

Charakterisierung hämopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen: Zellkultur und Multiparameter-Durchflußzytometrie¹

Characterization of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: In-vitro Cultures and Multiparameter Flow Cytometry¹

S. Serke^{2,3}, Ulrike Schneider²

Zusammenfassung: Retrospektive Analysen zeigen, daß bei Transplantationen der Zeitraum der absoluten Neutrozytopenie sowie der substitutionspflichtigen Thrombozytopenie und Anämie von der Anzahl transplanterter hämopoetischer Zellen abhängt. Daher erscheint es sinnvoll, die hämopoetischen Zellen in vitro vor der Transplantation zu bestimmen. Hämopoetische Zellen lassen sich einerseits mittels Kurzzeit-Kulturen anzüchten und damit quantifizieren. Andererseits bietet sich die Multiparameter-Durchflußzytometrie zur Charakterisierung und Quantifizierung der hämopoetischen Zellen an, da diese Zellen in ihrer Gesamtheit das CD34-Antigen exprimieren. Während sich die unterschiedlichen hämopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in Kulturen durch differenzielle Kulturbedingungen unterscheiden, ermöglicht die Multiparameter-Durchflußzytometrie die Charakterisierung der unterschiedlichen Zellen anhand der differentiellen Koexpression von Differenzierungsantigenen. Die Charakteristika der unterschiedlichen hämopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen bei beiden Untersuchungsmethoden werden dargestellt.

Schlüsselwörter: Antigen, CD34; Hämatopoetische Stammzellen; Durchflußzytometrie; Zellkultur; Hämatopoetische Stammzelltransplantation.

Summary: According to retrospective analysis, the length of the hemopoietic recovery-time after transplantation is correlated to the number of transplanted hemopoietic cells. For this reason there is a need for proper determination of these cells prior to transplantation. Cell-cultures as well as multiparameter flow-cytometry are suitable methods. While the various hemopoietic cells differ with regard to optimal culture conditions, flow-cytometry takes advantage of the fact that all hematopoietic cells are expressing the CD34 antigen. Differential co-expression of differentiation-antigens allows for sub-dissection of CD34-expressing cells into stem- and progenitor-cells. This report describes the features of the various hemopoietic stem- and progenitor-cells.

Keywords: Antigens, CD34; Hematopoietic Stem Cells; Flow Cytometry; Cells, Cultured; Hematopoietic Stem Cell Transplantation.

In-vitro Zellkulturen

Vor genau 30 Jahren berichteten *Plutznik* und *Sachs* [1] erstmals über die Möglichkeit, in einer in-vitro Zellkultur mit Agar als semi-solider Matrix Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Maus zu klonalem Wachstum zu bringen. Die Terminologie entscheidend geprägt hat *Donald Metcalf*, der Vorläuferzellen, welche klonal in den in-vitro Kulturen anzüchtbar sind, funktionell als „CFU“ („colony forming unit“) bezeichnete [2]. Hiermit sind die zwei wesentlichen funktionellen Eigenschaften einer jeden mittels in-vitro Kulturen zu charakterisierenden hämopoetischen Zelle definiert. Eine einzelne Zelle, aus dem Blut oder aus dem Knochenmark, ist zu klonaler Expansion fähig. Die durch diese klonale Expansion entstehenden Zellen liegen in der in-vitro Kultur als mehr oder weniger kompakter Zellhaufen („colony“) vor. Die in-vitro Kultursysteme sind prinzipiell sehr einfach aufgebaut. Vier Hauptkomponenten finden sich in ihnen: der Kulturbedeälter, in der Regel 35x10 mm Plastik-Petrischalen; die semi-solide Matrix, bestehend aus Agar, Methylzellulose oder Fibrin; das Kulturbedeum; die Wachstums- und Differenzierungsfak-

¹ Vorgetragen auf dem 4. Symposium der Reihe „Standardmethoden in der Hämatologie“ des Arbeitskreises Hämatologische Laborarbeit, Qualitätssicherung und Normung, DGHO-Jahrestagung Oktober 1995 in Hamburg

² Hämatologisches Labor, Abteilung Innere Medizin und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie-Onkologie, Virchow-Klinikum, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

³ Korrespondenzadresse: Priv.-Doz. Dr. med. S. Serke, Abteilung Innere Medizin und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie-Onkologie, Virchow-Klinikum, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin. Fax: +49-30-4505-3914

⁴ Die Erstellung der Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Krebschilfe (PN 10360)

⁵ Eingegangen am 21. Aug. 1995

toren [2]. Aus den einzelnen Stamm- bzw. Vorläuferzellen sind die jeweiligen „colonies“ zu charakteristischen Zeitpunkten, nach 7 Tagen bis zu 28 Tagen, voll entwickelt. Zu diesen Zeitpunkten wird die Quantifizierung der „colonies“ durch Mikroskopie entweder in den nativen Kulturen oder nach speziellen Färbungen [3] vorgenommen.

Die weitaus am häufigsten mittels in-vitro Kulturen bestimmte hämoopoetische Zelle wird als „CFU-GM“ („colony forming unit -granulocyte/macrophage“) bezeichnet. Sie ist die determinierte Vorläuferzelle der Granulozyto-Monozytopoese und die von ihr generierte „colony“ benötigt etwa 12 bis 14 Tage zur vollständigen Entwicklung. Zu diesem Zeitpunkt besteht eine solche „CFU-GM colony“ aus etwa 50 bis 500 Zellen (Granulozyten und Monozyten), wobei die Reifungsform des Myelozyten überwiegt. Als Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren benötigt die „CFU-GM“, teils alternativ, Interleukin-3 (Il-3), Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor („granulocyte/macrophage-colony stimulating factor“, „GM-CSF“), Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor („G-CSF“) und Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor („M-CSF“) [4].

Der „CFU-GM“ entspricht in der Erythropoese die „CFU-E“ („colony forming unit-erythroid“), sie bildet nach etwa 8 Tagen Kulturdauer „colonies“ aus 20 bis 200 Erythroblasten. Als „BFU-E“ („burst forming unit-erythroid“) wird die frühe erythroid-determinierte Vorläuferzelle bezeichnet. Sie bildet nach 12 bis 16 Tagen in der Kultur multizentrische Kolonien, bei denen jede einzelne Subkolonie einer „CFU-E colony“ entspricht. Als Faktoren benötigt die „CFU-E“ einzig Erythropoetin (Epo), die BFU-E hingegen benötigt neben Epo auch zusätzlich Il-3 bzw. „GM-CSF“ und/oder Stammzellfaktor („stem cell factor“, „SCF“). Sowohl die „CFU-GM“ als auch die „CFU-E“ und „BFU-E“ lassen sich zuverlässig in Methylzellulose-Kulturen anzüchten und daher sind sie die am weitesten untersuchten hämoopoetischen Zellen.

