

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Untersuchungen zur Phytohämagglutinin-stimulierten Umwandlung von menschlichen Blutlymphocyten zu blastenartigen Zellen* **

Von

A. GROPP und R. FISCHER

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Juli 1964)

Die Probleme der morphologischen Einordnung der Lymphocyten und ihrer funktionellen Bedeutung haben einer Lösung stets große Schwierigkeiten bereitet (GRUNDMANN; LENNERT; YOFFEY). Der vor allem von MAXIMOW vertretenen Lehre einer pluripotenten Stammzellfunktion steht die Annahme gegenüber, daß der Lymphocyt die ausgereifte Endstufe einer Entwicklungsreihe darstelle. Viele Fragen der Abgrenzung der Lymphocyten von anderen Zellformen, etwa den sog. basophilen Stammzellen, den Plasmazellen des lymphoretikulären Gewebes und ihren Vorstufen, oder auch von den Mononukleosezellen u. a., sind noch offen. Ohne Zweifel sind manche gegenwärtige Vorstellungen über den Lymphocyt von einer vorwiegend *statisch*-morphologischen Untersuchungsweise her geprägt. Durch die Entdeckung lymphocytstimulierender Faktoren jedoch, nämlich in erster Linie durch den Nachweis, daß ein aus Phaseolus vulgaris extrahierbares Phytohämagglutinin (Phaseolin) *in vitro* eine Umwandlung von Blutlymphocyten zu großen proliferierenden Zellen (NOWELL; MCKINNEY u. Mitarb.; ELVES u. WILKINSON) bewirken kann, kommt seit den älteren Untersuchungen von MAXIMOW erneut ein *dynamisches Element* in der Betrachtung des lymphocytären Systems zur Geltung.

In dieser Arbeit soll dementsprechend über die Ergebnisse der Züchtung von menschlichen Blutlymphocyten unter der Einwirkung von Phytohämagglutinin aufgrund cytologischer und cytochemischer Untersuchungen sowie aufgrund von Lebendbeobachtungen im Phasenkontrastmikroskop berichtet werden, mit dem besonderen Ziel der weiteren und besseren Charakterisierung der dabei entstehenden großen blastenartigen Zellen. Mit Hilfe dieser Analysen sollen auch Überlegungen über die möglichen Beziehungen der *in vitro* transformierten Lymphocyten zu anderen, ähnlichen Zellen im lymphoretikulären Gewebe angestellt werden.

Material und Methode

Aus heparinisiertem Venenblut des Menschen wurden in der Entnahmespritze durch einfache Sedimentation weiße Blutzellen in dem überstehenden Plasma angereichert. Etwa 2 ml einer derartigen Suspension mit ca. 5000—8000 Leukocyten/mm³ wurden zusammen mit 8 ml des Gewebezüchtungsmediums 199 (TCM 199, Difco) in Kulturflaschen angesetzt und 0,2—0,5 ml Phytohämagglutinin (bei Verwendung einer Extraktionsmethode nach ODUNJO

* Herrn Prof. Dr. H. HAMPERL zu seinem 65. Geburtstage gewidmet.

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

u. GROPP) hinzugefügt. Der Boden der Kulturgefäße war mit jeweils 10 Deckgläschchen, auf denen sich die explantierten Zellen absetzten, ausgelegt. In Intervallen von 6—12 Std bis zu 5 Tagen der Kultivierung *in vitro* wurden zellbewachsene Deckgläschchen zur Untersuchung entnommen. Insgesamt wurden über 40 Züchtungsversuche durchgeführt.

Die Pappenheim-Färbung und die Methylenblaufärbung nach STOCKINGER u. KELLNER dienten der allgemein cytologisch-färberischen Darstellung der gezüchteten Blutzellen. Zu ihrer weiteren Analyse wurde eine Reihe baustein- und enzymhistochemischer Nachweisverfahren durchgeführt (vgl. Tabelle). Zu Einzelheiten der Methodik wird auf die zusammenfassende Darstellung von PEARSE und auf eigene frühere Untersuchungen verwiesen (FISCHER u. GROPP).

