein "Gedächtnis": Wenn einer (vermeintlich) im Fliessgleichgewicht befindlichen Hefekultur eine vergrösserter Substratfluss angeboten wird, dann reagiert eine solche Kultur darauf verschieden, je nachdem, wie lange sie zuvor bei konstanten Verhältnissen kultiviert wurde. Die intrazelluläre Enzymausstattung muss den neuen Gegebenheiten erst angepasst werden, was zu einem beobachtbaren Überschwingen der extrazellulären Substratkonzentration führen kann. Gleichzeitig können auch populationsdynamische Ereignisse ausgelöst werden, wie etwa der partiell synchrone Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus. Solche Ereignisse sind typischerweise nur mittels cytometrischer Verfahren zu quantifizieren. Nebst der klassischen off-line Methode der Flowcytometrie ist uns eine, zunächst nicht klassierende, on-line Variante dienlich gewesen. An 3 Klassen von Beispielen wird die Leistungsfähigkeit der Methodik diskutiert:

1) Nach dem Transfer einer Kultur in frisches Medium tritt zunächst Gleichverteilung der Population in den Vordergrund, aber in einer späten Phase versammeln sich die Zellen wieder in typischen Klassen.

2) Den persistenten, spontanen Oszillationen in Chemostatkulturen liegt eine Segregation in mindestens 2 Subpopulationen zugrunde; diese resynchronisieren sich offensichtlich selbst.

3) Populationsdynamische Ereignisses können durch äusserst geringe Veränderungen der Umgebungsbedingungen ausgelöst werden. Unter anderem lässt sich dadurch eine Verkürzung der Generationszeit erzwingen.

Bestimmung der Vitalitätsverteilung von *Lactobacillus plantarum* Zellen nach Inaktivierungsmassnahmen mittels Durchflusszytometrie

Ueckert, J. und Ter Steeg, P.F.

Unilever Research Laboratorium
P.O. Box 114, 3130 AT Vlaardingen, NL

Lactobacillus plantarum ist ein Microorganismus, der einerseits bestimmte Lebensmittel verdirbt, andererseits in der Biotechnologie eingesetzt wird. Dieses Gram-positive Bakterium wurde für Modellstudien über Resistenz und Überleben nach Inaktivierungsmassnahmen in Verbindung mit Durchflusszytometrie ausgewählt. Ziel war es, die physiologischen Überlebensfaktoren in Populationen zu identifizieren. Es ist bekannt, dass die bakterielle Physiologie vor der Behandlung die Prozessempfindlichkeit individueller Zellen und die Vitalitätsverteilung danach die Wachstums-charakteristik bestimmt.
Auswirkungen von Hitze- und Nisinbehandlungen auf Vitalitätsverteilung und Wachstum von *Lactobacillus plantarum* wurden bestimmt.
Fluoreszenzfarbstoffe wurden eingesetzt, um Membranintegrität und Zellteilungen, induzierte Schäden sowie den Anteil von wachsenden Zellen in der Population zu bestimmen. Vitalität (interner pH, Energetisierungsrate) wurde mittels eines nicht-inhibitorischen, kovalent gebundenen pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt, der schon vor der Konservierung appliziert werden konnte.
Teile der Kulturen waren resistent gegen die Behandlungen. Mittels Durchflusszytometrie war es möglich, Populationen in Bezug auf Parameter wie Membranintegrität und Vitalität zu identifizieren und zu unterscheiden. Nach Einzelzellsortierung und darauffolgender Inkubierung in Medium oder auf Agar konnten die Sub-Populationen als lebend, geschädigt sowie als tot charakterisiert werden.

Neue Techniken, Verfahren und Konzepte

Durchflußzytometrische Fluoreszenzlebensdauer Messungen: Prinzipien und erste Anwendungen

Beisker, W. und Klocke, A.
GSF - Durchflußzytometrie, Ingolstädter Landstr. 1, D-85764 Neuherberg

In unserem Bericht zeigen wir die Entwicklung eines Systems zur durchflußzytometrischen Fluoreszenzlebensdauer Messung durch die Errechnung von Phasenspektren mit Hilfe digitaler Signalverarbeitung. Der Anregungslaser des Zytometers wir durch einen akusto-optischen Modulator mit einer Frequenz von 5 bis 25 Mhz je nach zu messender Lebensdauer moduliert. Das Zytometer selbst ist im Auflichtdesign entwickelt worden, um eine maximale numerische Apertur des Emissionslichtkanals zu erreichen (bis ca. 1.25). Die Lichtpulse für den Fluorezenzkanal und einen Referenzkanal werden mit Hilfe eines schnellen digitalen Oszilloskops mit einer Speicherrate von bis zu einem Ghz erfaßt. Mit Hilfe der schnellen digitalen Fouriertransformation (Fast Fourier Transform, FFT) wird ein amplituden- und Phasenspektrum aus den aufgenommen Signalen mit Hilfe eines Standard PC's errechnet. Die aufgenommen Signale können wie einfache slit-scanning Signale mit 2048 oder 4096 Datenpunkten pro Zelle und Parameter erfaßt und verrechnet werden. Dazu wird das etablierte Datenanalysepaket DAS verwendet, um Phasenverschiebung, Fluorezenzintensität und schließlich die Fluoreszenzlebensdauer in nsec für jede einzelne Zelle zu bestimmen. Die errechneten Zahlenwerte können dann als normale Listmode Daten weiter verarbeitet und dargestellt werden.

Berechnungen des Signal-zu-Rausch Verhältnisses für analoge Datenverarbeitung und für unsere neue digitale Technik werden mit Literaturdaten sowie mit Messergebnissen für künstliche fluoreszierende Partikel und für mit DNA Farbstoffen angefärbte Säugetierzellen verglichen.

Energie-Transfer zwischen verschiedenen Farbstoffmolekülen kann sowohl die Fluoreszenzlebensdauer als auch den Fluoreszenzdepolarisationsgrad verändern. Fluoreszenzdepolarisationsmessungen wurden an einem kommerziellen FACStar^{plus} ausgestattet mit einer Quartzküvette, einem Polarisationsdreher sowie einem Glan-Thompsen Prisma, durchgeführt. Daten von der Wechselwirkung von Propidiumiodid und Ethidiumbromid als Akzeptoren sowie Farbstoffen wie Mithramyzin als Donoren unter verschiedenen Bedingungen werden gezeigt.

Analyse zellulärer Signalverarbeitungsmechanismen mit elektrischen Mikrosensoren in Kombination mit Lichtmikroskopie: "Physiocontrol-Mikrosystem"

M. Brischwein, W. Baumann, R.Ehret, A. Schwinde, M. Kraus und B.Wolf
AG Medizinische Physik und Elektronenmikroskopie, Institut für Immunbiologie, Universität Freiburg, Stefan-Meier-Str.8, D-79104 Freiburg

Tierische und pflanzliche Zellen sind Mikrosysteme mit hohem strukturellen Organisationsgrad und nichtlinearer Signaldynamik (1). Sie besitzen parallele Datenverarbeitungseigenschaften (2) und antworten auf physikalische oder chemische Stimuli mit definierten Signalen (3, 4). Diese Signale sind Ausdruck der bekannten Kompartimentierung zellulärer Reaktionsmechanismen und lassen sich auf der Basis gesicherter Erkenntnisse der modernen Zell- und Molekularbiologie zu vielfältigen Analysezwecken ausnutzen.

Auf der Basis systemanalytischer und experimenteller Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Tumorzellen und deren mögliche chemotherapeutische Beeinflussung haben wir ein Meßsystem entwickelt, das an Zell- und Gewebematerial zelluläre Signale mittels geeigneter Mikrosensoren parallel registrieren kann (5, 6).

Das System ist geeignet zur Aufnahme adhärenter und in Suspension wachsender Zellkulturen sowie von Gewebeexplantaten. Die Zellen können auf standardisierten Kulturträgern konventionell vorkultiviert und für die Dauer der Messung in eine mit verschiedenen Sensoren bestückte Kammer eingesetzt werden. Speziell adaptierte Mikrosensoren (z.T. in planarer Technik) für pH, Sauerstoff, Temperatur, Ionen und elektrische Wechselwirkungen der Zellen stehen entweder in unmittelbarem Kontakt zu den Zellen oder sind im Strömungskanal des Nährmediums positioniert. Zusätzlich ist das Zell- oder Gewebematerial mikroskopierbar, so daß alle Standardtechniken zur Visualisierung intrazellulärer Signalverarbeitungsprozesse eingesetzt werden können. Der Aufbau des Systems sowie eine Zusammenfassung bisher erzielter Ergebnisse zur Signalanalyse an Zellen sollen präsentiert werden.

Literatur: (1) M. Kraus, B. Wolf: Structured Biological Modelling - A new approach to biophysical cell biology. CRC Press, Inc., Boca Raton 1994. (2) D. Bray: Intracellular signalling as a parallel distributed process. J. Theor. Biol. 143, 215-231 (1990). (3) M. Kraus, W. Baumann, M. Brischwein, R. Ehret, C. Lorenz, B. Wolf: Biosensorik mit zellulären Systemen. BioScope 1, 24-33 (1993). (4) M. Kraus, B. Wolf: Ising model for cooperative processing of extracellular information by protein-tyrosine kinases and cell adhesion molecules. BioSystems 33, 89-98 (1994). (5) B. Wolf, W. Baumann, R. Ehret, M. Brischwein, A. Dumba, G. Sulz: Vorrichtung zum Mikroskopieren, Schutzrecht, P 44 17 078.5, 1994. (6) B. Wolf, W. Baumann, U. Sieben, A. Dumba, G. Sulz: Objektträger für Mikroskop, Schutzrecht, P 44 17 079.3, 1994.

PHASE-SENSITIVE FLOW CYTOMETRY: LIFETIME-BASED TECHNOLOGY FOR ANALYZING CELLS/CHROMOSOMES LABELED WITH FLUORESCENT PROBES

John A. Steinkamp
Life Sciences Division, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM 87545, USA.

A phase-sensitive flow cytometer has been developed that combines flow cytometry (FCM) and fluorescence lifetime spectroscopy measurement principles to provide unique capabilities for making frequency-domain measurements on cells/chromosomes labeled with fluorescent probes (Rev. Sci. Instrum. 64:3440, 1993). No other instrument can resolve heterogeneous fluorescence based on differences in lifetimes and quantify lifetimes directly in real time. Cells are analyzed as they intersect a high-frequency, intensity-modulated (sine-wave) laser excitation beam. Fluorescence signals are processed by 1) phase-sensitive detection electronics to resolve heterogeneous fluorescence based on differences in lifetimes expressed as phase-shifts, 2) phase shift and amplitude demodulation electronics to quantify fluorescence lifetime, and 3) low-pass filtering to obtain conventional FCM signals, and are displayed as frequency distribution histograms and bivariate contour diagrams. The technology has been characterized with respect to measurement precision, linearity, sensitivity, and dynamic range. Lifetime histograms have been recorded on autofluorescent human lung fibroblasts; murine thymus cells labeled with antibodies conjugated to fluorophores for studying fluorescence quenching as a function of antibody dilution and F/P ratio; and cultured cells, nuclei, and chromosomes stained with DNA-binding fluorochromes. Phase-resolved, fluorescence signal-intensity histograms have been measured on thymus cells labeled with Red 613 antiThy 1.1 and propidium iodide (PI positive dead cells) to demonstrate the resolution of signals from highly overlapping emission spectra. Studies directed at eliminating background interference caused by cellular autofluorescence in low-level immunofluorescence measurements are underway. This technology will increase the number of fluorescent markers usable in multilabeling studies and lifetimes can be used as spectroscopic probes to study the interaction of markers with their targets, each other, and the surrounding microenvironment. (Supported by the U.S. Dept. of Energy and NIH Grants RR013151 and RR07855).

Nachweis intrazellulärer Enzymaktivität mittels Multiparameter-Durchflußzytometrie

Rolf Eckhardt

Coulter-Immunotech Diagnostics, Europark Fichtenhain B13, 47807 Krefeld

Der fluoreszenz-optische Nachweis von intrazellulären Strukturen und Zelloberflächenantigenen ist inzwischen zur zytometrischen Routine-Anwendung gereift. Für die Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivitäten gab es bis heute keine standardisierten Verfahren.

Mit der CellProbe™-Produktreihe stellt Coulter eine innovative Technologie für diesen Anwendungsbereich vor. CellProbe™-Reagenzien sind Substrate, die mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind. Die chemischen Bindungen dieser Substrat-/Farbstoffkomplexe sind so designed, daß das Ausgangsprodukt keine Fluoreszenz zeigt. Erst durch die enzymatische Abspaltung des Substrats kann der Farbstoff zum Fluoreszieren angeregt werden.

Für 38 unterschiedliche intrazelluläre Enzyme stehen Substrat-/Farbstoffkomplexe zur Verfügung. Die Enzymaktivitäten werden mit CellProbe™-Reagenzien in ihrem natürlichen Milieu, d. h. innerhalb der lebenden Zellen, bestimmt. Die Zellen können aus Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, aus Zellkulturen oder auch aus disaggregierten soliden Geweben stammen. Da Enzyme an allen zellulären Stoffwechselvorgängen beteiligt sind, kann die Messung dieser Enzymaktivitäten wichtige Informationen über zelluläre Metabolismen liefern, hierzu gehören z. B. Zellaktivierung, -differenzierung, -transduktion, -regulation und Apoptose. Mit den CellProbe™-Reagenzien lassen sich aber auch Änderungen der Enzymaktivitäten von pathologischen Zellen oder von normalen Zellen unter Einwirkung von Chemikalien, im Vergleich zu Kontrollproben, untersuchen.