Die determinierte Vorläuferzelle der Megakaryozytopoese wird als „CFU-Meg“ („colony forming unit-megakaryocyte“) bezeichnet. Sie bildet nach 16 bis 22 Tagen der Kultur „colonies“ aus 4 bis 40 Megakaryoblasten bzw. Megakaryozyten [5]. Der entscheidende Differenzierungsfaktor der Megakaryozytopoese ist das Thrombopoetin [6].

Die als „CFU-Mix“ bezeichnete Zelle bildet nach etwa 16 Tagen „colonies“, welche Zellen aller hämo-poetischen Linien aufweisen [7]. Diese Zelle weist also Pluripotenz auf. Als Vorläuferzelle besitzt sie je-

doch – wie auch die „CFU-GM“, die „BFU-E“, die „CFU-E“ und die „CFU-Meg“ – nicht die Fähigkeit zur Selbstreplikation auf identischem Differenzierungsniveau („self-renewal“). Diese Eigenschaft besitzen allein die als Stammzellen anzusprechenden Zellen. Die am weitesten differenzierte Stammzelle bzw. Stammzell-nähe Vorläuferzelle ist die „HPP-CFC“ („high proliferative potential-colony forming cell“). Diese Zelle ist durch zwei Eigenschaften gekennzeichnet: ihr Proliferations- und Differenzierungs-Potential wird durch eine 12- bis 24-stündige Inkubation in 5-Fluoruracil-haltigem Medium nicht beeinträchtigt und sie bildet, nach etwa 28 Tagen der Inkubation, „colonies“, bestehend aus mehreren tausend Zellen. Diese Zellen sind nahezu ausschließlich reife neutrophile Granulozyten [8]. Es finden sich aber auch vereinzelt in einer solchen „HPP-CFC-colony“ Blasten mit der Fähigkeit des „self-renewal“. Die relevanten Faktoren für die Kultivierung der „HPP-CFC“ sind Il-3 und „GM-CSF“ [9].

Die „CFU-BI“ („colony forming unit-blast“) ist eine weitere mittels in-vitro Kulturen definierte Stammzelle. Sie generiert nach etwa 21 Tagen Inkubation sehr kleine Kolonien von etwa 20 bis zu 100 Zellen. Diese stellen sich in der panoptischen Färbung als undifferenzierte Blasten dar. Werden diese Zellen aus der „colony“ entnommen und erneut in Kultur gebracht, so bilden sie teils erneut „CFU-BI-colonies“, teilweise bilden sie dann auch „CFU-GM-“ und „BFU-E-colonies“. Die kritischen Faktoren für das Wachstum der „CFU-BI“ sind Il-1, Il-3, „GM-CSF“ und „SCF“.

Die als „LTC-IC“ („long term culture-initiating cell“) bezeichnete Stammzelle ist die einzige mittels in-vitro Kultur definierte Zelle, welche ausschließlich funktionell, aber nicht morphologisch definiert ist. Zudem wird diese Zelle nicht in semi-soliden Kulturen, sondern in Flüssigkulturen mit einer adhärenen Zellschicht von Stromazellen gezüchtet. Über eine Dauer von bis zu 6 Monaten werden sequentiell in Wochenabständen die nicht-adhärenen Zellen aus der Flüssigkultur entnommen und in sekundäre semi-soliden Kulturen zur Anzüchtung der „CFU-GM“ überführt. Auf die Anzahl der „LTC-IC“ wird dann von der Anzahl der „CFU-GM“ rückgeschlossen [11].

Insgesamt ist die Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus unterschiedlichen Laboratorien nur gering, da die Kulturbedingungen von Labor zu Labor recht stark variieren. Ein Schritt hin auf eine gewisse Standardisierbarkeit der Ergebnisse bedeutet sicherlich der Einsatz standardisierter Kultur-Systeme (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada), welche vorgetestetes Material für Methylzellulose- und für Flüssigkulturen beinhalten.

Multiparameter-Durchflußzytometrie

Von vornherein ist zu bedenken, daß die Multiparameter-Durchflußzytometrie keine unabhängige Bestimmungsmethode für hämoopoetische Stamm- und

Nicht standardisierte Abkürzungen: BFU, burst-forming unit; BI, blasts; CD, cluster of differentiation; CFC-HPP, high proliferative potential colony-forming cell; CFU, colony-forming unit; CSF, colony-stimulating factor; E, erythroid; FITC, Fluorescein-5-isothiocyanate; GM, granulocyte-macrophage; Il, interleukin; LTC-IC, long term culture-initiating cell; Meg, megakaryocyte; SCF, stem cell factor; Thy, thymocyte.

Vorläuferzellen darstellt. Die Erkenntnisse, welche unter Verwendung der Durchflußzytometrie gewonnen wurden und werden, sind nur unter Bezugnahme auf die in-vitro Kulturen zu verstehen. Insbesondere die Tatsache, daß alle hämpoetischen Zellen das CD34-Antigen exprimieren, hat der Durchflußzytometrie zu der hochgeschätzten Bedeutung hinsichtlich der Bestimmung hämpoetischer Zellen verholfen. Das transmembrane CD34-Antigen, dessen wesentliche immunogene Strukturen extrazellulär liegen, weist verschiedene Epitope auf. Eine Reihe monoklonaler Antikörper sind verfügbar, welche diese unterschiedlichen Epitope erkennen. Entsprechend der Sensibilität der verschiedenen Epitope gegenüber Glykoproteasen werden drei Epitop-Klassen des CD34-Antigens unterschieden (Tabelle 1) [12]. Während neoplastische hämpoetische Zellen nicht in jedem Falle alle Epitope des CD34-Antigens simultan exprimieren, findet sich eine solche simultane Expression aller CD34-Epitope auf physiologischen Zellen in jedem Fall [13]. Hilfreich bei der immunologischen Detektion hämpoetischer Zellen ist, daß das CD34-Antigen nur von hämpoetischen Stamm- und Vor-

läuferzellen exprimiert wird, wobei die Expressionsstärke mit zunehmender Reifung abnimmt [14]. Die „CFU-E“ weist beispielsweise nur noch eine minimale CD34-Expression auf [15].

