

Diagnostik von Ataxia telangiectatica mittels Durchflußzytometrie und Zellzyklusanalyse

Detlev Schindler, Alexandra Sobeck

Zusammenfassung

Traditionell hat sich die Analyse von Metaphasechromosomen im Hinblick auf Brüche und Rearrangements als diagnostisches Werkzeug für die Identifizierung und Bestätigung von Syndromen mit chromosomaler Instabilität entwickelt. Bei diesen Syndromen findet sich jedoch in der Regel verminderte Zellproliferation und oft sind Metaphasen spärlich. Darüber hinaus ist die mikroskopische Analyse von Metaphasen mühselig und zeitaufwendig; deshalb wird lediglich eine relativ geringe Anzahl (50–100) ausgewertet. Aus diesem Grunde wurde eine einfache, schnelle und teilweise automatisierte Technik entwickelt, die mikroskopische Analysen in Bezug auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ergänzen oder ersetzen kann. Bei dieser Form der Diagnostik wird Durchflußzytometrie eingesetzt. Die Methode beruht auf der Zellzyklusanalyse von in vitro stimulierten peripheren Blutlymphozyten, kultivierten lymphoblastoiden Zellen oder Fibroblasten nach ionisierender Bestrahlung. Die Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie wurde erfolgreich angewandt in der Diagnostik von Ataxia telangiectatica (AT) und dem Nijmegen Breakage Syndrom (NBS).

Schlüsselwörter

Ataxia telangiectatica, Nijmegen Breakage Syndrom, Durchflußzytometrie, Zellzyklus

Summary

Diagnostics of ataxia telangiectasia by flow cytometry and cell cycle analysis

Traditionally, the evaluation of metaphase chromosomes for breaks and rearrangements has evolved as the diagnostic tool for the identification and confirmation of syndromes associated with chromosomal instability. However, these syndromes show poor cell proliferation, and often metaphases are not abundant. Moreover, the analysis of metaphases at the microscope is cumbersome and time-consuming, and only limited numbers (50–100) are scored. Therefore, a simple, fast and, in part, automated procedure has been developed which can complement or substitute microscopic analyses with regard to accuracy and reproducibility. This alternative assay using flow cytometry employs cell cycle analysis of peripheral blood lymphocytes activated in vitro, cultured lymphoblasts, or fibroblasts following ionizing radiation. The cell cycle test has successfully been applied to the diagnosis of ataxia telangiectasia (AT) and the Nijmegen breakage syndrome (NBS).

Keywords

Ataxia telangiectasia, Nijmegen breakage syndrome, flow cytometry, cell cycle

Hintergrund

Methoden zur Diagnostik für Ataxia telangiectatica (AT) sind ungezählt. Beschränkt man die Betrachtung auf solche, die Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung als spezifisches Diagnosekriterium erfassen (1), findet man drei Hauptkategorien: (a) Methoden, die auf Chromosomenanalysen beruhen (2), (b) andere, die radioresistente DNA-Synthese messen (3) und (c) schließlich solche, die Zellüberlebens- und Zellklonierungsraten vergleichen (4). Darüber hinaus verbleibt ein heterogener Rest. Molekulargenetische Mutationsanalyse ist aufwendig und hat bisher nicht die erhofften Detektionsraten erbracht (5); sie kann derzeit Primärdiagnostik auf zellulärer Ebene nicht ersetzen.

Die Vielzahl möglicher Nachweisverfahren für AT steht in auffälligem Gegensatz zu ihrer mangelnden praktischen Verfügbarkeit. In wenigen Labors wird auch nur eine der Methoden in der Routinediagnostik durchgeführt. Die Fülle der Diagnoseverfahren, die Anwendung unterschiedlicher Untersuchungstechniken in verschiedenen Labors und beschränkte Kapazitäten weisen darauf hin, daß sich keine der Methoden als gut praktikabel erwiesen hat.

In dieser Situation kann die zunehmende Verfügbarkeit von Analysegeräten auf Zellflußbasis (6,7) dazu beitragen, Verbesserung der AT-Diagnostik in Handhabbarkeit und Durchsatz herbeizuführen, so daß eine breite Inanspruchnahme im Sinne abgewogenen Screenings möglich ist. Durchflußzytometrie steht seit langem im Dienste der Analyse von Zellwachstum. In einem standardisierten Untersuchungsverfahren zur Diagnostik von AT wird Durchflußzytometrie zur Zellzyklusanalyse an Kulturen bestrahlter Zellen eingesetzt (8). Hier wird auf die methodischen Grundlagen dieser Technik und damit erzielte Ergebnisse eingegangen.

Durchführung der Untersuchung

Für die Diagnostik notwendig sind mindestens 5 mL steriles Blut versetzt mit je 0,1 mL (500 IU) Heparin pro 5 mL Volumen. Mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Paque