Der Nachweis der Enzymaktivität mittels CellProbe™-Reagenzien ist jedoch nicht nur auf die Durchflußzytometrie beschränkt, sondern die Reagenzien lassen sich auch in der Fluoreszenzmikroskopie, der Laser-Scanning-Mikroskopie, der Bildanalyse und sogar in der Spektrofluorometrie einsetzen.

Zellaggregatbildung bei der Immunfluoreszenz-Routine: Relevanz des Fcγ-Rezeptorpolymorphismus für die klinische Durchflußzytometrie

J.W. Gratama[1], R. v. d. Linden[1], C. de Beukelaer[1], J. G. J. v.d. Winkel[2] and R. L. H. Bolhuis[1]

[1]Department of Clinical and Tumor Immunology, Daniel den Hoed Cancer Center, Rotterdam and [2]Department of Immunology, University Hospital, Utrecht, the Netherlands

Die Beeinflussung der Lichtstreuungseigenschaften (FSC, SSC) von peripheren Blut-Lymphozyten durch den Typ der für die Immunophänotypisierung verwendeten Antikörper, beeinträchtigt routinemäßig genutzte durchflußzytometrische Analysemethoden, bei denen feste FSC,SSC Einstellungen und Lymphozyten-"gates" auf die CD45, CD14 gefärbte Standardprobe angewandt werden. Diese Situation entsteht durch zelluläre Aggregatbildung wodurch Einzelereignisse aus dem Aufnahmegate herausfallen.

Zunächst beobachteten wir einen signifikanten shift des FSC/SSC-Signals bei PBMC´s von 72 gesunden Spendern, abhängig vom verwendeten Antikörpercocktail (alle IgG1). Zwischen verschiedenen Spendern gab es starke aber reproduzierbare Schwankungen. Durch parallele DNA/RNA-Färbung konnten wir zelluläre Aggregate definieren (über die FL3 Signalbreite, FL3w), die gleichzeitig deutlich stärkere FSC/SSC-Signale aufwiesen.

Der kodominant exprimierte Fcγ-Rezeptor Typ IIa (FcγRIIa) weist einen funtionell relevanten genetischen Polymorphismus auf, bei dem Histidin in Position 131 einen niedrigaffinen Rezeptor für IgG1 der Maus ergibt, wohingegen Arginin in dieser Position einen relativ hochaffinen Rezeptor erzeugt. Wir untersuchten den Einfluß dieses Polymorphismus auf die Zellaggregatbildung in einem Panel von 78 Spendern, von denen 12 mehrfach (bis zu 6 mal) untersucht wurden.
Unsere Ergebnisse belegen, daß die Interaktion zwischen Antikörpern, spezifisch für Zelloberflächenmoleküle, und den verschiedenen polymorphen Formen des Fcγ-Rezeptors ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Immunfluoreszenz-Artefakten durch Bildung von Zellaggregaten ist.

Markierung und Analyse von rekombinantem Hirudin mit der Flow Cytometrie

R. Malsch, L. Piazolo, W. Lianchun, A. Timmermann and J Harenberg
I. Medizinische Klinik, Fakultät für klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg, Theodor Kutzer Ufer, 68167 Mannheim

Hirudin ist ein natürlich vorkommendes Antikoagulans, das aus dem Blutegel (hirudo medinalis) von Markwart et al isoliert wurde. Hirudin ist ein stabiler und sehr starker Thrombininhibitor (Km = 0.8 x 10^{-10} mol/l, pH 7,4, 20° C). Die Substanz wird zur Prophylaxe und Therapie der venösen Thrombose klinisch geprüft. Die rekombinate Biotechnologie erlaubt ausreichende Mengen der Substanz zu gewinnen, um die Entwicklung als antikoagulanter Wirkstoff zu ermöglichen.
Die Bindung von Hirudin an menschliche Blutzellen erlaubt eine Aussage über die Verteilung der Substanz im Organismus. Die Analyse von rekombinantem Hirudin (Knoll AG, Ludwigshafen) kann durch eine Fluoreszenzmarkierung oder durch die Detektion mit einem Hirudinantikörper erfolgen. Im folgenden wird die Analyse von fluoreszenzmarkierten Hirudin auf menschlichen Blutzellen mit Hilfe der Flow Cytometrie beschrieben.

5 mg r- Hirudin wurde mit einem 10 fachen Überschuß an Fitc in einem 10 mM Phosphat Puffer (pH 7,5, 25°C) gelabelt. Die Antithrombin Aktivität der Substanz betrug 72 U/mg und wurde mit dem chromogenen Substrat S 2238 bei 405 nm bestimmt. Das markierte Hirudin zeigte eine Fitc/Protein Ratio von 0.14.

Das fluoreszente Hirudin wurde 10 Minuten im Dunkeln mit Vollblut inkubiert. Nach dem Waschen der Blutzellen mit Cellwash wurden diese unter dem Fluoreszenzmikroskop und der Flow Cytometrie untersucht. Die Fluoreseszenzmikrokopie zeigte eine Binding von r-Hirudin-Fitc (1,2 mg/ml) an menschliche Blutzellen (Leukozyten).

Die Flow Cytometrie Analyse wurde mit Konzentrationen von 1000 ng bis 1 mg/ml Hirudin-Fitc durchgeführt. Die Granulozyten zeigten eine Binding von 0,1 bis 1,2 mg/ml Hirudin-Fitc. Die Monozyten banden 0,2 bis 1,2 mg/ml Hirudin-Hitc. Die Erythrozyten, Lymphozyten and Thrombozyten wiesen eine Bindung zwischen 0,6 to 1,2 mg/ml auf. Verschiedene Konzentrationen von r-Hirudin zwischen 0,03 und 10 mg/ml sowie von Thrombin zwischen 0,01 to 30 IU wurden untersucht um das gebundene Hirudin-Fitc von der Zelloberfläche verdrängen.

Die Ergebnisse zeigen daß die Bindung von r-Hirudin an menschliche Butzellen gering ist. Das fluoreszenzmarkierte Hirudin kann dazu verwendet werden die Bindung von Hirudin an zellulären Oberflächen und Geweben mit der Flow Zytometrie und Fluoreszenzmikroskopie zu messen. Eine weitere Applikation stellt die Detektion von Thrombin mit Hilfe von fluoreszenten Hirudinen dar.
Die Arbeit wurde freundlicherweise von dem Forschungsfonds der Fakultät für klinische Medizin, Mannhein unterstützt.

Analyse der Rolle des FAC-Gen bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose mittels einer neuen durchflußzytometrischen Methode

Martin Poot, Frank Kruyt[2], Hans Joenje[2], Victoria L. Singer and Richard P. Haugland. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR 97402, U.S.A. und Department of Human Genetics[2], Free University of Amsterdam, 1081 BT Amsterdam, The Netherlands.

Die Entschlüsselung der Wege zum apoptotischen Zelltod ist bislang dadurch eingeschränkt worden, daß viele der, für die Apoptose relevanten Parameter, nur nach einer Zellfixierung dargestellt werden könnten. Um diese Einschränkung zu überwinden, haben wir eine Reihe von Lebendfarbstoffen, die Nukleinsäuren anfärben, dahingehend untersucht, ob sie es erlauben, apoptotische von nicht-apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Als Modellsystem für unsere Suche benutzten wir Kulturen von mittels Epstein-Barr-Virus-Transformation immortalisierten, menschlichen B-Zellinien. Dieses Zellsystem wurde ausgewählt, weil dieser Zelltyp aus Proben des peripheren Blutes von Patienten und gesunden Spendern gewonnen werden kann. Von den untersuchten Lebendfarbstoffen zeigte das SYTO™ 11 die beste Auflösung zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen. Mittels SYTO 11/Hoechst 33342-Doppeltanfärbung konnten wir die Zellzyklusverteilung der früh-apoptotischen und der nicht-apoptotischen Zellen auflösen. Diese neue Methode der Darstellung der Apoptose bei lebenden Zellen wendeten wir auf die Überempfindlichkeit der Fanconi Anämie (FA) hinsichtlich der Apoptose-Induktion durch das Mitomycin C (MMC) (Kruyt et al., (1996) Blood 87, 938) an. Diese Erkrankung des Kindesalters kennzeichnet sich durch eine progressive Panzytopenie und Skelettfehlbildungen. FA folgt einem autosomal rezessiven Erbgang und lässt sich in fünf Komplementationsgruppen aufteilen. Das Gen für die Komplementationsgruppe C wurde isoliert; das Genprodukt ist ein im Zytoplasma lokalisierendes Protein, welches mit drei anderen Proteinen einen Komplex bildet. Von einem Patienten der Komplementationsgruppe C stammt eine Zellinie, welche mit dem Vektor DR2 transfiziert wurde und die die erhöhte Apoptoserate der FA behielt. Darüberhinaus zeigte diese Zellinie nach Exposition an MMC einen erhöhten Anteil an früh-apoptotischen Zellen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus und eine starke Tetraploidisierung. Die Transfektion und Überexpression des Wildtyp-FAC-Gens hingegen führte zu einer Verringerung des Anteils an apoptotischen Zellen und zu einer starken Tetraploidisierung. Bei der Zellinie eines gesunden Spenders führte die Exposition an Mitomycin C zur Bildung von früh-apoptotischen Zellen in der G1- und frühen S-Phase des Zellzyklus. Wir schließen, daß das FAC-Gen an der Regulation eines kombinierten "Zellzyklus/Apoptose-Checkpoints" beteiligt ist.

Analyse der unterschiedlichen Wege zum apoptotischen Zelltod in lebenden Zellen mittels MitoTracker™ und SYTO™ Durchflußzytometrie

Martin Poot, Lisa L. Gibson, Victoria L. Singer and Richard P. Haugland. Molecular Probes, Inc., Department of Biosciences, Eugene, OR 97402, U.S.A.

In Kulturen von vier menschlichen hämatologischen Zelltypen (H9, HL-60, Jurkat und eine B-Zellinie) wurde durch Exposition an Camptothecin Apoptose induziert. Nach Anfärbung mit den SYTO™ Nukleinsäurefarbstoffen lissen sich in den mit Camptothecin behandelten Zellkulturen zwei Signalgruppen auflösen. Menschliche B-Zellen zeigten diese beiden Signalgruppen unterschiedlicher Fluoreszensintensität nach Anfärbung mit den SYTO 11-, 12-, 13-, 14- und 16-Lebendfarbstoffen. Die H9-, HL-60- und Jurkat Zellen zeigten eine Auflösung zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen nur mit den SYTO 11-, 13-, 14- und 16-Lebendfarbstoffen. Verdau fixierter B-Zellen mit RNase A reduzierte die Fluoreszensintensität nach SYTO 12-Anfärbung; die Fluoreszens der anderen SYTO-Farbstoffe zeigte sich jedoch nur geringfügig empfindlich gegenüber RNase A-Verdau. Hieraus schließen wir, daß die Verringerung der SYTO 12-Fluoreszensintensität wahrscheinlich RNA-Abbau während der Apoptose widerspiegelt. Auch nach RNase A-Verdau zeigte keiner der SYTO- Farbstoffe eine Fluoreszenzintensitätsverteilung, welche stöichiometrisch mit dem zellulären DNA-Gehalt ist. Dieses Ergebnis indiziert, daß die Verringerung der Fluoreszensintensität nach Anfärbung mit den SYTO 11-, 13-, 14- und 16-Lebend-farbstoffen die Folge einer Änderung der Chromatinstruktur während der Apoptose darstellt. In allen untersuchten Zelltypen wurde eine klare Auflösung zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen nach Anfärbung mit dem MitoTracker™ Red CMXRos-Farbstoff gefunden. Mittels Doppeltanfärbungsversuche konnten wir zeigen, daß Zellen mit verringerter SYTO 11-Fluoreszensintensität auch verringerte CMXRos-Fluoreszensintensität aufwiesen. Somit schließen wir, daß unterschiedliche SYTO-Lebendfarbstoffe es erlauben, apoptotische von nicht-apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Der SYTO 12-Lebendfarbstoff erlaubt es, RNA-Abbau während der Apoptose darzustellen. Anfärbung mit den CMXRos-Farbstoff zeigt eine Verringerung der mitochondrialen Funktion in allen bislang untersuchten Zelltypen. Somit scheint die mitochondriale Funktionsstörung einen generellen Aspekt der Apoptose darzustellen.

EXCIMER-FLUORESZENZ IM VERGLEICH ZU DEPOLARISATION IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN CHARAKTERISIERUNG VON LATERALER MEMBRANMOBILITÄT

G. Rothe, B. Schäfer, G. Schmitz
Institut für Klinische Chemie, Universität Regensburg, Deutschland

Eine veränderte zelluläre Membranfluidität als Folge eines veränderten Cholesterinmetabolismus ist ein potentiell bedeutender Pathomechanismus der Atherogenese. Insbesondere eine gesteigerte Aktivierbarkeit der Aggregation von Thrombozyten, die bei Patienten mit Störungen des Lipid- oder Lipoproteinstoffwechsels einen Risikofaktor für vaskuläre Thrombosen darstellt, konnte experimentell in einen Zusammenhang mit einer abnormen Mikroviskosität gebracht werden. Das Ziel dieser Studie war die Entwicklung einer neuen durchflußzytometrischen Methode zur direkten Analyse der zellulären Membranviskosität von Thrombozyten in Korrelation zu aktivierungsassoziierten Veränderungen ihres Phänotyps in vitro.