Während die Verfügbarkeit von CD34-Antikörpern die Bestimmung hämpoetischer Zellen mittels Durchflußzytometrie überhaupt ermöglicht, erlauben zwei Möglichkeiten dieser Technik die Charakterisierung der unterschiedlichen hämpoetischen Zellen. Selbst bei Untersuchung mit Routine-Durchflußzytometern lassen sich neben dem CD34-Antigen zwei weitere Antigene simultan untersuchen. Außerdem können neben der Antigenexpression auch die Streulichteigenschaften jeder einzelnen Zelle erfaßt werden. Somit lassen sich die hämpoetischen Zellen anhand eines Musters von Streulichteigenschaften und Koexpression von Differenzierungsantigenen bestimmen [16]. Die Tabelle 2 stellt die wesentlichen mit Durchflußzytometrie ermittelten Eigenschaften bei durch Zellkultur definierten hämpoetischer Stamm- und Vorläuferzellen dar.

Die so hinsichtlich der Charakterisierung hämpoetischer Zellen mittels Durchflußzytometrie gewonne-

Tabelle 1 Definition der Klasse I-, II- und III-Epitope des CD34-Antigens sowie die monoklonalen Antikörper der entsprechenden Spezifität

| Epitopklasse | Neuraminidase | Pasteurella Glykoprotease | CD34-Klon |
|--------------|---------------|---------------------------|--|
| I | + | + | My-10, B13C5, IMMU 133, IMMU 409, ICH3, 12.8 |
| II | - | + | QBEND/10 |
| III | - | - | 8G12, TUEK3, 581, Birma K3, 115.2 |

Tabelle 2 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (Auswahl): Charakteristika in der Darstellung mittels Multiparameter-Durchflußzytometrie

| Zelltyp | Charakteristika | Referenz |
|---------|---|------------------|
| LTC-IC | CD34 pos [#] , CDw90pos, HLA-DR neg, CD38 neg, CD33 neg, CD71-neg, CD45RA neg, CD45RB pos, CD45RO pos, Vorwärtsstreulicht gering, Seitwärtsstreulicht gering | [27] |
| CFU-B1 | CD34 pos, HLA-DR pos/neg, CD38 neg, CD33 neg, CD71 neg, Vorwärtsstreulicht gering, Seitwärtsstreulicht gering | [28] |
| HPP-CFC | CD34 pos, CDw90 pos, HLA-DR neg, CD71 neg | [29] |
| CFU-GM | CD34 pos, HLA-DR pos, CD33 pos, CD45RA pos/neg, CD45RO pos, Vorwärtsstreulicht gering bis mittelstark, Seitwärtsstreulicht gering | [14, 30, 31, 32] |
| BFU-E | CD34 pos, CD33 pos/neg, CD71 pos, CD45RA pos/neg, CD45RO pos, Vorwärtsstreulicht gering bis mittelstark, Seitwärtsstreulicht gering | [15,33] |

[#] Die Bezeichnungen „pos“ bzw. „neg“ beziehen sich auf die Expression des jeweiligen Differenzierungs-Antigens: neg, fehlende Koexpression; pos, vorhandene Koexpression; pos/neg, widersprüchliche Literaturangaben