(Dichte 1,077 g/mL) werden mononukleäre Zellen isoliert. Jeweils 5×10^5 Zellen werden in 3.6 mL RRMI-1640-Zellkulturmedium eingesät. Während eine Kultur unbehandelt bleibt, wird eine andere mit 1,5 Gy bestrahlt; dieser Wert stellt eine diagnostisch relevante Dosis dar. Die ionisierende Strahlung stammt aus einer ^{60}Co -Quelle, wie sie zur therapeutischen Bestrahlung von Patienten verwendet wird. Es kann jedoch ebenso gut eine Röntgenröhre benutzt werden. Dosimetrie ist in jedem Falle notwendig. Danach wird das Medium in beiden Kulturansätzen mit Zusätzen versehen, so daß folgende Endkonzentrationen zustandekommen: 15% FBS, 1% autologes Plasma (aus der betreffenden Blutprobe, zur Verbesserung des Zellwachstums), 1,2 mg/mL PHA (zur Lymphozytenstimulation), 10^{-4} M 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU, als Thymidinanalogon) und 2×10^{-5} M 1-Monothioglycerin (als reduzierendes Agens zur Verbesserung des Zellwachstums). Das Endvolumen beträgt 5 mL. Zur Lichtabschirmung werden die 50-mL-Kulturflaschen in Aluminiumfolie umhüllt im Inkubator aufrecht eingestellt. Die Kulturdauer beträgt 72h bei $37,5^\circ\text{C}$ in 5%- CO_2 -Atmosphäre. Kulturen von lymphoblastoiden Zellen (B-LCL) und Fibroblasten werden analog angesetzt und behandelt. Bei Fibroblastenkulturen wird allerdings eine geringere BrdU-Konzentration ($0,8 \times 10^{-4}$ M) und zusätzlich 2-Deoxycytidin in äquimolarer Konzentration verwendet. Die Kulturdauer bei B-LCL beträgt nur 48h, da diese Zellen nicht aus einer Ruhephase heraus aktiviert werden müssen.

Nach der Kultivierung werden die Zellen geerntet und abzentrifugiert. Sie können entweder gleich gefärbt und vermessen oder aber in Medium mit 10% FBS und 10% DMSO aufgenommen und bei -20°C eingefroren werden. Zur Färbung wird das Zellpellet in einem Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,154 M NaCl; 0,5 mM MgCl_2 ; 1 mM CaCl_2 ; 0,2% BSA und 0,1% Nonidet P40) aufgenommen, so daß die Zelldichte ca. $4 \times 10^5/\text{mL}$ beträgt. Es schließt sich eine Doppelfärbung der DNA an: Zunächst wird mit Hoechst 33258 (Endkonzentration 1,2 mg/mL für 15 min bei 4°C) inkubiert, dann

wird Ethidiumbromid hinzugefügt (Endkonzentration 1,5 mg/mL bei 4°C). Die Färbung geschieht im Dunkeln. Die doppelgefärbten Proben sind einige Stunden lang stabil. Bei der Messung im Durchflußzytometer werden die Einzelzellen bzw. Zellkerne in einem Hüllstrom aus Wasser hydrodynamisch fokussiert. Sie werden perlchnurartig hintereinander in einer Flußkammer, vergleichbar dem Objektträger beim Mikroskop, am Objektiv vorbeigeführt, das wie beim Fluoreszenzmikroskop gleichzeitig Excitationslicht auf den Zellstrom leitet und emittiertes Licht zurückführt. Beides wird durch geeignete Spiegel, Farbteiler und Sperrfilter voneinander getrennt. Analytische Geräte haben generell bessere Auflösung als präparative (Cell Sorter). Die einfachsten Instrumente besitzen eine einzige Anregungslichtquelle mit breitem Spektrum, das den UV-Bereich umfaßt (Quecksilberhochdrucklampe HBO, Spektrum ca. 300 bis 800 nm) und Zweikanal-Datenaufnahme (zwei Photomultiplier), die simultane Fluoreszenzsignale (blau und rot) messen und einem gemeinsamen Ereignis (Einzelzelldetektion) zuordnen (PAS II, Partec, Münster). Zur Weiterverarbeitung der aus optischen in elektronische umgewandelten Signale besitzt das Gerät ein Interface mit Analog-Digital-Wandler und Impulshöhen-Analysator. Die Daten werden auf einen PC übertragen und in Files abgelegt. Die Datenanalyse geschieht mit speziellen Auswertungsprogrammen wie MPLUS (IBM-kompatibel) oder MPLUSAV (unter WINDOWS-Oberfläche, beide Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

Warum Durchflußzytometrie?

Analytische Flußzytometrie fügt der mikroskopischen Analyse die statistische Dimension hinzu. Bei einer Flußrate zwischen 100 und 300 Zellen pro Sekunde beruht jede Messung auf 50 000 bis 100 000 Zellen, die ein einzelnes Zytogramm bilden. Subjektivität ist minimiert. Durchflußzytometrie detektiert nicht nur den geringen Prozentsatz von Zellen einer Kultur in Mitose, sondern auch alle Interphase-Zellen (9). Diese Tatsache ist in besonderem Maße vorteilhaft für schlecht proliferierende Kulturen von Zellen mit AT-Genotyp. Durchflußzy-

tometrie gestattet potentiell, abhängig von apparativer Ausstattung und angewandter Methode, Multiparameter-Analyse (Zellkern, Zytoplasma, Zelloberfläche).

Was erkennt die Durchflußzytometrie?