Die Analyse von Fluoreszenzpolarisation nach selektiver Anfärbung von hydrophoben Regionen der Zellmembran mit dem Farbstoff 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH) ist eine gut charakterisierte Methode zur Analyse der Membranfluidität. Das Ausmaß der Fluoreszenzanisotropie in Abhängigkeit der Rotationsmobilität dieses Farbstoffes ist hierbei indirekt proportional zur Mikroviskosität des angefärbten Membrankompartiments. In dieser Studie wurde eine alternative, analytisch einfachere Methode basierend auf der Diffusions-begrenzten Excimer-Bildung durch Pyrendecansäure (PDA) im Vergleich zur Polarisationsanalyse als Referenzmethode näher charakterisiert.

Humane Thrombozyten zeigten bei Raumtemperatur eine rasche Aufnahme sowohl von DPH als auch PDA resultierend in einer Anfärbung vor überwiegend der Plasmamembran nach bis zu 30-minütiger Inkubation. Die durchflußzytometrische Analyse der Färbung bei 351 nm Anregung mit einem Argon-Laser ergab ein Plateau des Depolarisationskoeffizienten von DPH bei 20 µM im Gegensatz zu einer weiteren Zuname des Excimer-/Monomer-Quotienten von PDA mit steigender Farbstoffkonzentration. Ein "Membran-Fluiditäts-Koeffizient", der bei 5 µM PDA ein Plateau erreichte konnte als Excimer-Fluoreszenz dividiert durch das Quadrat der Monomer-Fluoreszenz berechnet werden. Hierbei erfolgt eine Korrektur für den Einfluß der Farbstoffkonzentration auf die zu Excimer-Fluoreszenz führende Kollisionsfrequenz. Die temperaturabhängigen Veränderungen der Membranviskosität dienten in weiteren Untersuchungen als einfaches Modell für den Vergleich der beiden Methoden. Zwischen 12°C und 33°C zeigten Zellen eine lineare Zunahme des Koeffizienten der PDA-Fluoreszenz um den Faktor 3,1. Der Depolarisationskoeffizient von DPH nahm hingegen bei relativ geringeren Veränderungen oberhalb 24°C nur um den Faktor 2,2 ab. Eine Cholesterin-Depletion von Thrombozyten mittels Cholesterin-armer Phosphatidylcholin-Liposomen ergab eine signifikante Zunahme des Koeffizienten der PDA-Fluoreszenz während eine nur geringe Veränderung des Polarisationskoeffizienten für DPH keine reproduzierbare Analyse erlaubte. Diese höhere Sensitivität der PDA Methode bestätigte sich weiter in der Untersuchung der Blutproben von Patienten, die nur für den Fluoreszenzkoeffizienten von PDA eine signifikante Korrelation zum Serum LDL Cholesterin ergab. Zusammenfassend stellt die Analyse der Excimer-Fluoreszenz von PDA eine technisch einfache, sensitive, und gut reproduzierbare Methode zur durchflußzytometrischen Analyse der veränderten Membranfluidität von Thrombozyten dar.

Fluß-Zytometrie von alkalischen und sauren Phosphatase-Aktivitäten - Vergleich der Diazo-Kupplungsreaktion und der Methylumbelliferon-Methode -

E. Severin und E. Seidler, Institut für Strahlenbiologie der Universität Münster, Robert-Kochstr. 43, D-48149 Münster

Die Bestimmung der zellulären Phosphatase-Aktivität hat eine beträchtliche praktische Bedeutung. In der histochemischen Literatur werden viele Methoden beschrieben; für den Einsatz in der Fluß-Zytometrie eignen sich aber nur wenige.

Im folgenden werden die bekannten Verfahren der Diazokupplungsreaktion (DKR) und die Methylumbelliferon-Methode (MU) für die Phosphatasedarstellung optimiert und auf ihre Eignung an Endothelzell-Kulturen vergleichend untersucht. Die Enzymaktivität der Zellen wurde dabei nur relativ zueinander bestimmt und nicht in biochemischen Einheiten quantifiziert.

Die DKR (modifiziert nach Kamalia et al. 1992) eignet sich gut für die Bestimmung sowohl der alkalischen als auch der sauren Phosphatase und läßt sich bei Geräten mit Laser- und Lampenanregung gleich gut anwenden, weil die Fluoreszenz des Azofarbstoffs zwischen 500 und 550 nm angeregt werden kann. Naphthol-AS-Phosphat wird als Substrat der Phosphatase in schwach fluoreszierendes Naphthol-AS umgesetzt, das aber so stark diffusibel ist, daß es nachfolgend mit Fast Red Violet LB salt zu einer stabilen, rot-fluoreszierenden Verbindung gekuppelt werden muß, damit das Reaktionsprodukt jeweils einer Zelle zugeordnet werden kann. Das ist technisch sehr einfach: man braucht lediglich die beiden Substanzen in geeigneter Konzentration mit den Zellen zusammen für 2 Minuten zu inkubieren. Wird statt Fast Red Violet LB salt als Kupplungsfarbstoff Fast Red TR salt verwendet, so verläuft die Reaktion unspezifisch positiv auch mit phosphatase-negativen Zellen. Je nach Wahl des Puffers läßt sich die saure (pH 5) oder die alkalische (pH 9) Phosphatase darstellen. Nach einer Inkubation von 2 Minuten wird die Reaktionslösung abzentrifugiert und die Zellen werden für 1 Stunde mit 0,25% Paraformaldehyd fixiert, anschließend (oder auch erst nach einigen Wochen) mit DAPI gegengefärbt und zwei-parametrisch gemessen.

Das zweite Verfahren, das mit Methylumbelliferyl-Phosphat, eignet sich nur für die Darstellung der alkalischen Phosphatase, weil das 4-Methylumbelliferon nicht im sauren Milieu fluoresziert. Der Reaktionsansatz ist ebenso einfach wie bei der DKR. Das Reaktionsprodukt fluoresziert blau, deshalb wird die DNA mit Ethidiumjodid oder Propidiumjodid gegengefärbt. Die Auflösung der Histogramme ist aber schlechter als bei der Diazo-Methode. Aus diesem Grund und wegen der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz empfiehlt sich die Diazomethode mit Naphthol-AS-Phosphat als Substrat und Fast Red Violet LB salt als Kuppler für die Flußzytometrie der Phosphatasen.

Abschätzung der Überlebensprognose colorektaler Krebspatienten mittels Multiparameter-CLASSIF1-Analyse des G6PDH Sauerstoff Insensitivitätstests sowie von SOD und Lipidperoxidase-Messungen an Gefrierschnitten.

G.Valet[1], B.E.M. Van Driel[2], H.Lyon[3], U.Hansen[3], J.Song[2], C.J.F. Van Noorden[2]
1) Max-Planck-Inst.Biochemie, 82152 Martinsried, Germany, 2) Lab.Cell Biol.and Histol, Academic Med.Center, Univ.Amsterdam, NL, 3) Dep.Pathol., Kobenhavns Kommunes Hvidovre Hosp., Univ.Copenhagen, Denmark

Die Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH) als Regulatorenzym des Pentosephosphatshunts nimmt zu Beginn der Krebsentstehung bereits vor Morphologieänderungen in der Sequenz normales Gewebe, Adenom, Karzinom zu. Tetrazoliumsalze als **Elektronenakzeptoren** präzipitieren dabei in erhöhtem Maße als **gefärbtes** Formazan. Formazanpräzipitate treten bei Einsatz von **Neotetrazoliumchlorid** in **normalen** Zellen, **nicht** aber in **malignen** Colon-, Magen-, Brust- oder Bronchialzellen in Gegenwart von 100% Sauerstoff auf.

Gefrierschnitte von frischen Postoperationsproben wurden **Formazan** gefärbt. Normales und Krebsgewebe wurde standardisiert mit einem Vickers M85a Zytophotometer bei 585nm vermessen. **CuZn-SOD** (Superoxiddismutase) und **Mn-SOD** wurden quantitativ mittels Immuneperoxidasefärbung sowie die Lipidperoxidation (LPO) mit einer FeCl3/Ascorbinsäure/Naphtolsäurehydrazid (NAH)/Fast Blue B Methode beide nach 4% Formaldehydfixation erfaßt.

29 Datenbankkolonnen waren für die unbeeinflußt selbstlernende Datenklassifikation verfügbar. Sie bestanden aus Patientenalter, Gewebedifferenzierung, Dukes Stadium, lokalem Lymphknotenbefall und Tumorinvasion in lokale Blutgefäße sowie 10 gemessenen zytochemischen Parametern mit 2 **%** Werten der G6PDH Aktivität in Tumor- (tu) und Normalgewebe (no) mit und ohne O_2. Weiterhin enthielt sie berechnete 6 Differenz- und 6 % Werte zwischen Krebs- und Normalgewebe aus den obigen 10+2 zytochemischen Werten.

Normales und malignes Gewebe wurde **diagnostisch** in >95% der Fälle durch die CLASSIF1 Tripelmatrixklassifizierung richtig erkannt. Ein wichtiger Aspekt betrifft die **prognostische** Klassifizierung der Daten bezüglich **Überleben** oder **Versterben** während einer maximalen postoperativen Phase von **56** Monaten. Das Versterben wurde in 64.3% der letztlich verstorbenen Patienten (n=42) korrekt und ohne Verwechslung mit überlebenden Patienten prognostiziert d.h. **100%** dieser Klassifizierungsurteile waren **korrekt**. Überlebende Patienten (n=22) wurde ebenfalls in 100% der Fälle richtig erkannt, aber die verbliebenen 35.7% der verstorbenen Patienten wurden ebenfalls als Überlebende klassifiziert d.h. die CLASSIF1 Klassifizierung **"Überlebender"** war nur in 100/135.7=**73.6%** der Fälle richtig. Die ausgewählten Klassifizierungmuster konnten durch das Programm von ursprünglich 29 auf **11** Datenbankkolonnen reduziert werden. Patienten hatten eine schlechte Prognose bei **niedrigem**: Alter, tu-CuZn-SOD, tu-Mn-SOD, no-**%**-verblieb.G6PDH Aktivität unter O_2 **%** und Differenz der tu/no G6PDH unter N_2 ebenso wie die Differenzen tu/no CuZn-SOD und tu/no LPO in **Kombination** mit **erhöhten**: Lymphknoteninfiltrationen, Dukes Stadium und **%** tu/no-%-verblieb.G6PDH Aktivität unter O_2.

Aus den Untersuchungen ergibt sich, daß die **standardisierte** Tripelmatrixklassifizierung von Bildanalysedaten cytochemischer Ansätze in Gefrierschnitten eine signifikant **bessere Einzelfallprognose** ergibt als traditionelle Parameter wie Dukes Stadium oder histopathologisches Grading.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER STOSSWELLENINDUZIERTEN ÄNDERUNGEN DES PLASMAMEMBRAN-POTENTIALS AN PC12 ZELLEN.

G. Wölfl, P. Steinbach, J. Bette, E. Endl, F. Hofstädter

Institut für Pathologie, Universität Regensburg.

Extrakorporal erzeugte Ultraschallstoßwellen (*high energy shock waves*, HESW) sind in der Behandlung von Nieren und Gallensteinen bereits etabliert und werden seit kurzem bei der Behandlung von Weichteilschmerzen eingesetzt. Ungeachtet der positiven Wirkung auf das Befinden der Patienten ist der zugrunde liegende Wirkmechanismus unbekannt. Als erster Schritt zum Verständnis dieser Wirkmechanismen wurde von uns der Einfluß der HESW auf das Plasmamembranpotential untersucht. Zur Kalibrierung des Plasmamembranpotentials mußten bereits bestehende Möglichkeiten zur Messung des Plasmamembranpotentials modifiziert werden.

Eine Suspension aus Zellen der Phäochromocytomzellinie PC12 wurde den HESW eines experimentellen Stoßwellengenerators ausgesetzt. Die Zellen wurden mit dem potentialsensitiven anionischen Oxonolfarbstoff $DiBAC_4(3)$ (Molecular Probes) gefärbt und die resultierende Fluoreszenz mittels des Durchflußzytometers FACScan (BD) ermittelt. Durch eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid und unter Verwendung der Steulichteigenschaften der Zellen wurden Subpopulationen sichtbar, die mit Hilfe des Farbstoffs SYTO13 (Molecular Probes) identifiziert wurden. Zur weiteren Auswertung gelangte die Population der Einzelzellen.

Eine Stoßwellenexposition von 2000 Pulsen bei einer Energiedichte von 0,2 mJ/mm^2 resultierte in einer Hyperpolarisation des Plasmamembranpotentials um 8V, was einer Steigerung von 30% entspricht. Die Änderungen sind in dem untersuchten Bereich von 0.1 mJ/mm^2 bis 0,33 mJ/mm^2 dosisabhängig. Ebenfalls wurde eine Zeitabhängigkeit der durch HESW hervorgerufenen Änderungen sowie Schwankungen des Plasmamembranpotentials in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen festgestellt.