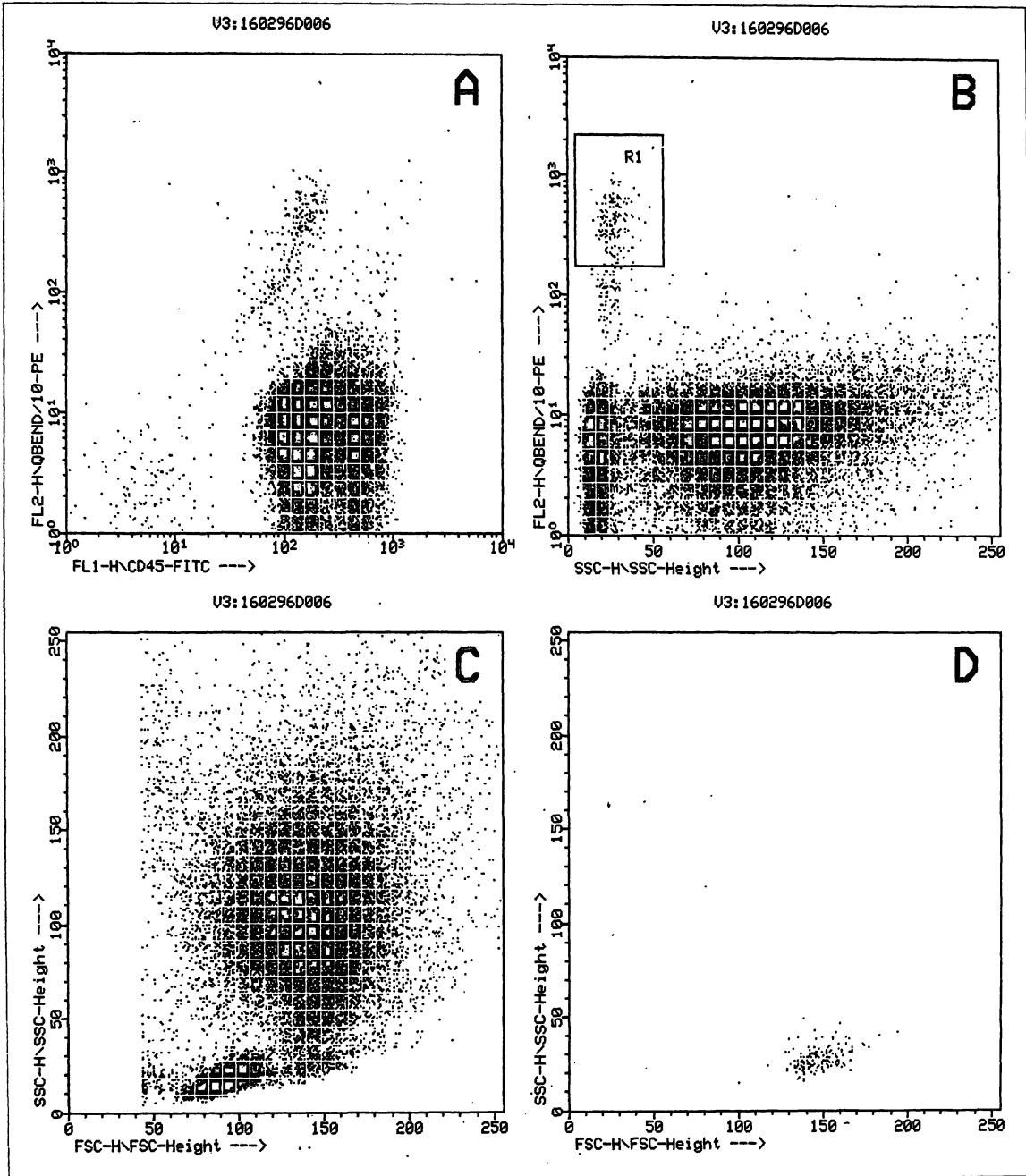


Abbildung 1 Detektion der CD34-exprimierenden Zellen: Peripheres Blut, Mobilisations-Therapie mit Chemotherapie und Filgrastim (Neupogen); „dot-plot“-Darstellung, d.h. ein Punkt entspricht einer Zelle; alle Zellen sind dargestellt;
 A Korrelationsdarstellung der Parameter „CD45-Expression“ (x-Achse) und „CD34-Expression“ (y-Achse); eingesetzter CD34-Antikörper ist QBEND/10 (Klasse-II), (Immunotech-Coulter, Marseille, Frankreich); die CD34-exprimierenden Zellen weisen eine Koexpressionsstärke des CD45-Antigens wie Granulozyten auf;
 B Korrelationsdarstellung der Parameter „Seitwärtsstreulicht“ (x-Achse) und „CD34-Expression“ (y-Achse); prägnant stellt sich die durch die Analyse-Region R1 gekennzeichnete Population der CD34-exprimierenden Zellen dar; bestimmt wurden 168 CD34-exprimierende Zellen bei 25 000 Zellen insgesamt;
 C Korrelationsdarstellung der Parameter „Vorwärtsstreulicht“ (x-Achse) und „Seitwärtsstreulicht“ (y-Achse); Darstellung aller Leukozyten;
 D Korrelationsdarstellung der Parameter „Vorwärtsstreulicht“ (x-Achse) und „Seitwärtsstreulicht“ (y-Achse); Darstellung der durch R1 in B erkannten CD34-exprimierenden Zellen.

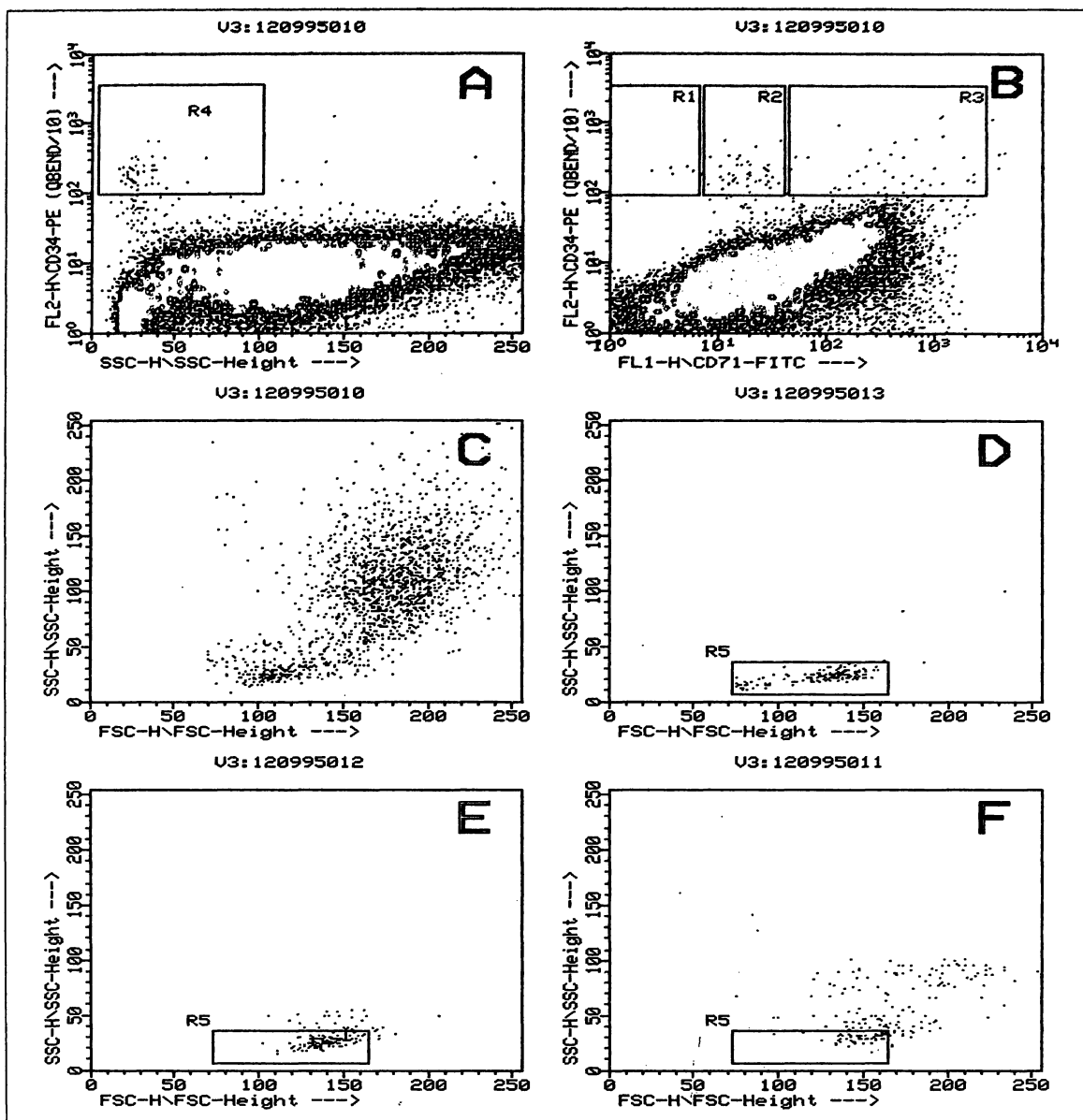


Abbildung 2 Charakterisierung der Subpopulationen der CD34-exprimierenden Zellen; Peripheres Blut, wie in Abbildung 1 beschrieben; „dot-plot“-Darstellung.