AT gehört zu jener Gruppe von Erkrankungen (AT; Nijmegen Breakage Syndrom, NBS; Xeroderma pigmentosum, XP; Cockayne Syndrom, CS; Thiotrichodystrophie, TTD; Werner Syndrom, WS; Bloom Syndrom, BS; Fanconi Anämie, FA), denen Mutationen in Genen gemeinsam sind, die als „Caretaker“-Gene beschrieben wurden – Gene, die bekannter- oder vermutetermaßen für die Integrität der DNA verantwortlich sind (10). Mutationen in beiden Allelen dieser Gene finden ihren Ausdruck in häufigem Vorkommen präferentieller Typen von Neoplasien, die charakteristisch für das jeweils betroffene Gen und die Erkrankung sind (AT und NBS, lymphoretikuläre Tumoren; WS, Sarkome; BS, alle Arten von Leukämien; FA, akute myeloische Leukämie, Schleimhautkarzinome) (11). Mutationen in diesen Genen (Tumor-Suppressor-Gene) führen in vivo zu gesteigerter Sensitivität gegenüber bestimmten exogenen Noxen. Spezifische Sensitivität reflektiert unterschiedliche Arten von DNA-Schäden, die als Folge des jeweiligen Gendefektes persistieren. Spezifische Sensitivität stellt auch die Grundlage von in vitro Provokationsmethoden dar, die ein wichtiges diagnostisches Instrumentarium bilden.

Durchflußzytometrie mißt in diesem Kontext Veränderungen der normalen Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation. Wichtiges Kriterium ist die Anhäufung von G2-Phase-Zellen (12). Nach DNA-Verdopplung in the S-Phase bildet die G2-Phase das Stadium, in dem Synthesefehler bei der Replikation und sonstige Schäden, die durch die inhärente thermodynamische Instabilität der DNA und die Gegenwart freier Radikale kontinuierlich entstehen (Einzel- und Doppelstrangbrüche, apurinisierte und apyrimidinierte Stellen, verschiedene Basenderivate und DNA-DNA- bzw. DNA-Protein-„Crosslinks“), normalerweise erkannt und repariert werden, damit ge-

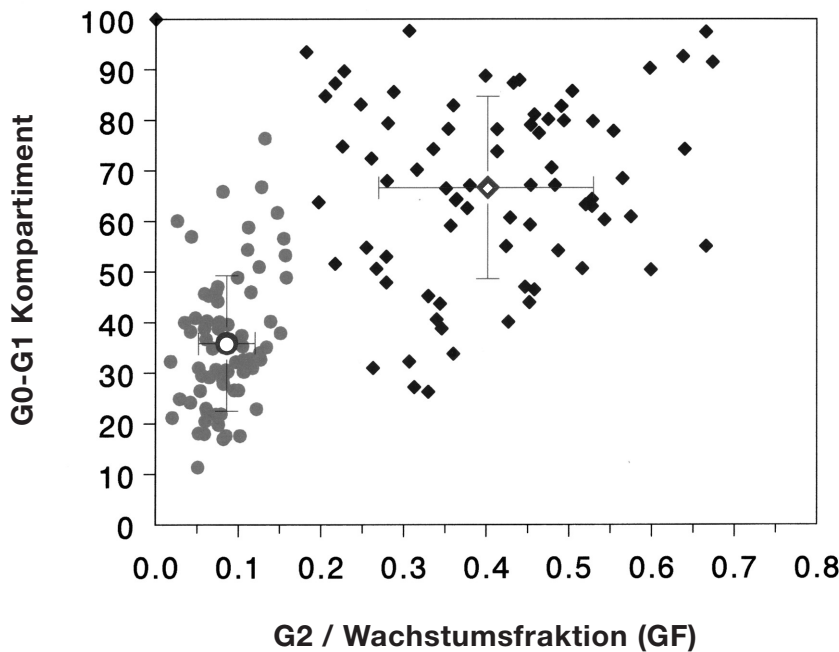


Abb 1
AT-Diagnostik an Kurzzeitkulturen peripherer Blutlymphozyten
 Bestrahlung mit 1.5 Gy.

Der Zellanteil in der G2-Phase des 1. Zyklus im Verhältnis zur Wachstumsfraktion (G2/GF, Abszisse) ist jeweils aufgetragen gegen den Prozentsatz nicht stimulierbarer Zellen aus der gleichen Kultur (G0-G1-Phase, Ordinate). Die schwarzen Rauten kennzeichnen 76 AT-Patienten, die grauen Punkte 75 normale Kontrollen. Durch entsprechende offene Symbole dargestellt sind jeweils Mittelwert plus/minus eine Standardabweichung.

nomische Läsionen nicht an die Tochterzellen weitergegeben werden. In der Diagnostik von AT (und NBS) wird durch ionisierende Strahlung vermehrt ein Typus von DNA-Schäden induziert (13), der bei diesen Gendefekten nur unvollkommen beseitigt wird. Der zelluläre Survey-Apparat erkennt am G2-Phasen-Checkpoint DNA/Chromatinschäden. Infolgedessen bleibt ein Signal für den Eintritt der betreffenden Zelle in die Mitose aus (14, 15). Durchflußzytometrie mißt hier im Prinzip veränderte Radioaktivität wie andere in der AT-Diagnostik verwendete Verfahren auch. Bestimmte DNA-Schäden werden durch ionisierende Bestrahlung induziert, als spezifischer Ausdruck des Gendefekts aber nicht entfernt (Strahlensensitivität) (1). Sie treten in der durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse als G2-Phasen-Verlängerung (16–18), in der mikroskopischen Analyse als Chromatid- bzw. Chromosomenbrüche und deren Folgen (2), bei Methoden, die ^3H -Thymidineinbau messen, als außerhalb der S-Phase ablaufende, gesteigerte DNA-Reparatursynthese (3) sowie in Dosis-Wirkungs-Studien als reduzierte zelluläre Überlebens- und Klonierungsraten (4) in Erscheinung.