Für phasenkontrastmikroskopische Lebendbeobachtungen wurden zellbewachsene Deckgläschchen auf einfache, aus einem Stahlrähmchen angefertigte Beobachtungskammern, die mit Kulturmedium ausgefüllt waren, aufgebracht.

Ergebnisse

Cytologische und cytochemische Beobachtungen. Während der ersten Stunden der Züchtung *in vitro* sind die einzelnen leukocytären Elemente noch etwa in dem

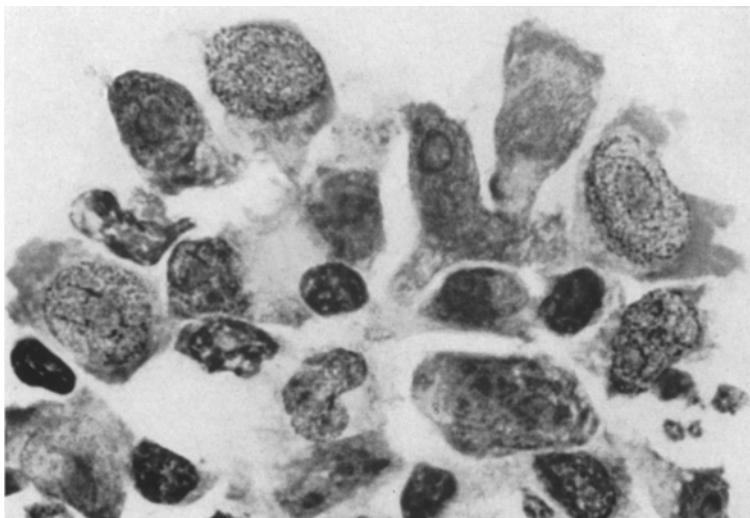


Abb. 1. Leukozytenkultur unter Zusatz von Phytohämagglutinin nach 48 Std. — Pappenheim-Färbung. — Neben kleinen Lymphocyten finden sich Übergangsstufen bis zu größeren Zellen mit großem Nukleolus und basophilem Cytoplasma

zahlenmäßigen Anteil, den sie im peripheren Blut ausmachen, wiederzufinden. Schon nach 6—12stündiger Kultivierung mit Phytohämagglutinin bahnen sich jedoch Veränderungen an, die dann mit weiterer Fortdauer der Züchtung immer deutlicher hervortreten:

Die neutrophilen *Granulocyten* weisen zunehmende degenerative Veränderungen auf mit Kernpyknose und Auflösung des Cytoplasmas, wobei die Granulationen noch länger erhalten bleiben. Nach dreitägiger Züchtung sind neutrophile Granulocyten in den Kulturen kaum mehr aufzufinden. Die eosinophilen Leukozyten sind resistenter und überleben länger.

Die *Monocyten* bleiben in einem Beobachtungszeitraum von etwa 5 Züchtungstagen als große, flach ausgebreitete und phagocytierende Zellen erhalten. Nicht selten lassen sie aber nach mehreren Tagen *in vitro* Degenerationserscheinungen bis zu einem Zellzerfall erkennen.

Thrombocyten sind immer in größerer Zahl in den Kulturen, teils einzeln liegend, teils zu Agglomeraten verbucken, vorhanden. Sie werden im Laufe der Kultivierung zunehmend von monocytären Elementen phagocytiert.

Die auffälligsten Veränderungen betreffen die *Lymphocyten*. Meist schon nach 24stündiger, gelegentlich erst nach 48stündiger Züchtung *in vitro* ist die Zahl der kleinen Lymphocyten zugunsten größerer Zellelemente sehr stark vermindert.