A Korrelationsdarstellung der Parameter „Seitwärtsstreuung“ (x-Achse) und „CD34-Expression“ (y-Achse); in der Region R4 finden sich die CD34-exprimierenden Zellen;

B Korrelationsdarstellung der Parameter „CD71-Expression“ (x-Achse) und „CD34-Expression“ (y-Achse); arbiträr werden, entsprechend der Expressionsstärke der übrigen Leukozyten-Populationen, drei Subpopulationen der CD34-exprimierenden Zellen gemäß der Expressionsstärke des CD71-Antigens unterschieden: R1 (fehlende bis schwache Expression), R2 (mittelstarke Expression); R3 (starke Expression);

C,D Korrelationsdarstellungen der Parameter „Vorwärtsstreuung“ (x-Achse) und

E,F „Seitwärtsstreuung“ (y-Achse);

C Darstellung aller Leukozyten;

D Darstellung der CD34-exprimierenden Zellen mit fehlender bis schwacher Koexpression des CD71-Antigens (Zellen in R1 in B);

E Darstellung der CD34-exprimierenden Zellen mit mittelstarker Koexpression des CD71-Antigens (Zellen in R2 in B);

F Darstellung der CD34-exprimierenden Zellen mit starker Koexpression des CD71-Antigens (Zellen in R3 in B);

Während sich in D sehr kleine Zellen (x-Achse von 70 bis 100) neben der Hauptpopulation (x-Achse von 120 bis 150) darstellen, fehlt diese kleine Population in E und F; erkennbar ist auch, daß eine kontinuierliche Größenzunahme der Zellen in der Reihenfolge D - E - F erfolgt. Die Region R5 wurde in D, E und F an identische Stelle gesetzt, damit diese Größenänderung leichter erkennbar ist.

nen Ergebnisse sind jedoch nur von relativer Bedeutung, da sie in jedem Falle nur eine Wahrscheinlichkeitsbetrachtung, nicht aber eine diskrete Bestimmung, erlauben. Sicherlich hat die Vancouver-Gruppe gezeigt, daß nahezu alle „LTC-IC“ neben dem CD34-Antigen das CDw90-Antigen (Thy-1) exprimieren. Werden jedoch mittels Zell-Sortierung durchflußzytometrisch gewonnene Zellen des Phänotyps CD34+CDw90+ bei einer Reinheit von 99% in-vitro kultiviert, so zeigt es sich, daß nur etwa 7% der Zellen dieses Phänotyps funktionell als „LTC-IC“ darstellbar sind. Es liegt also eine Klonogenität, häufig auch als „plating efficiency“, von etwa 7% vor. Daraus ergibt sich, wie oben angemerkt, daß nur eine äußerst grobe Abschätzung der Anzahl der unterschiedlichen hämo-poetischen Stamm- und Vorläuferzellen mittels Multiparameter-Durchflußzytometrie möglich ist.

Die Vorteil der Multiparameter-Durchflußzytometrie liegt sicherlich in der raschen Verfügbarkeit der Untersuchungsergebnisse und in dem relativ geringen Aufwand der Methode. Daher eignet sich diese Methode insbesondere zum „monitoring“ während der Mobilisationsphase und zur Abschätzung des hämo-poetischen Potentials des Leukozytapherese-Produkts [18, 19]. Während etwa 14 Tage zwischen der Proben-gewinnung und dem Ablesen der Zellkulturen liegen, sind die Ergebnisse der Durchflußzytometrie schon etwa 3 Stunden nach Probengewinnung verfügbar.

Im Rahmen dieser Routine-Diagnostik ist es in der Regel ausreichend, die Gesamtmenge an Zellen, welche das CD34-Antigen exprimieren, zu bestimmen. Eine Untersuchung der Subpopulationen der CD34-exprimierenden Zellen kann heute, aus den oben geschilderten Gründen, noch nicht als routinefähig angesehen werden. Zudem liegen Arbeiten vor, die eindeutig zeigen, daß eine bestimmte Anzahl von CD34-exprimierenden Zellen, nämlich etwa $5 \times 10^6/\text{kg}$ Körpergewicht, regelhaft eine sichere und rasche hämo-poetische Rekonstitution gewährleisten [20, 21]. Einen ähnlich prädiktiven Wert stellt die Anzahl der „CFU-GM“/kg Körpergewicht dar [22].

Unser Vorgehen zur Bestimmung der CD34-exprimierenden Zellen ist wiederholt und aktualisiert dargestellt worden [23, 24, 25]. Folgendes Vorgehen wird für alle Arten von Untersuchungsmaterialien empfohlen:

1. Verarbeitung innerhalb von 24 Stunden nach Probengewinnung; Lagerung der Probe bei Raumtemperatur in Ruhe und verdünnt (siehe 2.).
2. Einstellen der Leukozyten-Konzentration auf etwa 10.000 / μl durch Verdünnung in Ca- und Mg-freiem Phosphat-Puffer
3. Ansetzen von 2 Test-Röhrchen mit jeweils 200 μl Probe:
 - a) Färbung mit CD45-Antikörper-FITC und Isotyp-Antikörper-PE
 - b) Färbung mit CD45-Antikörper-FITC und CD34-Antikörper-PE
4. Inkubation für 25 min

5. Lyse der Erythrozyten mit Fixans-freiem Lyse-Reagenz (ORTHO-mune, ORTHO, USA)
6. Zentrifugation
7. Durchflußzytometrie

Da die CD34-exprimierenden Zellen eine sehr kleine Population darstellen, sollte vor Ansetzen der Test-Röhrchen bedacht werden, ob, und wenn ja, wieviele Aliquots angesetzt werden müssen. Soll die Sensitivität der Quantifizierung etwa 0,1% betragen, so müssen pro Messung zumindest 50.000 Zellen erfaßt werden, damit theoretisch ein Variationskoeffizient von 15% erreicht werden kann bei effektiv 50 erfaßten CD34-exprimierenden Zellen [26].

Die Abbildungen 1 und 2 stellen repräsentative Ergebnisse aus peripherem Blut unter Mobilisationstherapie mit Chemotherapie und Filgrastim dar. Aus der Abbildung 1 wird deutlich, daß die CD34-exprimierenden Zellen ein charakteristisches Streulichtprofil aufweisen. Diese Tatsache erleichtert ganz wesentlich die Bestimmung, da in der Korrelationsdarstellung der Parameter „CD34-Expression/Seitwärtsstreulicht“ die CD34-exprimierenden Zellen diskret zur Darstellung gelangen.

In der Abbildung 2 wird gezeigt, daß sich die Subpopulationen der CD34-exprimierenden Zellen einerseits durch die unterschiedliche Expression von Differenzierungs-Antigenen, hier CD71, und durch unterschiedliche Streulicht-Charakteristika unterscheiden.