Wie werden Zellzyklusverteilungen gemessen

Ausgehend von zwei Fluorochromen, Hoechst 33258 und EB, wird Emissionsspektroskopie zweier verschiedener Wellenlängen detektiert (19–21). Erfasst wird die Lichtintensität jedes Einzelsignals und die Anzahl der Signale. Blutlymphozyten befinden sich normalerweise in einer Ruhephase (G0–G1). Am

Anfang der Kultur findet sich daher durchflußzytometrisch nur ein Zellcluster, in dem alle Zellen einheitlichen DNA-Gehalt und gleiche Hoechst-33258- und EB-Fluoreszenz aufweisen. Nach Mitogenstimulation treten die Lymphozyten in die S-Phase ein. Zunehmender DNA-Gehalt bewirkt eine Zunahme der EB-Fluoreszenzintensität infolge vermehrter EB-Farbstoffbindung. Demgegenüber nimmt die Hoechst-33258-Fluoreszenzintensität ab, da Hoechst-Farbstoffbindung an die DNA umso mehr sterisch gehindert wird („Quenching“), je mehr Thymidin durch BrdU substituiert wird. Nach vollständiger DNA-Replikation durchlaufen die Zellen G2-Phase und Mitose, wobei ihr DNA-Gehalt halbiert wird und auf den Ausgangswert zurückfällt. Dementsprechend halbiert sich auch die EB-Fluoreszenzintensität und erreicht wieder das Ausgangsniveau. Infolge BrdUs, das in die DNA inkorporiert ist, erreicht die Hoechst-33258-Fluoreszenzintensität jedoch nicht mehr das Ausgangsniveau, sondern verbleibt bei einem niedrigeren Wert. Sinngemäß das gleiche passiert in jedem weiterhin ablaufenden Zellzyklus. Immer reflektiert die EB-Fluoreszenzintensität die Zellzyklus-Phase (G1, S, G2), während die Hoechst-33258-Fluoreszenzintensität infolge wachsender BrdU-Substitution der DNA mit jedem neuen Zellzyklus mehr „Quench“-Effekt zeigt und so die zusätzliche Information über die Anzahl durchlaufener Zellzyklen liefert.

Dargestellt werden die Daten jeder Einzelmessung in bivariaten Zytoprogrammen, zweiparametrischen Histo-

grammen mit der Verteilung der Einzelzellen auf Zellzyklen und Zyklusphasen. In diesen bivariaten Zytoprogrammen (hier nicht gezeigt) gibt die x-Achse die Hoechst-33258-, die y-Achse die EB-Fluoreszenzintensität und die z-Achse die Anzahl der Zellen in dem jeweiligen Kompartiment wieder. In solchen Darstellungen kann jeder einzelne Zellzyklus und darin wiederum jede einzelne Phase aufgelöst und quantifiziert werden. Auf diese Art und Weise lassen sich auch die Anteile an der gesamten Zellpopulation exakt quantifizieren, die sich nicht stimulieren lassen und in der Ruhephase verbleiben. Damit kann der Prozentsatz von Zellen in einem bestimmten Kompartiment bezogen werden auf den Gesamtanteil proliferierender Zellen (Wachstumsfraktion, „Growth Fraction“, GF). Um dieses Prinzip zu verdeutlichen, wird als Beispiel angenommen, es befänden sich 5% der gemessenen Zellpopulation in der G2-Phase des ersten Zyklus. In dieser gut wachsenden Kultur ließen sich 80% der Zellen stimulieren. Damit würde das Verhältnis G2-Phase/GF ca. 0.06 betragen, ein durchaus normaler Wert. In einer schlecht wachsenden Kultur betrage die Zellpopulation in der G2-Phase des ersten Zyklus ebenfalls 5%. Es ließen sich jedoch nur 10% der Zellen stimulieren. Hier betrüge dann das Verhältnis G2-Phase/GF 0.50, ein anomal hoher Wert. Für diese schlecht wachsende Kultur befänden sich also zu viele Zellen in der G2-Phase. Man müßte annehmen, der Durchlauf sei zeitlich verzögert oder dauerhaft blockiert. Welche dieser beiden Möglichkeiten zu-