Diese Resultate können eine erste Erklärung der analgetischen Wirkung der HESW darstellen, da bei einer Hyperpolarisation die Schwelle zum Auslösen eines Aktionspotentials erhöht wird. Weitere Untersuchungen, wie der Einfluß der Anzahl der angewandten HESW und das Ermitteln einer optimalen Dosis, müssen noch durchgeführt werden. Auch die Verwendung eines anderen Zellsystems, wie zum Beispiel ausdifferenzierte PC12 Zellen, könnte weiter zum Verständnis der Wirkmechanismen beitragen.

Posterbeiträge

Schnelle FISH für repetitive und "painting" Proben

Markus Durm, Dietmar Wolf, Klaus Aldinger, Frank-Martin Haar, Christoph Cremer

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

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist mittlerweile eine bedeutende Technik für die Zytogenetik. Wir entwickelten ein schnelles FISH Verfahren ("Fast-FISH"), das im Puffer auf Formamid oder andere chemische denaturierende Agentien verzichtet. Nach simultaner Denaturierung von Probe und Chromosomen beträgt die Hybridisierungszeit nur noch wenige Minuten. Ebenso ist nur noch ein einziger Waschschritt notwendig. Bei indirekter Markierung dauert die gesamte Prozedur weniger als 2 Stunden, bei direkter Markierung weniger als 1 Stunde.

Das Verfahren wurde auf zwei Zentromer spezifische, repetitive DNA Proben angewendet (pUC 1.77 und D15Z1) [1,2]. Abhängig von der Basensequenz der Proben, war es notwendig, zwei Parameter (Hybridisierungstemperatur und -zeit) zu variieren. Damit konnte eine Optimierung für verschiedene α-Satelliten Proben und verschiedene Anwendungen erzielt werden (3).

Mit geringer Modifizierung war es möglich, eine schnelle Markierung des gesamten menschlichen Chromosoms 11 einer Chinesischer Hamster x Mensch Hybridzellinie durch genomische DNA aus der Humanzellinie nc 37 zu erreichen. Unter denselben Pufferbedingungen wurde FISH an isolierten Chromosomen in Suspension durchgeführt. Dies kann für Modelluntersuchungen zur Detektion von aberranten Chromosomen nach Strahlen- oder chemischer Exposition im Slit-Scan Flußzytometer eingesetzt werden[4].

Es wird ein neues, extrem schnelles Protokol für Chromosomen-Painting ("express chromosome painting", ECP) mit einer kommerziell erhältlichen, direkt markierten Probe für Chromosom 8 vorgestellt [5]. Unter diesen Hybridisierungsbedingungen werden weder "Preannealing" noch denaturierende chemische Agenzien benötigt. Die Renaturierungszeit für das Chromosomen-Painting wurde auf 15 bzw. 30 Minuten reduziert. ECP benötigt ebenfalls nur einen Waschschritt (0,9% NaCl, 0,2% Tween 20), so daß die gesamte Prozedur in weniger als einer halben Stunde abgeschlossen ist.

Literatur:

1 = Celeda et al., Cytometry 17, 13-25 (1994);
2 = Haar et al., Biotechniques 17, 346-353 (1994);
3 = Durm et al., Z. Naturforsch. 51c, 253-261 (1996);
4 = Hausmann et al., Z. Med. Phys. 6, 59-67 (1996);
5 = Durm et al., Z. Naturforsch. 51c, 435-439 (1996)

Automatische Überwachung des Abrißpunkts am Cell Sorter mit Hilfe eines PC's

Joachim W. Ellwart[1], Ingolf Karls[2]
[1]GSF-Institut für Experimentelle Hämatologie, München-Großhadern
[2]Siemens AG, München

Ein konstanter Abrißpunkt des Flüssigkeitstrahls ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für reines Sortieren von Zellen mit abgelenkten Tröpfchen. Die Lage des Abrißpunkts wird herkömmlicherweise vom Operator visuell überwacht. Falls sich der Abrißpunkts verändert, unterbricht der Operator den Sortiervorgang bzw. reguliert die Lage des Abrißpunkts von Hand nach. Dabei treten Verzögerungszeiten auf, in denen falsch sortiert und die sortierte Fraktion verunreinigt wird. Ein weiterer Nachteil der visuellen Überwachung ist bei langdauernden Sortierungen die Bindung des Personals. Bei unserer automatischen Überwachung des Abrißpunkts kann für die Beobachtung des Flüssigkeitstrahls auf Personal verzichtet werden. Weiter wird bei Störungen des Flußsystems, die sich durch das Verschieben des Abrißpunkts bemerkbar machen, der Sortiervorgang nahezu verzögerungsfrei unterbrochen und somit die Reinheit der Sortierung gewährleistet.

Zur automatischen Überwachung des Abrißpunkts verwenden wir einen 486er PC unter MS-DOS mit einem preisgünstigen monochromen Frame Grabber für den ISA-Bus, der das Videosignal der Beobachtungskamera am Cell Sorter in Echtzeit digitalisiert und ein selbst entwickeltes Bildanalyseprogramm, das die Lage des Abrißpunkts ständig errechnet, mit den Koordinaten beim Programmstart vergleicht und bei einer Verschiebung den Alarmfall erkennt. Über ein Relais-Interface wird dann der Sortiervorgang unterbrochen und akustischer Alarm ausgelöst. Dabei entfernt ein Magnet die Sortierröhrchen aus dem Sortierbereich. Um den Operator zu alarmieren verwenden wir eine Sirene oder einen Piepser, der über das Hausfunknetz aktiviert wird. Das Bildanalyseprogramm ist in C geschrieben und läuft unter Windows 3.1.

Fast-FISH und automatische digitale Bildanalyse numerischer Chromosomenaberrationen in Knochenmark- und Blut-Zellkernen hämatoonkologischer Patienten

A. Esa[1], L. Trakhtenbrot[2], M. Hausmann[1], J. Ben-Bassat[2], C. Cremer[1]

1 = Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, Albert-Überle-Str. 3-5, D-69120 Heidelberg

2 = Institut für Hämatologie, Chaim Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel

Klonale Chromosomenaberrationen neoplastischer Zellen werden als Krankheitsmarker genutzt, die diagnostische und prognostische Information liefern. Ebenso lassen sich somit der Patientenstatus überwachen und ein Therapieplan festlegen. Die Fast-FISH Technik [1,2], die auf einer thermischen, Formamid freien DNA Chromosomen Hybridisierung beruht, wurde zusammen mit automatischer Bildanalyse für die Detektion numerischer Aberrationen von Chromosom 8 und 12 in Knochenmarkzellen und Lymphozyten von AML und CLL Patienten eingesetzt. Die Fast-FISH Parameter und die Computeranalyse wurden optimiert. Ein Vergleich zwischen Standard- und Fast-FISH hinsichtlich Sensitivität und Auflösung wurde durchgeführt.

Bei der Fast FISH wurde nach Fixierung der Zellen a) eine simultane Denaturierung von Chromosomen und DNA ohne zusätzliche Agenzien durchgeführt; b) eine erhöhte Hybridisierungstemperatur und c) eine verkürzte Hybridisierungszeit (15 min.) verwendet. Die quantitative Bildauswertung zeigte einen etwa gleich hohen Kontrast nach Fast-FISH wie nach Standard-FISH. Die Aufnahmen wurden mit einer Echtfarben CCD-Kamera (Kappa CF 15 MC) auf einem Leica Fluoreszenzmikroskop ausgeführt. Hierzu und für die Auswertung wurde das Software-Paket Optimas (BioScan, Edmonds, WA, USA) für PC verwendet. In diese Software wurde eine Subroutine implementiert zum automatischen Auffinden und Auswerten von Hybridisierungsstellen [3]. Die Fast-FISH erlaubt somit eine sehr schnelle, reproduzierbare, automatische quantitative Auswertung von Zellkernen mit numerischen Chromosomenaberrationen.

Literatur:

1 = Celeda et al., Cytometry 17: 13-25 (1994);
2 = Haar et al., Biotechniques 17: 346-353 (1994);
3 = Durm et al., Z. Naturforsch. 51c: 253-261 (1996)

Zellkulturvergleich der össären Rekonstruktionsmaterialien Polymaleinat Ionomer Zement und Polymethylmethacrylat

Dr.Dr. S. Haßfeld, Dr. R. Frombach, Dr.Dr. R. Wiedenmann, PD Dr.Dr. J. Zöller

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie,
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 400, 69120 Heidelberg

In einer in vitro-Untersuchung wurden die zwei Knochenersatzmaterialien Polymaleinat Ionomer Zement und Polmethacrylat Refobacin Palacos®, die in der rekonstruktiven Chirurgie Anwendung finden, auf ihre Biokompatibilität geprüft. Für die Kulturversuche wurden 3T3-Mäusefibroblasten verwendet.
Als Testverfahren dienten die quantitative Erfassung des Fibroblastenwachstums auf der Materialoberfläche, die Toxizitätsbestimmung mittel Agar-Diffusionsprüfung (DIN V 13930) und die Analysierung der Phasenverteilung im Zellzyklus mittels Durchflußzytometer.
Der Ionomer Zement wirkte nicht hemmend auf das 3T3-Mäusefibroblastenwachstum. Ab einer Stunde Aushärtungszeit zeigten sich keine toxischen Reaktionserscheinungen. Die im Durchflußzytometer erfaßte Zellzyklusverteilung unterschied sich nicht von der eines auf Glas wachsenden Monolayers. Das Polymethacrylat hemmte das Wachstum der Zellen stark. Erst nach einer Aushärtung von zwei Stunden überlebten die 3T3-Mäusefibroblasten auf der Oberfläche. Auch dann zeigten sich noch ausgeprägte toxische Erscheinungen. Auch am Durchflußzytometer fand sich eine Verschiebung der Phasenanteile im Zellzyklus. Nach einmaligem Durchlaufen des Zyklus reicherten sich die Zellen in der G2-Phase an. Erst nach einer Inkubationszeit von 67 Stunden löste sich der G2-Stop wieder auf.
Wir schließen aus den Ergebnissen, daß der Polymaleinat Ionomer Zement dem Polymethacrylat in klinischen Einsatz überlegen sein sollte. Dies soll in einer klinischen Studie überprüft werden.

Zum Transfer von Lymphozyten durch die Blut/Liquor-Schranke des Menschen

T.O. Kleine*, H.J. Werner*, J. Albrecht**
*Med. Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereiech Neurochemie, Philipps-Universität Marburg
** Becton Dickinson, Heidelberg

Der Tranfer von Blutleukozyten vom Blut durch die Blut-Hirn-Schranke in das Zentralnervensystem (ZNS) benötigt in Tiermodellen 9 bis 12 h. Nur aktivierte T Lymphozyten können diesen transendothelialen Weg passieren [1]. Beim Menschen wurde der Transfer von Blutlymphozyten durch die Blut/Liquor-Schranke mittels FACScan-Analyse in simultan abgenommenen venösen Blut- und Liquor-Proben mit Becton Dickinson Reagenzien untersucht [2,3] und der Quotient aus der Zellzahl im venösen Blut und der Zellzahl im Lumballiquor berechnet.
Bei Kontrollen wurde kein Unterschied zwischen dem Blut/Liquor-Quotient für $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ T Zellen und $CD3^+$ T Zellen gefunden. Beide Zell-Quotienten waren bei akuten und subakuten Meningitiden im gleichen Ausmaß vermindert. Unsere Befunden zeigen keinen erleichterten Transfer von $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ aktivierten T Zellen durch die Blut/Liquor-Schranke bei Patienten an.
Dagegen wurden Hinweise für den LFA-1 : ICAM-2 Adhäsionsweg und den CD2 : LFA-3 Adhäsionsweg bei Patienten gefunden [2], da die Blut/Liquor-Quotienten für $CD3^+LFA1^+$ T Zellen bzw. $CD3^+2^+$ T Zellen niedriger waren als diejenigen von $CD3^+LFA^-$ bzw. $CD3^+2^-$ T Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden für $CD19^+LFA$ und $CD19^+CD2$ B Zellen erhalten.
Zusammengefaßt ist der Transfer von Lymphozyten durch die Blut/Liquor-Schranke bei Kontrollen gering: 1900:1 für $CD3^+$ Zellen, 10 500:1 für NK, und 30 000:1 für B Zellen; bei diversen ZNS-Entzündungen wird der Transfer mittels multipler Rezeptor-Gegenrezeptor-Interaktionen erhöht.

[1] Lassmann H, et al.,Brain Pathology, 1991;1:115-23.
[2] Kleine TO, et al., J Lab med 1996;20:164-5.
[3] Kleine TO, et al., Eur J Clin Chem Clin Biochem 1994;32:45-52.