Trotz der Vielzahl an Möglichkeiten, die die Multiparameter-Durchflußzytometrie hinsichtlich der Charakterisierung hämo-poetischer Stamm- und Vorläuferzellen im Bereich der experimentellen Forschung bietet, hat diese Methode im diagnostischen Bereich nur eine gesicherte Indikation. Diese stellt die Quantifizierung der Gesamtpopulation aller CD34-exprimierenden Zellen dar.

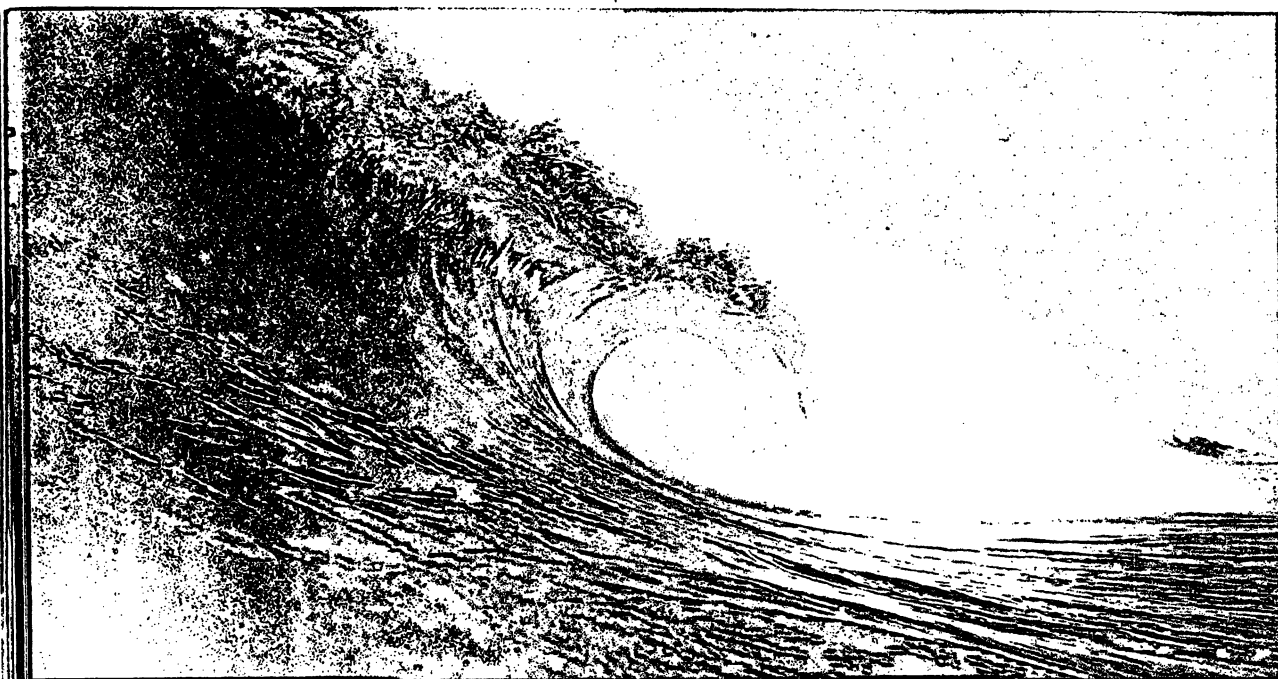
Literatur

1. Plutznik DH & Sachs L. The cloning of normal „mast“ cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 1965;66:319-23.
2. Metcalf D. Hemopoietic colonies. *Recent Results Cancer Res* 1977;61.
3. Serke S, Säuberlich S, Huhn D. A liquid culture method for the in vitro growth of haemopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood allowing for analysis by multiparameter flow-cytometry. *Eur J Haematol* 1991;46:85-92.
4. Serke S & Huhn D. Effects of various recombinant human hemopoietic growth factors (rhEpo, rhG-CSF, rhGM-CSF, rhIL-3) on the growth of peripheral blood progenitor cells (CFU-GM, BFU-E). *Blut* 1990;61:25-9.
5. Vainchenker W, Breton-Gorius J, Bouguet J, Guichard J. Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors. *Blood* 1979;54:940-5.
6. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994;369:568-71.
7. Fauser AA & Messner HA. Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood* 1978;52:1243-8.
8. McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM