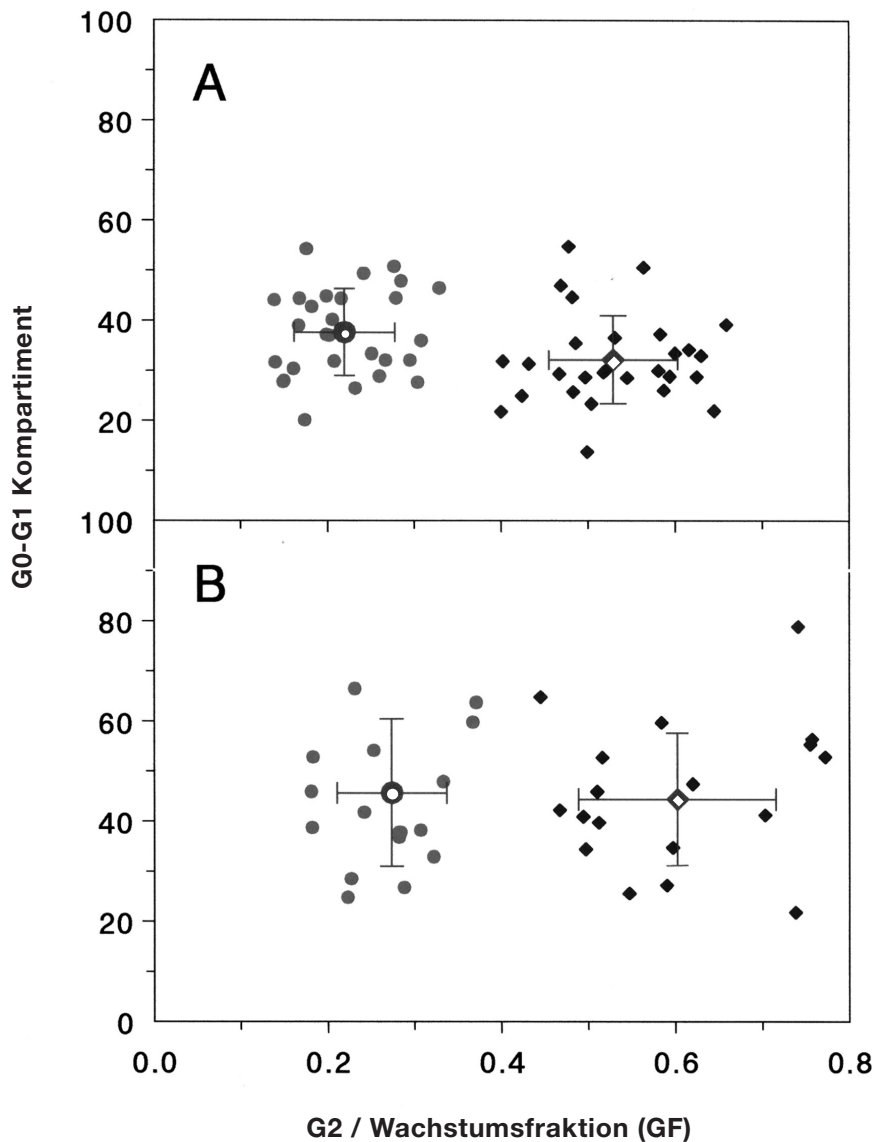


Abb 2
AT-Diagnostik an Kurzzeitkulturen von
(A) lymphoblastoiden Zellen und
(B) Fibroblasten
 Bestrahlung mit 1.5 Gy.

Der Zellanteil in der G2-Phase des 1. Zyklus im Verhältnis zur Wachstumsfraktion (G2/GF, Abszisse) ist jeweils aufgetragen gegen den Prozentsatz nicht proliferierender Zellen aus der gleichen Kultur (G0-G1-Phase, Ordinate). Die schwarzen Rauten kennzeichnen in (A) 28 und in (B) 18 AT-Patienten, die grauen Punkte gleich viele normale Kontrollen. Jeweils durch entsprechende offene Symbole dargestellt sind die Mittelwerte plus/minus eine Standardabweichung.

(G0-G1-Phase, Ordinate) betrug $35,9 \pm 13,4\%$ (Bereich: 11,4–76,4%) in den Kontroll- und $66,7 \pm 18,1\%$ (Bereich: 26,3–98,6%) in den AT-Kulturen. Auch dieser Unterschied ist hochsignifikant ($p < 0,001$), wegen der teilweisen Überlappung beider Kollektive jedoch diagnostisch nicht brauchbar.

Mit Hilfe der durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse kann AT-Diagnostik auch an Kulturen von B-LCL und Fibroblasten vorgenommen werden, die mit 1,5 Gy bestrahlt wurden. Die Unterschiede zwischen normalen Kontroll- und AT-Kulturen sind in Abb 2 dargestellt. Betrachtet wurde wieder das Verhältnis: Zellanteil in der G2-Phase des 1. Zyklus zu Wachstumsfraktion (G2/GF, Abszisse). Für B-LCL (Abb 2A) betragen Mittelwert und Standardabweichung des Verhältnisses G2/GF bei Kontrollkulturen $0,22 \pm 0,06$, bei AT-Kulturen $0,53 \pm 0,07$ ($p < 0,001$). Der Prozentsatz nicht proliferierender Zellen (G0-G1-Phase, Ordinate) war bei B-LCL nicht signifikant unterschiedlich zwischen Kontroll- ($37,6 \pm 8,7\%$) und AT-Kulturen ($32,2 \pm 9,0\%$). Für Fibroblasten (Abb 2B) betragen Mittelwert und Standardabweichung des Verhältnisses G2/GF bei Kontrollkulturen $0,27 \pm 0,06$, bei AT-Kulturen $0,60 \pm 0,11$ ($p < 0,001$). Der Prozentsatz nicht proliferierender Zellen war auch bei Fibroblasten nicht signifikant unterschiedlich zwischen Kontroll- ($45,6 \pm 14,6\%$) und AT-Kulturen ($44,4 \pm 13,2\%$). Gleichmaßen wie bei Lymphozyten- war auch bei Kulturen von B-LCL und Fibroblasten die überschneidungsfreie Trennung des Kontroll- und AT-Kollektivs aufgrund des

trifft, könnte nur entschieden werden, wenn aus derselben Kultur seriell geerntet und so die Dynamik des Zellwachstums erfaßt würde. Die Analyse einer 72h-Kultur zeigt ein statisches Bild. Durch seine hohe Auflösung und die beschriebene Normierung werden unterschiedliche Kulturen mit verschiedenen Behandlungen (ohne/mit Bestrahlung) gut vergleichbar.

Was zeigt die durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse bei AT und NBS?