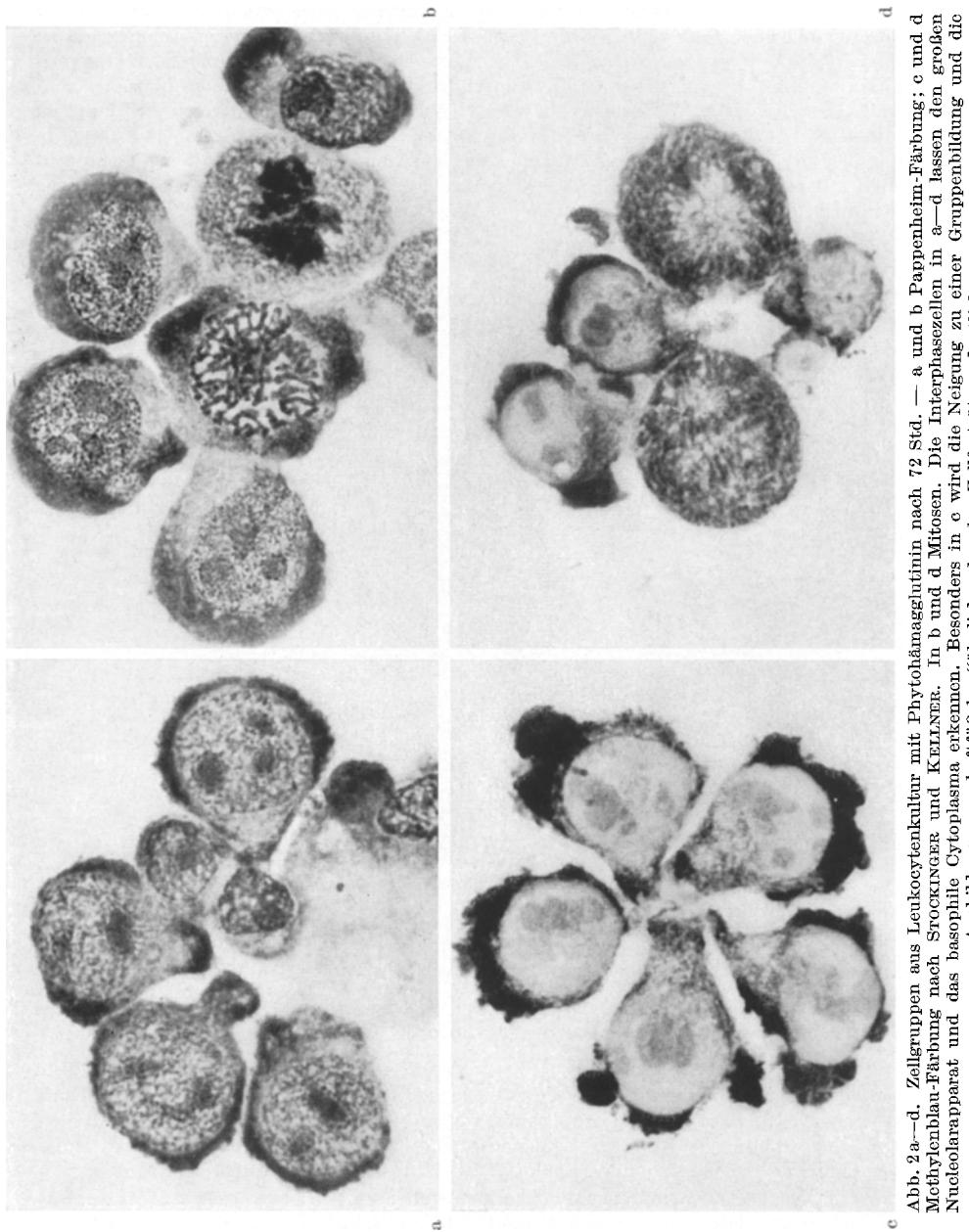


Abb. 2a-d. Zellgruppen aus Leukozytenkultur mit Phytohämagglutinin nach 72 Std. — a und b Pappenheim-Färbung; c und d Methyleneblau-Färbung nach STOCKINGER und KELLNER. In b und d Mitosen. Die Interphasezellen in a—d lassen den großen Nucleolarapparat und das basophile Cytoplasma erkennen. Besonders in c wird die Neigung zu einer Gruppenbildung und die Ausbildung von „haftfüßchen“ähnlichen basalen Zellfortsätzen deutlich