- et al. De tection of a human CFC with high proliferative potential. *Blood* 1989;74:609-12.
9. Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA et al. Identification, purification, and biological characterization of hemopoietic stem cell factor from Buffalo rat liver conditioned medium. *Cell* 1990;63:195-201.
10. Leary AG & Ogawa M. Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood* 1987;69:953-6.
11. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 1989;74:1563-70.
12. Sutherland DR, Marsh JC, Davidson J, Baker, MA, Keating A, Mellors A. Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by pasteurized haemolytic glycoprotease: implications for purification of CD34-positive progenitor cells. *Exp Hematol* 1992;20:590-9.
13. Serke S, Huhn D. Detection of CD34 class I, II, and III epitopes on haemopoietic cells. *Cytometry* 1996;im Druck.
14. Bühring HJ, Asenbauer B, Katrilaka K, Hummel G, Busch FW et al. Sequential expression of CD34 and CD33 antigens on myeloid colony-forming cells. *Eur J Haematol* 1989;42:143-9.
15. Serke S, Abe Y, Kirsch A, Huhn D. Phenotyping of peripheral blood hemopoietic progenitor cells - in vitro cultures using CD34-/CD33-immunomagnetic purging. *Eur J Haematol* 1991;47:361-6.
16. Kreissig C, Kirsch A, Serke S. Characterization and measurement of CD34-expressing hemopoietic cells. *J Hematother* 1994;3:263-290.
17. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993;177:1331-42.
18. Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Lansdorp PM et al. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hemopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 1991;77:400-409.
19. Serke S, Zingsem J, Zimmermann R, Huhn D, Eckstein R. Optimierung der Leukozytapheresen zur Gewinnung zirkulierender hämoopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen durch Multiparameter-Durchflußzytometrie. *Beitr Infusionsther* 1993;31:124-9.
20. Haas R, Hohaus S, Ehrhardt R, Godschmidt H, Hunstein W. Mobilization of blood stem cells with recombinant human (rh) G-CSF in patients with hematological malignancies and solid tumours. In: Wunder E, Henon PR, editors. *Peripheral blood stem cell autografts*. Berlin (Deutschland) Springer Verlag, 1993:155-67.
21. Bender JG, To LB, Williams S, Unverzagt C, Haylock DN. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother*. 1992;1:329-42.
22. To LB, Dyson PG, Juttner CA. Cell dose effect in circulating stem cell autografting. *Lancet* ii.1986;404
23. Serke S, Säuberlich S, Huhn D. Multiparameter flow cytometrical quantitation of circulating CD34-positive cells: correlation to the quantification of circulating haemopoietic progenitor cells by in vitro colony assay. *Br J Haematol* 1991;77:453-9.
24. Sovalat H, Serke S. Identification of CD34-positive cells by multiparameter flow-cytometry. In: Wunder E, Henon PR, editors. *Peripheral blood stem cell autografts*. Berlin (Deutschland) Springer Verlag, 1993:107-27.
25. Wunder E, Sovalat H, Fritsch G, Silvestri F, Henon P, Serke S. Report on the european workshop on peripheral blood stem cell determination and standardization. *J Hematother* 1992;1:131-43.
26. Säuberlich S, Kirsch A, Serke S. Determination of CD34-hemopoietic cells by multiparameter flow cytometry: technical remarks. In: Wunder E, Sovalat H, Henon PR, Serke S, editors. *Hematopoietic Stem Cells*. Dayton (USA) AlphaMed Press, 1994:45-60.
27. Udumsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid DS, Eaves AC, Eaves CJ. Characterization of primitive hemopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood* 1992;80:2513-2521.
28. Bernstein ID, Leary AG, Andrews RG, Ogawa M. Blast colony-forming cells and precursors of colony-forming cells detectable in long-term marrow culture express the same phenotype (CD33-CD34+). *Exp Hematol* 1991;19:680-2.
29. Brandt JB, Srouf EF, van-Besien K, Briddell RA, Hoffman R. Cytokine-dependent long-term culture of highly enriched precursors of hemopoietic progenitor cells from human bone marrow. *J Clin Invest* 1990;86:932-941.
30. Lansdorp PM, Sutherland HJ, Eaves CJ. Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow. *J Exp Med* 1990;172:363-6.
31. Craig W, Poppema S, Little MT, Dragowska W, Lansdorp PM. CD45 isoform expression on human hemopoietic cells at different stages of development. *Br J Haematol* 1994;88:24-30.
32. Fritsch G, Buchinger P, Printz D, Fink FM, Mann G et al. Rapid discrimination of early CD34+ myeloid progenitors using CD45RA analysis. *Blood* 1993;81:2301-9.
33. Lansdorp PM, Dragowska W. Long-term erythropoiesis from constant numbers of CD34+ cells in serum-free cultures initiated with highly purified progenitor cells from human bone marrow. *J Exp Med* 1992;175:1501-9.



Powerful Test Kits



Streptokokken-Identifizierungs-Test

Latex-Agglutinationstest zur schnellen Identifizierung der Streptokokken-Gruppen A,B,C,D,F und G mittels enzymatischer Extraktion



Strep Plus



Latex-Agglutinationstest zur schnellen Identifizierung der Streptokokken-Gruppen A,B,C,F und G mittels Säureextraktion



Pyr Test



Kolometrischer Schnelltest zum Nachweis der PYRase-Aktivität von Streptokokken



Clearview Strep A

Schneller *S.pyogenes* - Antigennachweis in Rachenabstrichen auf Basis des patentierten Clearview - Immunoassays.

Informationen von :

Unipath GmbH
Am Lippeglacis 4-8 , 46483 Wesel
Service - Telefon : 0281 / 152-246 / -254
Telefax zum Nulltarif : 0130 / 82 57 66

Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 5. überarbeitete und erweiterte Auflage M. Hesse, H. Meier, B. Zech. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1995, 364 pp., 221 Abbildungen, 100 Tabellen, 19,5 x 24 cm, kartoniert, DM/SFr 82,-, ÖS 640,-, ISBN 3-13-576105-3.

Hier liegt ein „Lehrbuch“ für den Studenten der Chemie und den organischen Chemiker vor, das das Handwerkszeug für die Anwendung der spektroskopischen Methoden in der organischen Chemie vermittelt. Lohnt sich dann Rezension und Lektüre für den Laborarzt und Klinischen Chemiker? Die Rezension auf jeden Fall, sind doch die Autoren Institutsleiter für organische Chemie an zwei verschiedenen Universitäten und einem Weltunternehmen der chemischen Industrie. Die Lektüre ebenfalls, wenn der Leser als klinischer Chemiker oder Laborarzt der Thematik nahesteht, unbedingt, wenn er als Analytiker in Wissenschaft und Praxis auf diesem Gebiet aktiv tätig ist.

War dieses Werk in seiner 1. Auflage 1971 noch als „Übersichtskompodium“ konzipiert, so ist es jetzt zu einem „Lehrbuch“ (Vorwort zur 5. Auflage) herangewachsen. Es gliedert sich in 5 Teile, die nachfolgend mit Teilkapiteln vorgestellt werden.

Kapitel 1: UV/VIS-Spektren. Dieses (kürzeste) Kapitel beinhaltet den Zusammenhang zwischen Elektronenübergängen und spektraler Lichtabsorption, beschreibt Chromophore, Anwendungen, die Derivativ-Spektroskopie, chiroptische Methoden (Polarimetrie) und nicht zuletzt die Probenvorbereitung.

Kapitel 2: Infrarot- und Raman-Spektren. Schon dem wenig spezialisierten Analytiker ist die IR-Spektroskopie, direkt als Absorption im IR-Bereich oder indirekt als Streustrahlung im RAMAN-Bereich geläufig. Dargestellt werden wiederum die Probenvorbereitung, dann die klassischen und die Fourier-Transform-IR-Spektrometer; anschließend findet sich eine wertvolle Übersicht über charakteristische Absorptionen, sowohl von Einfach- wie auch Doppelbindungen bei Aliphaten und Aromaten mit vielen Beispielen von IR-Spektren.