Veränderungen von Lymphozytenpopulationen und ihrer Cell Homing Rezeptor-Kapazität im Blut nach totalem Schlafentzug beim Menschen

T.O. Kleine*, W. Schreiber**, J. Albrecht***

*Funktionsbereich Neurochemie, **Klinik für Psychiatrie, Med. Zentrum für Nervenheilkunde, Philipps-Universität Marburg
***Becton Dickinson, Heidelberg

Mittels Cosinor-Rhythmometrie wurden im peripheren Blut von gesunden Menschen signifikante circadiane Veränderungen von T Zellen, ihren Subpopulationen und von B Zellen gefunden [1]. Hier wird der Einfluß von totalem Schlafentzug auf diese circadianen Veränderungen untersucht.
Im lysierten venösen EDTA-Blut von vier gesunden Männern wurden mittels FACScan-Analyse die Leukozyten differenziert und Lymphozyten-Subpopulationen mit Becton Dickinson Reagenzien bestimmt [2]. Blutentnahmen erfolgten an 3 aufeinander folgenden Tagen jeweils um 7.00 h, 13.00 h und 19.00 h mit totalem Schlafentzug zwischen dem 1. und 2. Tag und Erholungsschlaf zwischen dem 2. und 3. Tag.
Signifikante Abnahmen der Lymphozytenzahl (um 20% und 31%) wurden im Vergleich zum 1. Tag um 7.00 h am 2. und 3. Tag gefunden (gepaarter t-Test), die Abnahmen um 13.00 h und 19.00 h waren nicht signifikant. Signifikante Abnahmen wurden um 7.00 h auch für $CD3^+$, $CD3^+44^+$ und $CD3^+LFA\text{-}1^+$ T Zellen am 2. und 3. Tag gefunden, dagegen nahmen nur die $CD3^+44^-$ T Zellen zu. Am 3. Tag nahmen um 7.00 h $CD19^+$, $CD19^+44^+$ und $CD19^+LFA\text{-}1^+$ B Zellen signifikant ab und $CD19^+44^-$ und $CD19^+LFA\text{-}1^-$ B Zellen am 2. und 3. Tag teilweise signifikant zu.
Diese Ergebnisse weisen auf eine deutliche Beeinflussung des circadianen Lymphozytenmusters von T und B Zellen im Blut durch totalen Schlafentzug hin, wobei die Veränderungen bei der Expression des homing Receptors CD44 (weniger von LFA-1) auf peripheren Blutlymphozyten Veränderungen bei der Zellverteilung im zellulären Immunsystem anzeigen.

[1] Kleine TO, et al., J Interdiscipl Cycle Res 1993;24:236-8.
[2] Kleine TO, Hackler R, Raffael, A. In: Schmitz G, Rothe G, editors. Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Stuttgart, New York: Schattauer. 1994.217-28.

Detektion von Chromosomenaberrationen nach H_2O_2/L-Histidin Behandlung mittels Slit-Scan Flußfluoormetrie

Heiko Lentfer, Dietmar Wolf, Martin Crone, Klaus Aldinger, Michael Hausmann, Christoph Cremer

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

Als Anwendung für das Heidelberger Slit-Scan System wird die Analyse von Chromosomen und die Detektion dizentrischer Chromosomen nach chemischer Behandlung mit H_2O_2/L-Histidin der Zellen vorgestellt. Durch diese Behandlung werden Doppelstrangbrüche in der DNA induziert, die zu ähnlichen Chromosomenaberrationen wie nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung führen. Die Chromosomen werden aus den Zellen isoliert, mit DNA-spezifischen Fluorochromen gefärbt und in das Flußsystem des Sorters injiziert. Nach der hydrodynamischen Fokussierung des Flusses durchqueren die Chromosomen mit ca. 10 m/s einen bandförmig fokussierten Laserstrahl. Der Fokus beträgt weniger als 2μm in Richtung des Flusses. Somit kann die Chromosomenfluoreszenz zeitaufgelöst angeregt werden. Senkrecht zur Richtung des Laserstrahls und zur Flußrichtung wird die Fluoreszenzverteilung detektiert. Zusätzlich zur Chromosomenlänge und dem relativen DNA-Gehalt werden die relative Zentromerposition und die Anzahl der Zentromere bestimmt. Die Echtzeit-Datenanalyse erlaubt eine schnelle Auswertung und bietet die Möglichkeit, die Chromosomen nach frei wählbaren Parametern zu sortieren. Das Slit-Scan System wurden für die biologische Dosimetrie konzipiert, d.h. beispielsweise um die Häufigkeit dizentrischer Chromosomen zu bestimmen. Typische Beispiele hierzu werden gezeigt. Eine vorläufige Abschätzung der dosisabhängigen Häufigkeit dizentrischer Chromosomen nach H_2O_2/L-Histidin Behandlung wird gegeben. Hierzu wurden auch Vergleichsmessungen mittels quantitativer Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

Literatur:

Hausmann et al., Opt. Eng. 31: 1463-1469 (1992);
Hausmann et al., Microsc. Anal. 7/95: 27-29 (1995);
Hausmann et al., Z. Med. Phys. 6: 59-67 (1996)

Ein neuer flowzytometrischer Test für die Basophiliendegranulation

Thomas Nebe[1], Karin Hartmann[1], Waltraut Pfirrmann[1] und Christiane Bayerl[2]
[1]Institut für Klinische Chemie und [2]Hautklinik, Klinikum Mannheim, D-68135 Mannheim

In der Diagnostik der IgE-vermittelten Hypersensitivität kommt es z.B. bei Patienten mit Insektengift- oder Latexallergien zu Problemen, da der kommerzielle Fluoreszenzimmunoassay für spezifisches IgE (CAP, Pharmacia, Uppsala, Schweden) teilweise versagt hat (falsch negative bzw. positive Testergebnisse) oder weil die Allergene nicht trägergebunden vorliegen. Bei typischer Anamnese und positivem Pricktest war der CAP-Assay oft negativ (Latex) bzw. positiv für Biene *und* Wespe (bei Stich von nur einem Insekt). Daher setzten wir zusätzlich zwei weitere Tests der Basophilendegranulation ein: 1.) einen Immunoassay für acyliertes Histamin (Immunotech, Marseille) und 2.) einen neuen durchflußzytometrischen Ansatz.

Nach Durchsicht der aktuellen Literatur haben wir eine Reihe von Farbstoffen gegen basophile Granula und Oberflächenproteine untersucht, die auf Basophilen exprimiert werden sollen. Wir verglichen einen kürzlich publizierten Test, der IgE und CD45-Expression untersucht mit unserem Test, der die aktivierungsabhängige de novo-Expression eines lysosomalen Proteins (gp55) mißt. Unter Verwendung des chemotaktischen Peptids fMLP als Positivkontrolle erhielten wir eine gute Korelation zwischen Histaminrelease und zytometrischer Antigenexpression. Graspollenallergene als klassisches Allergen wurden von allen drei Tests inklusive CAP erkannt, jedoch Latex nur von denen, die das natürliche Allergen verwenden. Die CD45- und IgE-Expressionsdichten waren nur mit der Direktmarkierung zuverlässig, insbesondere wenn sie gegen eine Titration von Allergen graphisch aufgetragen werden.

Der zytometrische gp55 Test ist leichter und schneller durchführbar, während der Histaminrelease-Test bei niedrigen Konzentrationen deutlich sensitiver ist (2 Dekaden). Jedoch war die Aussage die gleiche und korellierte gut mit der klinischen Diagnose. Daher wird künftig die Durchflußzytometrie einen leichteren Zugang für die Testung solcher Allergene erlauben, die kommerziell nicht verfügbar oder unzureichend validiert worden sind. In Kombination mit dem Lymphozytenaktivierungstest, der die Neoexpression des CD69 Antigens erfaßt, und der Eosinophiliendegranulation sollten auch Medikamentenallergien zukünftig besser analysierbar sein.

Vergleich unterschiedlicher Methoden, Targets und Induktoren von Apoptose

Thomas Nebe[1], Jutta Wucher[1], Monika Bühl[2], Gerolf Maier[1], Ingrid Brechtel[1] and Werner Hirt[2]
[1]Institut für Klinische Chemie, Klinikum Mannheim, D-68135 Mannheim und [2]ORPEGEN Pharma, D-69115 Heidelberg, Germany

In den letzten Jahren hat die Apoptose ein enormes Interesse in der Krebsforschung gefunden, da sie eine neue biologische und pharmazeutische Möglichkeit bietet, Tumorzellen spezifischer und mit weniger Nebenwirkungen zu behandeln. Zur Untersuchung des programmierten Zelltodes sind mehrere biochemische und zytometrische Verfahren publiziert worden. Die ideale Methode sollte in-vitro und ex-vivo funktionieren, um neue Medikamente und pharmakologische Prinzipien zu studieren. Jedoch besteht nach wie vor ein Unterschied zwischen in-vitro Untersuchungen an etablierten Zellinien und dem klinischen Test.
Daher haben wir unterschiedliche durchflußzytometrische Methoden unter der Verwendung von Zellinien und klinischen Proben wie Vollblut und Knochenmark überprüft. Nicht unerwartet zeigten sich mehrere Zytostatika, die gegenwärtig klinisch erfolgreich sind, als potente Induktoren von Apoptose. Interessanterweise waren bestimmte Kombinationen von Zelltypen und Medikamenten effektiver als andere. Selbst klassische Substanzen wie Cortison zeigten eine bemerkenswert heterogene Antwort unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen und Patienten.
Folgende Methoden wurden verglichen:
Methode A (Propidiumjodid (PI)-Ausschluß) mißt den partiellen Verlust der Membranschrankenfunktion mittels Analyse der niedrigen PI-Aufnahme in vitale apoptotische Zellen. Tote Zellen zeigen eine intensive Färbung der DNS, wobei auch hier ein sub-G1-Peak zu beobachten ist, der von ursprünglich apoptotischen Zellen stammen könnte.
Methode B (DNS sub-G1-Peak) analysiert den Anteil fixierter Zellen, der durch die Strangbrüche einen teilweisen DNS-Verlust erlitten hat. Die Zellzyklusanalyse ist dabei entweder mit Propidiumjodid oder dem spektral besser gelegenen 7-Amino-Actinomycin D möglich.
Methode C (Tunel-Methode) mißt den Einbau eines fluoreszenten Nukleotids (dUTP-FITC) nach enzymatischer Amplifikation mit terminaler Desoxynukleotidyltransferase in Kombination mit einer Zellzyklusanalyse oder einer Oberflächenmarkerfärbung. Apoptotische Zellen zeigen niedrigere FSC-Signale und Markerdichten verglichen mit normalen Lymphozyten. Mehrere Modifikationen und Verbesserungen sind für diese Methode beschrieben worden.
Methode D (Annexin V-Bindung) berücksichtigt die Tatsache, daß sich die Zusammensetzung der äußeren Membran der Lipiddoppelschicht durch die Apoptose verändert, was ein starkes Auslösesignal für die Phagozytose darstellt (z.B. für die Entfernung apoptotischer Zellen aus der Zirkulation oder im Thymus). Annexin V-FITC bietet sich hier als spezifischer Ligand bei vitalen Zellen und gleichzeitiger PI- bzw. 7-AAD-Färbung an.
Die Ergebnisse der Vergleiche werden im Lichte der klinischen Erfordernisse diskutiert.

Vergleich verschiedener Techniken der Analyse von Multi-Drug-Resistenz

Thomas Nebe[1], Susan Kranzpiller[1], Verena Zunftmeister[1], M. Muschek[2], M.J. Siegsmund[2], M. Cianfrigtia[3] and Alexandra Dorn-Beineke[4]
[1]Institut für Klinische Chemie, [2]Urologische Klinik, Klinikum Mannheim, D-68135 Mannheim, [3]Inst. f. Sanita Superiore di Roma, Italy[4] und Labor Prof. Seelig, Kriegstraße 99, D-76133 Karlsruhe, Germany