Es finden sich dann gewöhnlich alle Übergangsformen (Abb. 1) zwischen den dichtkernigen, ursprünglichen kleinen Lymphocyten und den jetzt überwiegenden größeren Zellen. Nach mehr als zweitägiger Züchtung enthalten die Kulturen

neben den spärlichen Monocyten und bei nunmehr fast völligem Verschwinden der kleinen Lymphocyten nur noch große, „blasten“ähnliche Zellen (Abb. 2a und c). Sie vermehren sich rasch mitotisch mit einem steilen Gipfel der Mitoseaktivität um den 3. Tag (Abb. 2b und d). Das Cytoplasma dieser Zellen ist deutlich basophil. Besonders bei der Methylenblau-Färbung erfolgt eine starke Anfärbung des Cytoplasmas, das häufig grobe Vacuolen enthält. Die äußeren Zellkonturen zeigen ganz unregelmäßige Ausläufer als Ausdruck einer lebhaften Motilität der Zelloberfläche. Besonders kennzeichnend ist der große Nucleolar-Apparat in dem locker strukturierten Zellkern.

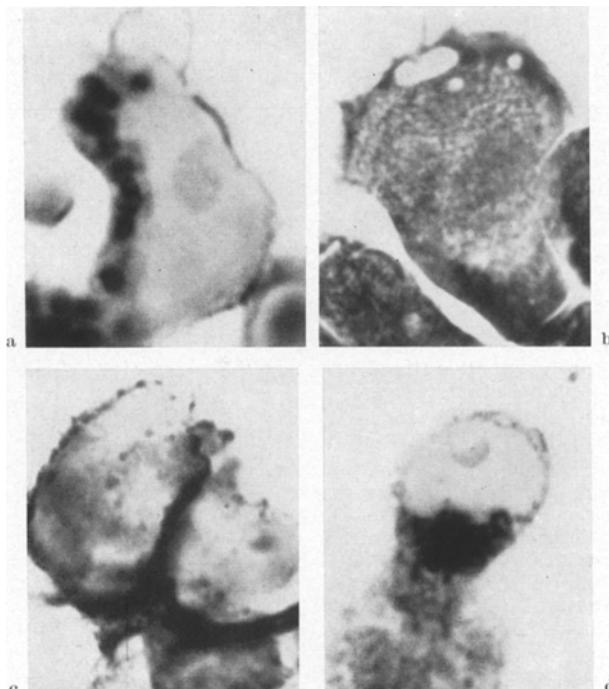


Abb. 3a—d. Phytohämagglutinin-instimulierte große Zellen nach 72 Std der Kultur. — a Sudanschwarz-Färbung; im Cytoplasma grobe sudanophile Granula. — b Pappenheim-Färbung; im Cytoplasma Vacuolen nach Herauslösung der Lipidgranula. — c Adenosintriphosphatase-Nachweis mit positiver Reaktion an den Zellsäumen und den Zellgrenzen. — d Beispiel einer Zelle mit deutlich positivem Ausfall der Reaktion zum Nachweis der sauren Phosphatase nach BARKA und ANDERSON. Die Mehrzahl der Zellen ist nur schwach positiv oder negativ

Diese großen basophilen, „blasten“ähnlichen Zellen weisen fast immer eine Neigung zur Lagerung in Gruppen und kleineren dichten Inseln auf, wie es vor allem die Abb. 2a und c zeigen. Dies Verhalten ist teilweise darauf zurückzuführen, daß durch die mitotische Vermehrung der einzelnen Zellen kleine Klone solcher Zellen entstehen. Eine Gruppen- bzw. Inselbildung erklärt sich weiterhin durch die Tendenz dieser Zellen zur Anheftung an eine Unterlage, nicht selten auch durch die Ausbildung eines haftfußähnlichen basalen Zellfortsatzes (Abb. 2c).

Bei Kontrollzüchtung von Blutzellen in Abwesenheit von Phytohämagglutinin treten diese großen Zellen nicht auf (FISCHER u. GROPP). Sie entstehen aber in der geschilderten Weise, wenn solchen Kontrollkulturen erst nach 3—6 Tagen Phytohämagglutinin zugesetzt wird.