Kapitel 3: Kernresonanz-Spektren. Dieses erste Hauptkapitel stellt zunächst die physikalischen Grundlagen vor, wie Resonanzphänomen, chemische Verschiebung, Spin-Spin-Koppelung, Linienbreite und Intensität. Ausführlich geschildert werden die ^1H - und ^{13}C -Kernresonanz-Spektroskopie, als Beispiele: Moleküle mit „festen“ Kernpositionen, z. B. 1,1,2-Trichlorcyclopropan oder disubstituierten Benzolderivaten, Systeme mit innermolekularer Beweglichkeit, z. B. 1-Chlormethyloxiran-1-carbonsäure (p-nitrophenyl)ester oder Systeme nach chemischen Austauschprozessen, z. B. temperaturabhängige ^{13}C -NMR-Spektren von Bullvalen. Weiter Unterkapitel beschreiben die Probenvorbereitung und Aufnahme der Spektren in der CW- und PFT-Technik; ^1H -chemische Verbindungen, ^1H , ^1H -Koppelungen, Koppelungen mit anderen Kernen sowie Methyl-, Methy-

len-, Methin-, Olefin-, Aldehyd- und andere Protonenverschiebungen. Geschildert werden Spin-Entkopplungen, NOE (Nuclear Overcome Effect) und INDR- (Internuclear Double Resonance)-techniken, zweidimensionale ^1H -NMR-Spektroskopie und Spektrensimulation. Das Folgekapitel über ^{13}C -Spektroskopie führt diese Linie fort: ^{13}C -chemische Verbindungen, Koppelungen mit sich selbst und mit H, D, F, N und P, und Verschiebungen innerhalb der Strukturelemente, sowie Inkrement-Systeme zu deren Abschätzungen. Eine Reihe nur den Spezialisten zugänglichen Besonderheiten, z. B. (unveröffentlichte) Diagramme zur ^1H , ^{13}C -Heteronuclearen Verschiebungskorrelation von 4,7-Dimethoxy-2,3-dimethylindol in DMSO- d_6 , zeigen die Intensität des Inhaltes. Wertvoll: über 400 NMR-Spektrendaten exemplarischer Vertreter der wichtigsten Verbindungen, sie beschließen dieses Kapitel.

Kapitel 4: Massenspektren. Hier tritt der Lehrbuchcharakter wieder stärker hervor. Nach den einleitenden Beschreibungen von Prinzip, Instrumentierung und Aufnahmetechniken bilden die Ausführungen über Hauptfragmentierungsreaktionen organischer Moleküle den einen, die über thermische Reaktionen den anderen Schwerpunkt. Stichworte: alpha-, Benzyl- und Alkyl-Spaltung, Spaltung „nichtaktivierbarer“ Verbindungen, Diels-Alder-Reaktion, McLafferty-Umlagerungen, Onium-Reaktion, CO-Verlust u. a. Das letzte Unterkapitel behandelt Markierungsreaktionen, u. a. chemische-, Elektrospray-, Feld-, Fast-Atom Bombardement-Ionisation sowie die für den Klinischen Chemiker wichtige GC/MS-Kombination.

Prof. W. Appel, Karlsruhe

Diagnostica-Industrie: 3,5% Umsatzzuwachs bei unbefriedigender Ertragslage

Anlässlich der Mitgliederversammlung des VDPH - Verband der Diagnostica-Industrie e.V. - am 29. Februar 1996 in Frankfurt am Main berichtete der Vorsitzende, Dr. *Rudolf Gallien*, daß die Diagnostica-Industrie in Deutschland entgegen den ursprünglichen Prognosen 1995 noch ein Umsatzwachstum von 3,5% erzielt hat. Allerdings hat sich die Ertragslage trotz des Umsatzanstiegs weiter verschlechtert.

Der rückläufige Ertragsrend tendiert sich daraus, daß das Mengenwachstum erneut, wie in den Vorjahren, mit ca. 10% deutlich über dem Umsatzwachstum lag.

Der seit Jahren zu beobachtende Ertragsrückgang in der Diagnostica-Industrie führt nicht nur zu Fusionen und Übernahmen, sondern gefährdet nach Auffassung von *Gallien* auch die Innovationsfähigkeit, da der hohe Forschungsaufwand nicht mehr zu finanzieren sein wird. In den zurückliegenden Jahren hat die Diagnostica-Industrie im Schnitt 13% ihres Umsatzes in die Forschung investiert. Die Deutsche Diagnostica-Industrie liefert ca. 25% der weltweit benötigten Diagnostica und ist mit mehr als 70% Exportanteil einer der exportintensivsten Industriezweige Deutschlands.

Die Europäische Harmonisierung im Medizinproduktebereich wurde von *Gallien* positiv bewertet. Die von der Europäischen Kommission mit Augenmaß vorbereitete spezielle Richtlinie für In-vitro-Diagnostica wird von der Deutschen Diagnostica-Industrie grundsätzlich begrüßt. Damit sollen der Europäische Wirtschaftsraum auch für diesen Bereich verwirklicht und bisher noch existierende Handelshemmnisse abgebaut werden. Aus Sicht der Industrie kommt es jedoch entscheidend darauf an, bei den weiteren Beratungen überzogene Reglementierungen zu vermeiden.

Zu den zum 1. Januar 1996 neu gestalteten Gebührenordnungen wies Dr. *Volker Oeding*, Mitglied des VDPH-Vorstandes, darauf hin, daß im Bereich der Laborleistungen restriktive Regelungen getroffen und Chancen verpaßt wurden. Möglichkeiten zur Strukturvereinheitlichung, zur Vereinheitlichung der Gebührensätze, zur Einführung von methodenunabhängigen Vergütungen und zur Angleichung des Leistungsumfanges wurden nicht realisiert. Auch existierenden Probleme, neue und wichtige Tests in die Gebührenordnung aufgenommen zu bekommen.

Dierk Meyer-Lüerßen

3RD DRESDEN SYMPOSIUM ON AUTOANTIBODIES Hotel Bellevue Dresden, 25. - 28. September 1996

Autoantigens, autoantibodies and their role in the pathogenesis of autoimmune diseases

(E. M. Tan, La Jolla; K. M. Pollard, La Jolla; A. Rosen, Baltimore)

Pathogenic idiotypes of autoantibodies in autoimmunity

(M. Lorber, Haifa; P. Youinou, Brest; Y. Shoenfeld, Tel-Aviv)

New aspects of autoantibody detection

(R. L. Humbel, Luxemburg; B. Liedvogel, Freiburg; H. Grosjean, Paris)

Silica exposure and autoimmunity

(K. Conrad, Dresden; G. Gregorini, Brescia)

Autoantibodies and neurological diseases

(A. J. Steck, Basel; K. G. Warren, Alberta; A. Henneberg, Ulm)

Wissenschaftliche Leitung:

Dr. Karsten Conrad, Institut für Immunologie
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
Tel.: 0351-88 32-767; Fax: 0351-88 32-778

Organisation & Information:

Blackwell GCM mbH
Sarah Rogge / Monika Porstmann
Riedemannweg 59-60, 13627 Berlin
Tel.: 030-3 83 70-751; Fax: 030-3 83 70-789