In der letzten Dekade wurde die Multi-Drug-Ressitenz (MDR) von Tumorzellen für das Therapieversagen bei Tumoren verantwortlich gemacht bei Medikamenten, die ein Substrat für den MDR-Transporter (gp170) darstellen.
Für die zytometrische Analyse der MDR wurden bereits mehrere Vorgehensweisen publiziert und in klinischen Studien eingesetzt. Die ideale Methode sollte das klinische Verhalten des gp170 in-vitro und ex-vivo widerspiegeln, um neue Medikamente und pharmakologische Prinzipien studieren zu können. Es existiert nach bisherigen Ergebnissen jedoch eine deutliche Diskrepanz zwischen Laborergebnissen und klinischer Response. Die beste Korrelation wurde bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie unter Verwendung des Rhodamin123 (R123)-Effluxtestes gesehen (Ludescher, Innsbruck).
Die Methoden können einerseits eingeteilt werden in solche, die die Proteinexpression durch Immunhistochemie oder in-situ Hybridisierung darstellen und solche, die die funktionelle Aktivität über Influx oder Efflux von Anthrazyklinen bzw. Indikatorfarbstoffen wie R123 bestimmen.
Die soweit in der Literatur berichteten, enttäuschenden Ergebnisse könnten durch methodische Probleme und Diskrepanzen erklärt werden. Zum Beispiel wurde durch uns in einer Studie an über 80 CLL-Patienten gezeigt, daß Proteinexpression nicht immer mit Efflux korreliert. Daher überprüften wir die durchflußzytometrischen Methoden an Zellinien und klinischen Proben wie peripherem Blut und Knochenmark. Folgende Methoden wurden verglichen:
Methode A (Immunfluoreszenz) mißt die Expression des MDR1-Transporters gp170 auf vitalen Zellen. Mehrere Antikörper gegen intra- und extrazelluläre Domänen des gp170 wurden verglichen.
Methode B (R123-Efflux) analysiert den Abfall der R123 Fluoreszenz nach 15 Minuten Beladungsdauer, einmaligem Waschen und 60 min Abwesenheit des Farbstoffes.
Methode C (DNR-Influx) mißt die Einlagerung eines fluoreszenten, zytostatischen Medikaments (Daunorubicin, DNR) im Vergleich mit einer Kontrolle, die einen Inhibitor enthält (Verapamil) z.T. in Kombination mit einer Oberflächenmarkerfärbung. Das fluoreszente Medikament wird dabei in Konzentrationen eingesetzt, die den tatsächlichen Plasmaspiegeln in vivo entsprechen.
Immunfluoreszenz-Studien an Zellinien mit einer bekannten und schrittweisen, funktionellen Effluxeigenschaft ergaben unbefriedigende Ergebnisse bei dem Versuch, mit verschiedenen Antikörperklonen die zytoplasmatischen Antigene zu quantifizieren. Die zwei von uns getesteten Antikörper gegen Oberflächenepitope (MRK16 und MM4.17) zeigten beide die gleichen abnormen Bindungseigenschaften, d.h. keine Sättigung im üblichen Bereich von 1-10 µg per 1 Million Zellen bei fehlender unspezifischer Bindung an Kontrollzellen. Bei 25-50 µg und immer noch linearem Fluoreszenzanstieg zeigte sich bei einigen Zellinien eine bessere Korrelation zwischen Efflux und Expressionsdichte (RT112, RT112-D21). In dem funktionellen R123-Efflux-Test zeigte sich, daß undichte, tote oder apoptotische Zellen falsch positive Resultate liefern, d.h. Efflux vortäuschen. Daher bauten wir die DNR-Influx-Methode auf. DNR reflektiert außerdem die wahre Affinität zu dem wirklichen Target, der intranukleären DNS, verglichen mit R123, welches loose an Mitochlondrien bindet.
Die vergleichenden Untersuchungen werden diskutiert.

Proliferation versus Apoptose: Die biologische Aktivität von Thymuspeptiden bei Lymphozyten von gesunden Spendern und HIV-Patienten

Thomas Nebe[1], Karin Hartmann[1], Ingrid Brechtel[1], Gerolf Maier[1] and Gerhard Becker[2]
[1]Institut für Klinische Chemie, Klinikum Mannheim, D-68135 Mannheim and [2]Sanorell Pharma, D-72270 Baiersbronn, Germany

Kürzlich wurde ein neuer in-vitro Assay für die Lymphozytenaktivierung beschrieben (VC Maino et al., Cytometry 20:127-133, kommerziell erhältlich als FASTIMMUNE®, Becton Dickinson). Er mißt die Expression von CD69 mittels Durchflußzytometrie, welche bereits 4 Stunden nach mitogener oder antigener Aktivierung in-vitro auf T-Zellen nachweisbar sein soll. Die Autoren gaben eine strenge Korrelation zwischen dem klassischen Test des Thymidin-Einbaus und der CD69-Expression an. Wir untersuchten die in-vitro Effekte von Peptiden aus Kalbsthymus (Thymosand®) auf Lymphozyten mit und ohne Kostimulation durch ConA bei niedrigen Konzentrationen. Drei Ansätze wurden parallel durchgeführt:
Methode A (Proliferationstest) verwendet Ficoll isolierte Lymphozyten, die 72 Stunden bei 37°C in RPMI1640 + 10%FBS mit und ohne ConA und 5% CO_2 und in Gegenwart von Bromodesoxyuridin (BrdU) in den letzten 8 Stunden inkubiert wurden. Der BrdU-Einbau wurde nach Aufschluß der Zellen mittels eines Enzymeimmunoassay (Boehringer Mannheim) ermittelt.
Methode B (Aktivierungstest) verwendet das gleiche Kultursystem mit und ohne ConA. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Analyse des frühen Aktivierungsantigens CD69 auf CD4 bzw. CD8-Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie auf vitalen Zellen.
Methode C (Tunel-Methode) benutzt gleichartige Kulturbedingungen und eine Ernte nach 48 Stunden. Die Zellen wurden zuerst mit CD4-PE und CD8-PE-Cy5 gefärbt, dann fixiert und nach Amplifikation mit dem Enzym terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) die DNS-Strangbrüche mit dUTP-FITC detektiert. Apoptotische T Zellen zeigen eine niedrigeres Engwinkelstreulichtsignal (FSC) und eine geringere Oberflächenmarkerdichte im Vergleich zu normalen Lymphozyten.
Folgende Ergebnisse wurden erzielt:
1) Die Aktivierung nach 4 Stunden ist unzuverlässig und wird nur bei einem Teil der Spender erreicht.
2) ConA bewirkt eine dosisabhängige Aktivierung und Proliferation, die bei Gesunden mehr auf CD4- als auf CD8-T-Zellen ausgeprägt sind, ein Befund der sich bei HIV-Patienten genau umgekehrt verhält.
3) HIV-Patienten zeigen eine höhere Rate an Spontanapoptose, v.a. bei den CD8-Zellen.
4) Thymosand® bewirkt in den Kulturen der Gesunden und HIV-Patienten eine dosisabhängige Suppression der ConA-Aktivierung und noch mehr eine der Proliferation .
5) Der suppressive Effect ist stärker auf den CD8- als auf den CD4-Lymphozyten ausgeprägt und deutlicher bei niedrigeren Konzentrationen des stimulierenden Mitogens.
6) Die Lücke zwischen Aktivierung, gemessen an CD69-Expression und Proliferation (BrdU) ist durch eine erhöhte Rate an Apoptose erklärbar.
Schlußfolgerungen: Die CD69-Expression von T-Zellen korreliert nicht immer mit Proliferation. Der im klinischen Verlauf beobachtete suppressive Effekt der Thymuspeptide aus Thymosand® bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen könnte dadurch erklärt werden, daß die T-Zellen in Richtung Apoptose anstelle von Proliferation dirigiert werden.

Proliferation, Apoptose oder Phagozytose: Der suppressive Effekt von Autoantikörpern auf Lymphozyten von gesunden Spendern und HIV Patienten

T. Nebe[1], G. Maier[1], M. Müller[1], I. Brechtel[1], K. Hartmann[1], F. Thienel[2], B. Buchholz[3], K. Friese[4], A. Willer[5] and K.P. Becker[6]
[1]Institut für Klinische Chemie, [2]I. Med. Klinik, [3]Kinderklinik, [4]Frauenklinik, [5]III. Med. Klinik, [6]Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum Mannheim, D-68135 Mannheim, Germany

In der Immunpathogenese der HIV-Infektion ist die Lymphozytenproliferation schon früh deutlich eingreschränkt, noch bevor die CD4-Zellzahlen abfallen. Diese Suppression erleichtert virale und bakterielle Infektionen, die umgekehrt die CD4-Aktivierung von Lymphozyten und Monozyten und somit die HIV-Replikation induzieren. Daher untersuchten wir die Mechanismen, die zu einem solchen Effekt beitragen könnten. Wir verglichen den Virusload mit Lymphozyten-assoziiertem Immunglobulin, mit Aktivierung und Proliferation nach mitogener Kostimulation, mit Apoptose (s. Tagungsbeitrag Nebe et. al.: Proliferation versus Apoptose) und Phagozytose. Sechs Methoden wurden dazu z.T. parallel angewandt:
Methode 1 (Virusload) bestimmt die gp120-Bindung auf Lymphozyten mittels einer Dreifarb-Immunfluoreszenz (gp120+Goat-anti-mouse-FITC, Blockierung mit Mausserum, dann CD4-PE + CD3-PerCP)
Methode 2 (Virusload) detektiert das lösliche p24-Antigen im Serum nach Dissoziation der Immunkomplexe durch einen Enzymimmunoassay (Abbott, Wiesbaden).
Methode 3 (Lymphozyten-assoziiertes Immunglobulin) mißt humanes IgG und Komplement C3 mit geeigneten Kaninchenantiseren (DAKO, Hamburg) auf T Zellen nach Gegenfärbung mit CD4-PE und CD3-PerCP (Becton Dickinson, Heidelberg).
Methode 4 (Aktivierungstest) verwendet ein Vollblut-Kultursystem mit und ohne polyklonale Stimulation durch das Lektin ConA. Nach 24 Stunden wurde die Aktivierung über die Messung des frühen Aktivierungsantigens CD69 jeweils auf CD4 und CD8 Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie bestimmt (kommerziell erhältlich als FASTIMMUNE®, Becton Dickinson). Der Test korreliert nicht immer mit der Proliferation, wie im o.g. Beitrag zu dieser Tagung gezeigt wird.
Methode 5 (Tunel-Methode) benutzt ähnliche Kulturbedingungen. Hier wurde der Vollblutansatz mit der Dichtegradientenisolierung und eine 24- mit einer 48-stündigen Kulturdauer verglichen. Die Zellen wurden zuerst mit CD4-PE und CD8-PE-Cy5 gefärbt, dann fixiert und anschließend wurden die DNS-Strangbrüche nach Amplifikation mit dem Enzym terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) mit dem fluoreszenten Nukleotid dUTP-FITC (Boehringer Mannheim) detektiert. Apoptotische T Zellen zeigen ein niedrigeres Engwinkelstreulicht (FSC)-Signal und eine niedrigere Oberflächenmarkerdichte verglichen mit normalen Lymphozyten.
Methode 6 (Phagozytosetest) sucht nach der Phagozytose von opsonisierten Lymphozyten durch adhärente Monozyten. Nach einer panoptischen Färbung werden die zwei Tage vorkultivierten Makrophagen, welche einen Lymphozyten aufgenommen haben lichtmikroskopisch gezählt.
Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die CD4-Depletion bei der HIV-Erkrankung diskutiert.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER NACHWEIS VON GERINGEN MENGEN ANEUPLOIDER ZELLEN IM KNOCHENMARK VON ALL-PATIENTEN

U. Oelschlägel, R. Nowak, U. Krebs, A. Schaub, C. Köppel, R. Herbst, G. Stamminger, D. Riemann, P. Hinze, H.-D. Kleine, E. Siegert, G. Ehninger für die Diagnostikstudien-gruppe, Techn. Universität Dresden, Medizinische Klinik I 01307 Dresden.

Bei ALL-Patienten haben numerische Aberrationen vom normalen DNS-Gehalt prognostische Bedeutung. Neben Methoden wie konventioneller Zytogenetik und FISH ist die Durchflußzytometrie eine relativ einfache Methode, um Aneuploidien nachzuweisen. Wir haben Knochenmark von 57 neu diagnostizierten ALL-Patienten hinsichtlich DNS-Gehalt nach zusätzlicher Immunphänotypisierung untersucht. 35% der Patienten wiesen mindestens einen aneuploiden Klon auf. Die 2-Parameteranalyse hat gegenüber der Bestimmung des DNS-Gehaltes allein einige Vorteile: (1) Sie eröffnet die Möglichkeit, den DNS-Gehalt der restlichen normalen Hämatopoese als internen Standard im Vergleich zu dem der Leukämiezellen zu nutzen. Daraus ergibt sich eine höhere Sensitivität beim Nachweis geringgradiger Aberrationen. (2) Bei 8 Patienten konnten Heterogenitäten im DNS-Gehalt festgestellt werden. Mit der biparametrischen Methode war es außerdem möglich zu zeigen, daß diese Heterogenitäten auf der DNS-Ebene mit Differenzen in der Antigenexpression einhergehen können. (3) Die Sensitivität für den Nachweis geringer Anteile an aneuploiden Zellen konnte erhöht werden, was besonders für den Nachweis restlicher Leukämiezellen nach Chemotherapie von Bedeutung ist.
Bei 12 von 18 Patienten wurde mindestens eine follow up Untersuchung bei Remissionskontrolle durchgeführt. Bei 3 von 9 Patienten, die die Kriterien einer kompletten Remission erfüllten, konnten durchflußzytometrisch noch aneuploide Zellen in einer Menge von 0,05% bis 1,10% nachgewiesen werden. Andererseits wies ein Patient, der zytomorphologisch bis zum Tag 189 nur in einer Partialremission war, keine aneuploiden Zellen auf, ist aber auch nach nunmehr 533+ Tagen krankheitsfrei. Der klinische Verlauf deutet hier darauf hin, daß die wiederholt leicht erhöhte Blastenzahl eher auf die regenerierebde normale Hämatopoese als auf restliche leukämische Zellen zurückzuführen ist.
Wir schlagen vor, die durchflußzytometrische Bestimmung des DNS-Gehaltes an zusätzlich immunphänotypisierten Zellen als Ergänzung zur Zytogenetik zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der ALL anzuwenden. Die Relevanz für den Nachwies der minimalen Resterkrankung nach Chemotherapie wird derzeitig in einer prospektiven multizentrischen Studie untersucht.

Diese Arbeiten wurden durch die Firmen Coulter-Immunotech Diagnostics, Becton Dickinson und DAKO Diagnostica unterstützt.