Die Ergebnisse der baustein- und enzymcytochemischen Analyse der großen „blasten“artigen Zellen in dem Entwicklungsstadium, in dem sie sich nach dreitägiger Kultivierung vorfinden, sind in der Tabelle aufgeführt und dem Verhalten der Lymphocyten des Ausgangsmaterials vergleichsweise gegenübergestellt.

Die Pyroninophilie des Cytoplasmas der großen „blasten“artigen Zellen entspricht ihrer Färbbarkeit durch andere basische Farbstoffe. Auffällig ist bei der

Tabelle. *Ergebnisse der baustein- und enzymcytochemischen Untersuchung der Lymphocyten und der Phytohämaggelinin-stimulierten großen Zellen*

| | Lympho- cyten | Phyto- hämaggelinin- stimulierte Zellen nach 72 Std der Kultur |
|--|------------------|--|
| Methylenblaubindung (STOCKINGER u. KELLNER) | (+) | ++ |
| Methylgrün-Pyronin (Pyroninophilie) | — | +/++ |
| Sudanschwarz | — | +/++ |
| Sudanschwarz nach Extraktion mit Chloroform/Methanol | — | — |
| Luxol fast blue. | — | — |
| PAS-Reaktion | -/+ | — |
| Astrablau | — | — |
| Eisenbindungsreaktion für saure Mucopolysaccharide (HALE) | — | — |
| SH-Gruppennachweis (CHEVRE- MONT u. FRÉDÉRIC) | (+) | (+)/+ |
| Saure Phosphatase | | |
| Metallsalzmethode (GOMORI) | — | -/(+) |
| Azomethode (BAEKA u. ANDERSON) | (+) | -/+/++ |
| Alkalische Phosphatase | | |
| Metallsalzmethode (GOMORI) | — | — |
| Azomethode (KAPLOW) | — | — |
| Adenosintriphosphatase (PADYKULA u. HERMAN) | — | +/++ |
| Naphthol AS-Acetat-Esterase | (+) | (+)/+ |
| Naphthol ASD-Chloracetat-Esterase | — | — |
| Leucinaminopeptidase | — | — |
| Cytochromoxydase (BURSTONE) | (+) | + |
| Succinodehydrogenase | + | ++ |
| DPNH- und TPNH-Diaphorase | + | ++ |
| Lactat-Dehydrogenase | + | ++ |

Sudan-Färbung der Nachweis grober Granula von 1—2 μ Durchmesser im Cytoplasma (Abb. 3a). Nach Extraktion mit Methanol/Chloroform oder anderen Fettlösungsmitteln bleiben die Zellen ungefärbt: anstelle der Granula zeigt dann das Cytoplasma Vacuolen, wie sie auch bei der Pappenheim-Färbung auftreten (Abb. 3b). Die großen basophilen Zellen sind PAS-negativ. Beim SH-Gruppennachweis (nach CHÈVREMONT u. FRÉDÉRIC) erkennt man eine leichte Anfärbung des Cytoplasmas.

Die Enzymausstattung der großen basophilen Zellen wird durch das Ergebnis der ebenfalls in der Tabelle angeführten *cytochemischen* Reaktionen charakterisiert. Hervorzuheben ist einmal die in vielen Zellen nachweisbare deutlich positive *ATPase-Reaktion*, die ganz vorwiegend an den Zellsäumen lokalisiert ist (Abb. 3c). Gelegentlich lässt sich an der Grenze zweier Zellen eine deutliche Doppelkontur

erkennen. Die Spezifität des Ergebnisses dieser Reaktion wird unterstrichen durch einen negativen Ausfall bei Verwendung von $\text{Na-}\beta\text{-Glycerophosphat}$ anstelle von Adenosintriphosphat als Substrat und ferner durch die fehlende Hemmung der Reaktion bei Zugabe von Cystein zum Inkubationsansatz. Erwähnenswert ist weiterhin der Reaktionsausfall beim Nachweis der *sauren Phosphatase* bei Anwendung der Azofarbstoffmethode (nach BARKA und ANDERSON): Während die überwiegende Zahl der großen „blasten“artigen Zellen negativ oder nur schwach positiv reagiert, besitzen einzelne derartiger Zellelemente eine deutliche bis starke Fermentaktivität (Abb. 3d). Beim Nachweis der sauren Phosphatase mit Hilfe der Metallsalzmethode (GOMORI) fehlen dagegen solche stark positiv reagierenden Zellen; bei dieser Methode ist erst nach längerer Inkubationszeit eine höchstens schwache Aktivität der sauren Phosphatase in den genannten Zellelementen feststellbar.