Die Zellzyklusstörung in Lymphozytenkulturen von AT-Patienten zeigt zwei prominente Züge: (a) Der Anteil nicht PHA-stimulierbarer Zellen ist höher als in Kulturen von normalen Kontrollen. Dieser Befund spiegelt die Tatsache wider, daß AT-Lymphozyten vermindert auf Mitogene reagieren. (b) Nach ionisierender Bestrahlung nimmt der Anteil von Zellen in der G2-Phase bei AT-Lymphozytenkulturen überproportional zu im Vergleich mit Kontrollen. Unter Berücksichtigung der geringeren Wachstumsfraktion dieser Kul-

turen fallen die hohen Anteile von AT-Zellen in der G2-Phase desto stärker ins Gewicht. Geringe bis mittlere Bestrahlungsdosen zeigen die Unterschiede am besten (16–18).

In der Diagnostik wurden Kulturen verglichen, die mit 1,5 Gy bestrahlt wurden. Die gesteigerte Strahlensensitivität von AT-Lymphozyten bildet die Basis für deren diagnostische Abgrenzung von normalen (Abb 1). Von Kulturen, die mit 1,5 Gy bestrahlt wurden, wurde das Verhältnis: Zellanteil in der G2-Phase des 1. Zyklus zu Wachstumsfraktion (G2/GF, Abszisse) betrachtet. Mittelwert und Standardabweichung des Verhältnisses G2/GF betragen bei Kontrollkulturen $0,09 \pm 0,03$ (Bereich: 0,02–0,16), bei AT-Kulturen $0,41 \pm 0,13$ (Bereich: 0,18–0,67) ($p < 0,001$). Beachtenswert ist die überschneidungsfreie Trennung beider Kollektive aufgrund dieses Verhältnisses, läßt man die eine Kultur außer acht, in der praktisch kein Wachstum zu verzeichnen war (Abb 1, links oben). Der Prozentsatz nicht stimulierbarer Zellen

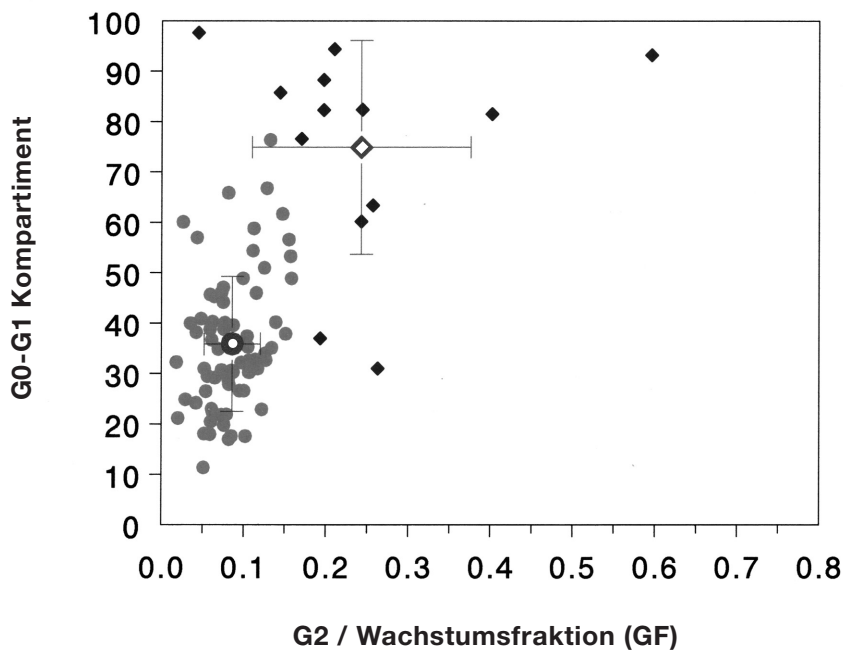


Abb 3
NBS-Diagnostik an Kurzzeitkulturen
peripherer Blutlymphozyten
 Bestrahlung mit 1.5 Gy.

Der Zellanteil in der G₀-G₁-Phase des 1. Zyklus im Verhältnis zur Wachstumsfraktion (G₂/GF, Abszisse) ist jeweils aufgetragen gegen den Prozentsatz nicht stimulierbarer Zellen aus der gleichen Kultur (G₀-G₁-Phase, Ordinate). Die schwarzen Rauten kennzeichnen 13 NBS Patienten, die grauen Punkte dieselben 75 normale Kontrollen wie in Abb1. Durch entsprechende offene Symbole dargestellt sind jeweils Mittelwert plus/minus eine Standardabweichung.

Verhältnisses G₂/GF bemerkenswert. Anhand jedes der drei Zelltypen läßt sich aufgrund der erhöhten Strahlensensitivität von AT-Zellen durchflußzytometrische Diagnostik zweifelsfrei betreiben. Pränatale Diagnostik aufgrund einer Analyse von kultivierten Amnionzellen oder Nabelschnurblut ist möglich.

Gesteigerte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung ist auch für NBS charakteristisch (17, 22). Die Unterschiede zwischen normalen Kontroll- und NBS-Kulturen sind in Abb 3 dargestellt. Von Lymphozytenkulturen, die mit 1,5 Gy bestrahlt wurden, wurde wiederum das Verhältnis: Anteil von Zellen in der G₂-Phase des 1. Zyklus zu Wachstumsfraktion (G₂/GF, Abszisse) betrachtet. Mittelwert und Standardabweichung des Verhältnisses G₂/GF betragen bei NBS-Kulturen $0,24 \pm 0,13$ (Bereich: 0,04–0,60). Damit ist die Strahlensensitivität bei NBS gegenüber den Kontrollen zwar hochsignifikant gesteigert ($p < 0,001$), sie ist jedoch im Mittel nicht so stark erhöht wie bei AT. Aus diesem Grunde gelingt die Abgrenzung zwischen Kontroll- und NBS-Kollektiv nicht ganz überschneidungsfrei. Dagegen ist für NBS eine noch geringere Mitogenantwort der Lymphozyten als bei AT die Regel. Der Prozentsatz nicht proliferierender Zellen (G₀-G₁-Phase, Ordinate) betrug in den NBS-Kulturen $74,9 \pm 21,2\%$ und war damit ebenfalls hochsignifikant verschieden von den Kontrollen ($p < 0,001$). Gesteigerte Strahlensensitivität findet sich auch in B-LCL und Fibroblasten von NBS-Patienten und kann in der Diagnostik ver-