Industrielle Prozeßanalyse:
Flow Cytometrie in der Brautechnologie

Petzold, Louise[1], Müller, Susann[1], Hutter, Karl-Josef[2], Bley, Thomas[3]

[1]Universität Leipzig, Abteilung Biotechnologie, Permoserstr.15, Leipzig
[2]DKFZ Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 280, Heidelberg
[3]TU Dresden, Institut Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Dresden

Heutige technologische Entwicklungen in der Gärführung haben zum Ziel, in immer kürzeren Zeiten ein immer größeres Quantum an Bier zu produzieren. Um die Qualität des dabei entstehenden Produktes sichern zu können, sind andere als die bisher bekannten konventionellen biologischen Analysenmethoden notwendig. Die Durchflußzytometrie ermöglicht eine solche begleitende off- und on-line Analyse des physiologischen Zustandes von Hefen während der Gärung in der Brautechnologie.
Es gibt einige wesentliche Parameter, die die Quantität (d.h. das Ab- und Anschalten der Proliferation) und der Qualität des Produktes (d.h. die Gäraktivität der Hefe) beeinflussen. Dazu zählen, ebenso wie der DNS-Gehalt, der Gehalt an membrangebundenen 3ß-Hydroxysterolen und die Neutralfette. Die Kenntnis dieser drei Parameter ermöglicht die Modellbeschreibung und darauf aufbauend die Ausarbeitung neuer Steuerungsstrategien in der Brauhefeführung.
Parallel zur Gärführung wurden täglich Proben aus den zu untersuchenden ZKG's entnommen und über die Anfärbung jeweils zweier intrazellulärer Parameter (DNS über DAPI / 3ß-Hydroxysterole über NystatinA1-FITC bzw. DNS über DAPI/ Neutralfette über Nilrot) charakterisiert.
Ein hoher Membransterolgehalt zu Beginn der Gärführung bzw. ein hoher Membransterolgehalt der Anstellhefe, gewährleistet durch die schnelle Initiierung der Proliferation eine höhere quantitative Ausbeute an Zellmaterial. Ein hoher Sterolgehalt gegen Ende der Gärführung, vorausgesetzt, die Zellen befinden sich in der G1-Phase des Zellzyklus, garantiert eine Hefe mit ausgezeichneter Gärkraft und langer Lagefähigkeit. Ein hoher Anteil der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus vermindert dagegen die Gärkraft der Hefe, da die Zellen erst den Zellzyklus beenden müssen, bevor sie ihre optimale Gäraktivität erreichen. Das bedeutet oft ein Verlust an Zeit (von bis zu 12 Stunden).
Die Synthese der Neutrallipide ist als Reaktion auf Streßsituationen zu verstehen. Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen verfügen normalerweise über einen geringen Anteil von Neutrallipiden im Gegensatz zu Zellen, die verschiedensten Arten von Limitationen ausgesetzt werden. Neutrallipide dienen der Zelle als Energie- und Kohlenstoffreserve und stellen einen Pool an Sterolen in Form von Sterylestern sicher (sparing function der Sterole für die Proliferation).Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnten Aussagen über den metabolischen Zustand der Hefen im Anstell- und Reifeprozeß getroffen werden, das Auftreten von Störungen in der Stoffwechselsituation der Hefen kann registriert und sofort behoben werden.

ANALYSE VON CHROMOSOMALEN IMBALANCEN IN BIOPSIEN VON ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOMEN UND DEREN VORLÄUFERLÄSIONEN MITTELS MIKRODISSEKTION, UNIVERSALER DNA-AMPLIFIKATION UND VERGLEICHENDER GENOMISCHER HYBRIDISIERUNG (CGH)

Martin SCHEER[1,2,4]; Ruthild WEBER[2,4]; Christof HOFELE[1]; Stefan JOOS[4]; I. Antonio BORN[3]; Peter LICHTER[4]; Joachim ZÖLLER[1]; Thomas CREMER[2,5]

[1]Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, [2]Institut für Humangenetik und [3]Institut für Pathologie der Universität Heidelberg, [4]Deutsches Krebsforschungszentrum, 69120 Heidelberg und [5]Institut für Anthropologie und Humangenetik, 80333 München

Biopsien von potentiell malignen Läsionen der Mundhöhle werden nach Entnahme routinemäßig histopathologisch untersucht. Das Ziel dieser Studie war es, Biopsien mit den histopathologischen Befunden Plattenepithel-Karzinom, Carcinoma in situ und dysplastische Leukoplakie der Mundhöhle mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) näher zu untersuchen. Die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) ist eine neu entwickelte Technik, die in einem einzigen Experiment die Identifizierung von unbalancierten chromosomalen Veränderungen auf genomischer Ebene erlaubt. Verluste, Gewinne und Amplifikationen in der Tumor-DNA können mit einer Auflösung von etwa 10-20 Mbp erkannt und auf normalen Metaphase-Chromosomen lokalisiert werden. Das folgende experimentelle Vorgehen wurde gewählt. Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um die definitive Auswahl von dysplastischen und tumorös veränderten Gewebearealen zu ermöglichen. Die ausgewählten Gewebeareale wurden mit Hilfe einer Mikrodissektionseinrichtung von den Objektträgern abgekratzt. Vor der Analyse auf chromosomale Imbalancen mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) wurde das mikrodissezierte Material durch DOP-PCR universal amplifiziert. Mit dieser Methode konnten chromosomale Veränderungen in Biopsien von oralen Plattenepithelkarzinomen und deren Vorläuferläsionen nachgewiesen werden.

Abstandsmessungen von einzelnen Objekten im Interphasezellkern mit dem Wellenfeldmikroskop

Bernhard Schneider[1], Joachim Bradl[1], Ingolf Kirsten[1], Mathias Nagorni[1], Bernd Rinke[1], Michael Hausmann[1], Christoph Cremer[1,2]

[1] Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, Albert-Überlestr. 3-5, D-69120 Heidelberg.

[2] Interdisziplinäres Zentrum für wissenschaftliches Rechnen (IWR), Universität Heidelberg.

Schlüsselworte: Abstandsmessungen in der Fluoreszenzmikroskopie, Axialtomographie

Eine in der Zytogenetik häufig angewendete Methode bei Untersuchung der Lage von speziellen Regionen in Chromosomen und im Interphasezellkern ist die Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der entsprechenden Stellen mit Hilfe von "in situ Hybridisierung" und deren Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop. Hierbei ist die hochauflösende 3D-Abstandsmessung dieser markierten Objekte eine wesentliche Voraussetzung bei der Untersuchung der funktionellen Topologie des Genoms.

Um die Abstandsmessung von einzelnen, kleinen Objekten in einer Dimension in der Fernfeldmikroskopie zu verbessern, ist es möglich, das zu untersuchende Objekt interferometrisch zu beleuchten (Baily et al. 1993, Lanni et al. 1993). Man erzeugt mit einem Strahlteiler zwei Teilstrahlen und überlagert diese im Objekt. Veränderung des Kreuzungswinkels der beiden Teilstrahlen ermöglicht ein Auseinanderwandern der Intensitätsmaxima. Durch Verschieben des dadurch entstandenen Wellenfeldes ist es nun möglich, verschiedene Bereiche im Objekt zu beleuchten. Es wurde ein Wellenfeldmikroskop realisiert, bei welchem Objektpunkte in Richtung der optischen Achse diskriminiert werden. Um den Einfluß des lokalen Brechungsindexes im Präparat zu untersuchen, wurden die Abstände der Intensitätsmaxima bei verschiedenen Brechungsindizes und Kreuzungswinkeln berechnet. Theoretische Betrachtungen der PSF des Wellenfeldmikroskopes wurden anhand von fluoreszierenden Objekten (Latexbeads Polysience; Ø 140nm; λan 488nm λem ≈520nm) bestätigt. Die Halbwertsbreiten der mittleren Intensitätsmaxima entsprechen 0.14µm.

Um die Abstandsmessung in einer zweiten Dimension zu verbessern, kann man ebenso wie in der Fluoreszenzmikroskopie durch Verwendung einer Quarzglaskapillare oder Glasfaser anstelle eines Objektträgers eine Drehung des biologischen Objektes ermöglichen (Bradl et al. 1994).

B. Bailey, D.L. Farkas, D.L. Taylor & F. Lanni, Nature, 366, 44-48, 1993

F. Lanni, B. Bailey, D.L. Farkas & D.L. Taylor, Bioimaging, 1, 187-196, 1993

J. Bradl, M. Hausmann, B. Schneider, B. Rinke, C. Cremer, J. Microsc., 176, 211-221, 1994

HISTKOM - FELDTEST FÜR TELEPATHOLOGIE UND TELEZYTOLOGIE

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

Im Projekt HISTKOM wurde Ausrüstung für die Telepathologie und Telezytologie entwickelt und in einem Feldtest erprobt. Um alle Ansprüche der Telepathologie abzudecken, wurde die Telemikroskopieausrüstung für die vollständige Fernsteuerung und damit für die anspruchvollste Anwendung - die Schnellschnittdiagnose - entwickelt. Damit der auswärtige Pathologe ein Präparat wie gewohnt durchmustern kann, können nahezu alle Mikroskopfunktionen ferbedient werden. Dies trifft für die x- und y-Koordinaten des Tisches, die Fokusierung, die Vergrößerung, die Kondensoreinstellungen, die Beleuchtung und eine Möglichkeit, entnommene Organe und ganze Objektträger abzubilden, zu. Die Mikroskopstation und die entfernte Betrachtungsstation sind über das ISDN-Netz miteinander verbunden. Übertragen werden das mikroskopische Gesichtsfeld, Sprache und bewegliche Zeiger im Bild. Datenkompression und die Bündelung mehrerer ISDN-Kanäle erlauben einen verbesserten Onlineeindruck beim Benutzer. Gegenwärtig sind 3 Stationen mit unterschiedlichen Mikroskopen in Benutzung, ein 4. System wird im Herbst 96 zusätzlich zur Verfügung stehen. Alle Stationen können untereinder verbunden werden.

Die Benutzeroberfläche ist so gestaltet, daß sie den Pathologen von den meisten Rechnereingaben entlastet, und ihm daher die Konzentration auf seine Auswertung erlaubt. Alle Betriebsparameter, wie Bildfrequenz, Auflösung, Scharfstellen, Beleuchtung können vom System entsprechend seinem Verhalten automatisch eingestellt werden.

An dem Feldtest nehmen ca. 20 Gruppen teil. Jede bekommt für 4 bis 6 Wochen eine Anlage für die Durchführung eigener Versuchsreihen bereitgestellt. Ein erster größerer doppelt blinder Test mit 118 Schnellschnitten aus Lungeneingriffen begann im Herbst 95 und wurde im Frühjahr 96 fertig. Die Kennwerte für die Auswertung sind die Falschpositiv- und die Falschnegativrate sowie die Anzahl der nicht diagnostizierbaren Fälle. Vergilchen wird jeweils mit dem Goldstandard - den konventionellen Paraffinschnitten. Weiter wird der Zeitbedarf für die Erstellung einer Diagnose, die Anzahl der angeschauten Gesichtsfelder sowie deren Vergrößerung und die Anzahl der Objektivwechsel registriert.

HISTKOM ist von der Deutschen Telekom AG und der Robert Bosch Stiftung gefördert. Die Geräte nehmen an dem EU-Projekt EUROPATH teil.

Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Gesellschaft für Zytometrie e.V.
Deutsche Gesellschaft für Zytometrie e.V.
c/o Institut für Genetik der Universität zu Köln
Prof. A. Radbruch
Weyertal 121
D-50931 Köln

Köln,den 11.9.95
Tel.:0221/ 470-3419
Fax:0221/ 470-4970
Email: andreas@gen1.genetik.uni-koeln.de

An die
Mitglieder der
Deutschen Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Einladung zur ordentlichen Mitgliederversammlung

Hiermit möchte ich Sie im Namen des Vorstandes nach §12 der Satzung zur diesjährigen ordentlichen Mitgliederversammlung unserer Gesellschaft einladen.

Die Mitgliederversammlung findet am Freitag, dem 18. Oktober 1996, um 14.00 Uhr im großen Hörsaal des DKFZ-Kommunikationszentrums in Heidelberg statt.

Der Vorstand bittet um zahlreiches Erscheinen. Es müssen ein Drittel der Mitglieder anwesend sein, damit wir beschlußfähig sind.

Tagesordnung

1. Endgültige Festlegung der Tagesordnung u. Feststellung der Beschlußfähigkeit
2. Verleihung des Klaus-Goerttler-Preises
3. Vortrag des Preisträgers
4. Bericht des Vorsitzenden
5. Bericht des Schatzmeisters und der beiden Rechnungsprüfer für 1995/96
6. Entlastung des Vorstandes
7. Wahl eines Versammlungsleiters
8. Wahl des 1. Vorsitzenden
9. Wahl des stellvertretenden Vorsitzenden
10. Wahl des Schatzmeisters
11. Wahl des Schriftführers
12. Wahl neuer Beiratsmitglieder
13. Wahl neuer Rechnungsprüfer
14. Anträge Satzungsänderung
    a) §1: Änderung des Vereinsnamens in "Deutsche Gesellschaft für Zytometrie e.V." s. Anhang 1
    b) §13: Beschlußfähigkeit : von ein Drittel auf ein Viertel der Mitglieder ändern s. Anhang 2
15. Preisverleihung für das beste Logo
16. Zeit, Ort und Hauptthemen der nächsten Jahrestagung
17. Klaus-Goerttler-Preis für Zytometrie 1997 und Reisestipendien 97
18. Weitere Veranstaltungen
19. Verschiedenes

Mit freundlichem Gruß

Bankverbindung Deutschland: Postgiroamt Karlsruhe, Kto.Nr. 849756, BLZ 660 100 75, Postadresse: s.o.
" Schweiz: Postcheckamt 4040 Basel, Kto.Nr. 40-10484-6, Ges. f. Zytometrie e.V. ,Prof. Feichter
" Österreich: Landeshypothekenbank Steiermark Zweigstelle LKH-Graz,Kto.Nr. 20241056288, BLZ 56000, Ges. f. Zytometrie, P. Pürstner

Anhang 1: zu TOP 14

a.) Antrag auf Satzungsänderungen *(Vorstand)*: **§1**

1.) Änderung des Vereinsnamens

Der Vereinsname "Gesellschaft für Zytometrie e.V." soll in "Deutsche Gesellschaft für Zytometrie e.V." umbenannt werden.