Die meisten basophilen Zellen besitzen außerdem eine geringe Aktivität der Naphthol AS-Acetat-Esterase mit einzelnen, verstreut liegenden

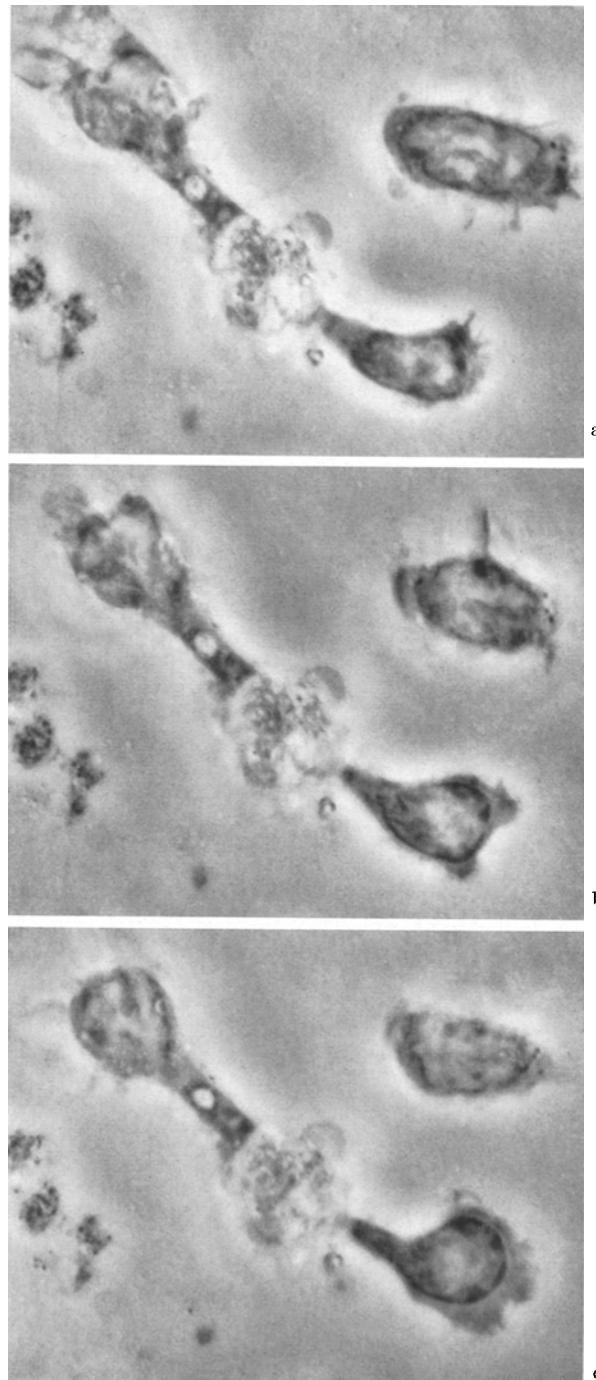
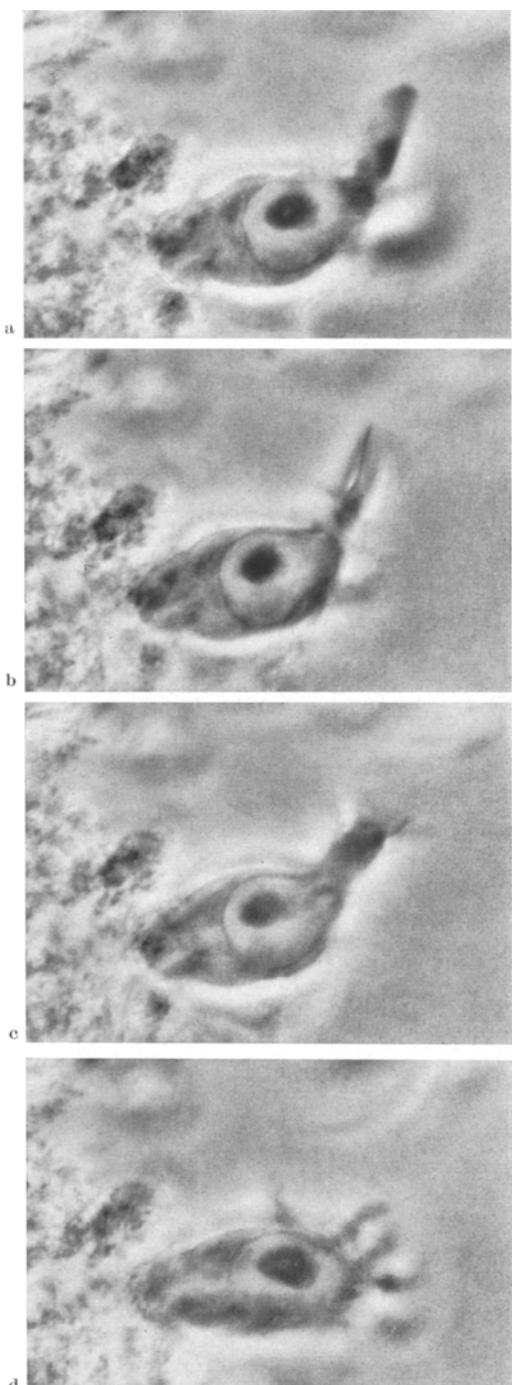