wendet werden. Primärdiagnostik des NBS geschieht jedoch immer häufiger durch molekulargenetische Analyse, da das verantwortliche Gen überschaubare Größe besitzt und eine bestimmte Mutation (657del5bp) vorherrscht.

Kommentar

Die durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse erbringt Ergebnisse, die mit solchen anderer Methoden der AT-Diagnostik übereinstimmen. Die Befürchtung, daß BrdU als Kulturzusatz selbst zu einer G₂-Phasen-Erhöpfung führen könnte, ist in den verwendeten Konzentrationen für Suspensionskulturen nicht belegbar; in Kulturen adhärenter Zellen kann durch äquimolaren Zusatz von 2-Deoxycytidin im Bereich diagnostisch relevanter BrdU-Konzentrationen vorgebeugt werden. Der Wert der beschriebenen Methode liegt in ihrer Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit bei einem Informationsgehalt, der über die diagnostik-relevanten Daten hinausgeht. Als Nachteil steht demgegenüber, daß die Durchflußzytometrie diagnostisch verwertbare Chromosomenrearrangements nicht erkennt, wie sie mit Bruchpunkten in den Regionen 7p14, 7q35, 14q12 und 14q32 in AT- und NBS-Lymphozyten vorkommen (2, 22). Ein-Parameter-Durchflußzytometrie, die zu einfachen G₁-S-G₂-Histogrammen führt, zeigt ebenfalls G₂-Phasenerhöhungen bei Zellen nach Bestrahlung. Vergleichbare Trennschärfe zwischen AT und Kontrollen wie bei der BrdU-Hoechst-Quenchemethode wird dabei jedoch nicht erreicht. Dieser Umstand ist darauf

zurückzuführen, daß derjenige Zellanteil, der nicht an der Proliferation teilnimmt, nicht quantifizierbar ist. Dadurch bleibt unsicher, worauf die G₂-Phasen-Größe bezogen werden sollte. Diagnostikverfahren für AT, die auf radioaktivem Thymidineinbau basieren, berücksichtigen die Wachstumsfraktion durch Doppelmarkierung, so daß ¹⁴C-Inkorporation vor Bestrahlung mit ³H-Inkorporation nach Bestrahlung verglichen wird (3). Nachteil dieser Methoden ist die Notwendigkeit des Umgangs mit den genannten Isotopen. Strahlendosis-Wirkungs-Untersuchungen sind insbesondere dann sehr aussagekräftig, wenn sie Zellklonierung einschließen (4). Bei ihnen liegt der Nachteil in der Schwierigkeit, sie mit primären Blutlymphozyten durchzuführen, und in ihrer oft langen Dauer.

Das Untersuchungsergebnis durchflußzytometrischer Zellzyklusanalyse kann nach 3.5 Tagen vorliegen, setzt man 3 bis 4 h für Lymphozytenisolierung und Kulturansatz einschließlich Bestrahlung, 72h für die Kulturdauer und 2h für Zellernte, Färbung, Messung und Auswertung an. Schwerpunkt der Zeitersparnis gegenüber der Chromosomenanalyse liegt im Bereich von Messung und Auswertung und hier liegt auch der Vorteil in der Ersparnis an Arbeitskraft, da durchflußzytometrische Zellzyklusanalytik teilweise automatisierbar ist. Die Methode ist robust; konstante Bedingungen und Aufmerksamkeit bei wesentlichen Schritten ist jedoch vorteilhaft (8). In der Probengewinnung und -präparation gehören dazu die Verwendung

von Probenröhrchen mit Konservierungsmittelarmem Heparin aus Plastikmaterial ohne toxische Komponenten. EDTA- und Citratblut führen zu vermindertem Zellwachstum; diese Antikoagulantien sollten vermieden werden. Für Transport und Aufbewahrung der Blutproben hat sich normale Umgebungs- bzw. Raumtemperatur bewährt. Der Kulturansatz sollte innerhalb von zwei Tagen erfolgen; danach läßt die Qualität von Blutprobe und Ergebnissen rasch nach. Nicht alle Präparate von FBS und PHA sind gleich gut geeignet; die Vortestung neuer Lots ist zweckmäßig. Nach Zugabe von BrdU ist Schutz der Kulturen vor Licht kurzer Wellenlänge notwendig, denn BrdU wirkt als „Photosensitizer“. Es besteht keine Notwendigkeit, Antibiotika zu den Kulturen hinzuzufügen. Verklumpungen in der Probe während der Messung können durch gelegentliches sanftes Schütteln vermieden werden; manchmal kann eine Filtration durch feine Nylon-gaze hilfreich sein. Eichung des Durchflußzytometers (mittels externer und interner Standards) und Optimierung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen (kleine Variationskoeffizienten der Peaks) schützen vor Fehlern und Probenverlust bei der Messung.