Begründung:

Die Voranstellung des Wortes "Deutsche" vor den alten Vereinsnamen soll unterstreichen, daß sich der Verein besonders um den Zusammenschluß der Interessen bzgl. Fragen der Zytometrie des deutschsprachigen Raums bemüht.

neuer Wortlaut der Satzung:

§ 1 Name, Sitz, Geschäftsjahr

Die Gesellschaft führt den Namen Deutsche Gesellschaft für Zytometrie e.V. und ist im Vereinsregister mit Sitz in Heidelberg eingetragen. Geschäftsjahr ist das Kalenderjahr.

Anhang 2: zu TOP 14

b.) Antrag auf Satzungsänderung *(Birgit Mechtold)*: **§13**

§ 13 Beschlußfähigkeit

Die Mitgliederversammlung der Gesellschaft ist beschlußfähig, wenn mehr als ein Viertel der Mitglieder anwesend sind. Der Beirat ist beschlußfähig, wenn mehr als ein Drittel der Mitglieder anwesend sind. Anderfalls kann auf dem Postwege abgestimmt werden.

Begründung:

Da die Gesellschaft ein noch ziemlich schnell wachsender Verein ist, vermutlich auch bedingt durch den niedrigen Jahresbeitrag, treten besonders während der Jahrestagung häufig Personen bei, die in den darauffolgenden Jahren nicht wieder erscheinen.
Dies erhöht zwar einerseits unsere Mitgliederzahl, erschwert aber das zustandekommen der Beschlußfähigkeit in den nachfolgenden Jahren. Seit bestehen des Vereins lag die Teilnehmerzahl bei den Mitgliederversammlungen bei durchschnittlich 55 Mitgliedern (43 -72 MG, ausgen. Briefwahl 103 MG). Da die Mitgliederzahl inzwischen die 200 überschritten hat, wäre bei einer Beschlußfähigkeit bei mehr als einem Viertel der anwesenden Mitglieder eine realistische Chance, die Beschlußfähigkeit während der Jahreshauptversammlung zustande zu bekommen und die sonst anstehende Briefwahl zu umgehen.

Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Gesellschaft für Zytometrie e.V.
c/o Max-Planck-Institut für Biochemie
D-82152 Martinsried

München, den 4.12.1994

GZ-Wahlergebnis 1994

Mitglieder:	**178**	
abgegebene Stimmen:	**103**	
Wahlbeteiligung:	**57.5%**	**Soll: mehr als 1/3 der Mitglieder**
gültige Stimmen:	**94**	
ungültige Stimmen:	**9**	

Die Wahl ist in Anbetracht der abgegebenen Stimmen **gültig**. Im einzelnen wurde folgendermaßen gestimmt:

		Ja	Nein	Enthaltung
Vorstand:				
Vorsitzender:	**Prof.Radbruch**	88	1	5
Stellv.Vorsitzender:	**PD Hemmer**	85	1	8
Schriftführer:	**Prof.Feichter**	88	0	6
Schatzmeister:	**Dipl.Ing.Schwarzmann**	88	0	6
Beirat:				
	Dr.Bley	67	1	0
	Dr.Nüsse	64	0	1
	Prof.Trendelenburg	51	1	2
	Prof.Hadam	45	0	1
	Dr.Tarnok	32	0	1
Kassenprüfer:				
	Dr.Nebe	78	4	4
	Dr.Ulrich	75	0	4

(Prof.Dr.G.Valet)

2. MÜNCHENER ZYTOMETRIEKURS

"GRUNDLAGEN UND ANWENDUNGEN VON DURCHFLUSSZYTOMETRIE UND BILDZYTOMETRIE"

Deutsche Gesellschaft für Zytometrie
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

10. - 13. Juni 1996

Ziel dieses Zytometriekurses ist es, moderne durchfluß- und bildzytometrische Verfahren praktisch zu erlernen. Es werden grundlagenorientierte Untersuchungen an lebenden oder fixierten Zellen (Säugetierzellen, Mikroorganismen, Pflanzenzellen) zu Proliferationsverhalten, Funktionszustand, Zellkern bzw. Chromosomenstruktur, etc. angeboten. Dazu sollen Präparations-, Analyse- und Sortierungsexperimente durchgeführt werden.

1. Instrumentation

Durchflußzytometrie: Prinzipien (Beisker, Kachel)
Bildzytometrie: LSM, Laserpincette, CAS, SAMBA (Hutzler, Minkus, Aubele, Gais)
Neue Methoden: Slit scanning, Fluoreszenz-Lebensdauer, -Polarisation (Beisker)
Datenanalyse (Valet)

2. Methoden

DNA, Chromosomen (Otto, Nüsse)
Bildzytometrie: DNA (Aubele, Gais)
BrdUrd, Zellkinetik, (Beisker, Weller)
Proliferationsmarker (Gilbert, Rhein)
Apoptose (Marx, Nüsse)
Mikrokerne, zytogenetische Effekte (Nüsse)
Phagozytose (Kaffenberger)
Calcium, Lebendparameter (Valet, Grundler, Rothe, Tarnok)
Immunologie, Zellsortierung (Radbruch, Ellwart)
Mehrfarbenmessung von Lymphozyten (Tarnok)
HIV-spezifische Antigene (Kleinschmidt)
Genexpression (Klein)
FISH (Knehr, Lehmann)
Immunzytometrische Untersuchungen an Paraffinschnitten (Aubele)
Isolierung von Einzelzellen und Chromosomenfragmenten mit Laserpinzette (Minkus)
Identifizierung von Bakterien, in situ Hybridisierung mit rRNA Proben (Wallner)
Zytometrie von Hefen, Algen und Pflanzenzellen (Hutter, Schäfer, Ulrich)

Kursdaten:

Ankunft: 9.6.1996 abends oder 10.6.1996 morgens
Kursbeginn: Montag, 10.6.1996 9.00 Uhr
Kursende: Donnerstag, 13.6.1996, ca. 17.00 Uhr
Kursgebühr: Mitglieder der DGZ DM 350.-, Nichtmitglieder: DM 450.-
(Kursunterlagen, Kaffeepausen)
Anzahl der Teilnehmer: ca. 24
Kursort: GSF, Geb. 37, D-85758 Oberschleißheim bei München

Organisation:

Dr. Michael Nüsse, GSF-AG Durchflußzytometrie,
85758 Oberschleißheim
Tel: 089-31873433, Fax: 089-31873349, E-mail: NUESSE@GSF.DE
Anmeldeschluß: 31. Mai 1996

2. Münchener Zytometriekurs
10. - 13. Juni 1996

Vom 10. - 13. Juni 1996 fand der 2. Münchener Zytometriekurs „Grundlagen und Anwendungen von Durchflußzytometrie und Bildzytometrie" im GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg bei München, statt. Er wurde von der Gesellschaft für Zytometrie und der GSF-Durchflußzytometrie von Michael Nüsse 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. 28 Referenten demonstrierten 26 verschiedene Experimente, die zum Teil auch in Großhadern, GSF-Institut für Hämatologie, 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: 2 FACStar* mit jeweils zwei Lasern, FACSCalibur (Becton Dickinson), Coulter XL (Coulter Electronics), MACS (Miltenyi), Konfokales Laser Scanning Mikroskop (Zeiss), Lasermikrostrahl, SAMBA, CAS (Bildzytometrie). Dank gebührt der Fa. Coulter Electronics, die Personal und Geräte zur Verfügung stellte, sowie den Firmen Becton-Dickinson und BIOZOL für finanzielle Unterstützung.

Die 20 Teilnehmer konnten je nach Interesse zwischen den einzelnen Experimenten wählen, die jeweils ein- oder zweimal angeboten wurden. Da mehrere Durchflußzytometer mit qualifizierten Operatoren zur Verfügung standen, konnten viele der 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.

Die Gesellschaft für Zytometrie plant, ähnliche Zytometriekurse alle zwei Jahre anzubieten. Der nächste Zytometriekurs wird deswegen voraussichtlich im Frühjahr 1998 angeboten werden, möglicherweise von einer anderen Institution. Informationen dazu werden rechtzeitig bekanntgegeben.

PROGRAMM

VII. Workshop Flowzytometrie

der ADF
In Zusammenarbeit mit der
Deutschen Gesellschaft für Zytometrie e.V.

FLOWCYTOMETRY IN CLINIC AND SCIENTIFIC RESEARCH

12./13. September 1996

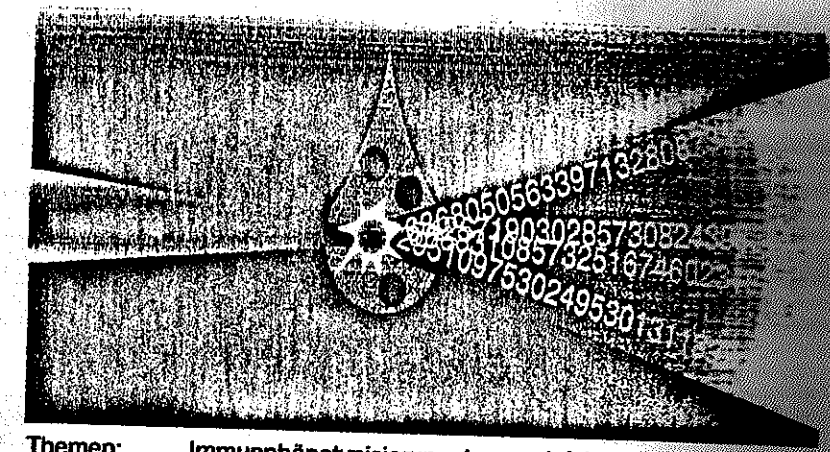
Tagungsort:
Universitätsclub Bonn
Konviktstraße 9 - 53113 Bonn

5. KURS

KLINISCHE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

KLINIKUM MANNHEIM

12. - 17. Oktober 1996



Themen:
- Immunphänotypisierung: Immundefekte, Leukämien, NHL
- Funktionelle Subpopulationen: zytoplasmatische Zytokine
- Abklärung von Anämien: Retikulozyten, ZPP, PNH, MDS
- Thrombozyten: Antigene, Aktivierung, Autoantikörper
- Multi-Drug-Resistenz: Funktion und gp170
- Apoptose: TdT-Assay, PI-Test, CD95
- Phagozytose und oxidativer Burst
- Basophilendegranulation
- Lymphozytenaktivierung und NK-Assay
- LDL-Rezeptortest

Teilnehmer: Vorlesung unbegrenzt, Praktikum 30 Personen

Organisation: T. Nebe und Mitarbeiter, Institut für Klinische Chemie
D-68135 Mannheim, Tel. 0621/383-3486 FAX -3819

3. Kongress für
Flow - Zytometrie und Bildverarbeitung
in der Onkologie

Graz, 25.- 26. April 1997

Tagungsort

Hörsaal der Geburtshilflich - Gynäkologischen

Universitätsklinik Graz

Vorstand: Prof. Dr. R. Winter

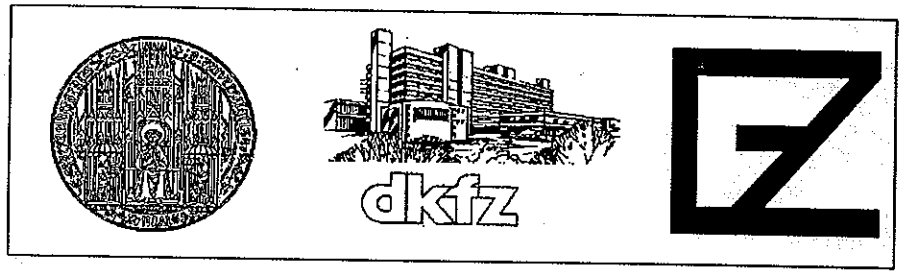
Info und Anmeldung:

P. Pürstner

Tel.: (00)43-316-385-3159

Fax: (00)43-316-385-2477

Einladung



10. Heidelberger Zytometrie Symposium

Tagung der
Deutschen Gesellschaft für Zytometrie e.V.

Heidelberg, 16. bis 18. Oktober 1997

Tagungsort

Kommunikationszentrum
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 280
D - 69 120 Heidelberg
Tel.: 06221 / 42 32 08 Fax: 06221 / 42 26 52
E-mail: m.stoehr@dkfz-heidelberg.de

Organisatoren

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