Danksagung

An der Entwicklung der durchflußzytometrischen AT-Diagnostik haben Herr Richard Friedl, Prof. Dr. Holger Höhn, Prof. Dr. Manfred Kubbies und Frau Dr. Helga Seyschab mit Rat und Tat mitgewirkt. Exzellente Arbeit hat Frau Gitta Emmert in der Anwendung geleistet. Ihnen allen sei herzlich gedankt.

Literatur

1. McKinnon PJ (1987); Ataxia-telangiectasia: an inherited disorder of ionizing-radiation sensitivity in man, *Hum Genet* 75:197-208.
2. Taylor AMR (1982) Cytogenetics of ataxia-telangiectasia. In BA Bridges, DG Harnden (Hrsg) *Ataxia-telangiectasia – a cellular and molecular link between cancer, neuropathology, and immune deficiency*. Wiley, New York:53-81.
3. Jaspers NGJ, Scheres JMJC, de Wit J, Bootsma D (1981) Rapid diagnostic test for ataxia-telangiectasia. *Lancet* 2:473.
4. Huo YK, Wang Z, Hong JH, Chessa L, McBridge WH, Perlman SL, Gatti RA (1994) Radiosensitivity of ataxia-telangiectasia, X-linked agammaglobulinemia and related syndromes using a modified colony survival assay. *Cancer Res* 54:2544-2547.

5. Sandoval N, Platzer M, Rosenthal A, Dörk T, Bendix R, Skawran B, Stuhmann M, Wegner R-D, Sperling K, Banin S, Shiloh Y, Baumer A, Bernthaler U, Sennfelder H, Brohm M, Weber BHF, Schindler D (1999) Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia-telangiectasia families. *Hum Mol Genet* 8:69-79.

6. Shapiro HM (1985) *Practical flow cytometry*. Alan R. Liss, New York.

7. McCoy JP Jr, Lovett EJ (1989) Basic principles in clinical flow cytometry. In DF Keren (Hrsg) *Flow cytometry in clinical diagnosis*. ASCP Press, Chicago: 12-40.

8. Schindler D, Hoehn H. Flow cytometric testing for syndromes with chromosomal instability, aplastic anemia and related hematological disorders. In R-D Wegner (Hrsg) *Diagnostic cytogenetics – Springer lab manual*. Springer Verlag, Heidelberg: 269-281 (in press, 1999)

9. Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Rabinovitch PS (1985) Cell cycle kinetics by BrdU-Hoechst flow cytometry: an alternative to the differential metaphase labelling technique. *Cell Tissue Kinet* 18:551-562.

10. Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761-763.

11. German J (1983) Patterns of neoplasia associated with the chromosome-breakage syndromes. In J German (Hrsg) *Chromosome mutation and neoplasia*. Alan R. Liss, New York:97-134.

12. Pollack A, Ciancio G (1989) Multiparameter cell cycle analysis of G2-arrest and cell death following ionizing irradiation. In A Yen (Hrsg) *Flow cytometry: advanced research and clinical applications, Band II*. CRC Press, Boca Raton: 29-48.

13. Coggle JE (1983a) Biological effects of radiation: 2.4. Radiation-induced DNA damage and its repair. Taylor and Francis, London:37-44.

14. Coggle JE (1983b) Biological effects of radiation: 2.5. Radiation effects on DNA synthesis and division delay. Taylor and Francis, London:44-47.

15. Kiefer J (1990) *Biological radiation effects: 10. Radiation and the cell cycle*. Springer, Berlin:175-181.

16. Schindler D, Seyschab H, Poot M, Hoehn H, Schinzel A, Fryns JP, Tommerup N, Rabinovitch PS (1987) Screening test for ataxia-telangiectasia. *Lancet* 2:1398-1399.

17. Seyschab H, Schindler D, Friedl R, Barbi G, Boltshauser E, Fryns JP, Hanefeld F, Korinthenberg R, Krägeloh-Mann I, Scheres JMJC, Schinzel A, Seemanová E, Tommerup N, Hoehn H (1992) Simultaneous measurement, using flow cytometry, of radiosensitivity and defective mitogen response in ataxia-telangiectasia and related syndromes. *Eur J Pediatr* 151:756-760.

18. Seyschab H, Sun Y, Friedl R, Schindler D, Hoehn H (1993) G2 phase cell cycle disturbance as a manifestation of genetic cell damage. *Hum Genet* 92:61-68.

19. Rabinovitch PS, Kubbies M, Chen YC, Schindler D, Hoehn H (1988) BrdU-Hoechst flow cytometry: a unique tool for quantitative cell cycle analysis. *Exp Cell Res* 174:309-318.

20. Kubbies M, Hoehn H, Schindler D, Chen YC, Rabinovitch PS (1989) Cell cycle analysis via BrdU-Hoechst flow cytometry – principles and applications. In A Yen (Hrsg) *Flow cytometry: advanced research and clinical applications, Band II*. CRC Press, Boca Raton: 5-28.

21. Poot M, Schmitt H, Seyschab H, Koehler J, Chen U, Kaempf U, Kubbies M, Schindler D, Rabinovitch PS, Hoehn H (1989) Continuous bromodeoxyuridine labeling and bivariate ethidium bromide/Hoechst flow cytometry in cell kinetics. *Cytometry* 10:222-226.

22. Barbi G, Scheres JMJC, Schindler D, Taalman RDFM, Rodens K, Mehnert K, Müller M, Seyschab H (1991) Chromosome instability and X-ray hypersensitivity in a microcephalic and growth-retarded child. *Am J Med Genet* 40:44-50.