Abb. 4 a—c. Bildserie aus einer Lebendbeobachtung einer Kultur mit Phytohämagglutinin nach 24 Std; Phasenkontrast; Intervall zwischen den Aufnahmen je 1 min. — Bereits deutliche Neigung der großen aktivierten Lymphocyten zu einer Anheftung an ein Substrat (hier kleines Agglutinat von Thrombocyten)



Phasenkontrast; Intervall zwischen den einzelnen Aufnahmen 40 sec. — Aktivierte Zelle mit basaler „Verwurzelung“ auf einem Agglutinat aus Thrombocyten und zugrunde gehenden Granulocyten; sehr lebhafte Motilität des freien Zellkörpers

Granula. Die Reaktionen zum Nachweis der Cytochromoxydase sowie verschiedener Dehydrogenasen und Diaphorasesen zeigen einen deutlich positiven Ausfall. Bei den übrigen Enzymnachweisen bleiben die „blasten“-artigen Zellen ungefärbt.

Lebendbeobachtungen im Phasenkontrastmikroskop: Bei der Untersuchung sowohl von phytohämagglutininfreien Kontrollkulturen wie auch von Blutzell-Kulturen mit Phytohämagglutinin lassen sich innerhalb der ersten 12—24 Std kleine Lymphocyten und in weit geringerer Zahl Monocyten mit ihren kennzeichnenden Verhaltensweisen beobachten: Die *Lymphocyten* zeigen abwechselnd mit Perioden eines Verharrens am Orte eine amöboide Motilität mit häufig sich ändernder Wanderungsrichtung. Dabei fließt in diese Richtung ein breiter Hyaloplasmaschleier aus, in den dann der Zellkern mit sich anpassenden, manchmal wie aktiv erscheinenden Veränderungen seiner Form nachwandert. Da der hintere Pol eines solchen Lymphocytens häufig schwanzähnlich ausgezogen bleibt, entsteht die charakteristische Handspiegelform des wandernden Lymphocytens. Das schmale Cytoplasma enthält wenige grob-stabförmige Mitochondrien. In dem Zellkern des lebenden kleinen Lymphocytens sind mehrere kleine rundliche Verdichtungen zu erkennen, ohne daß sich darunter heterochromatische Strukturen sicher von Nucleolen unterscheiden ließen.

Die *Monocyten* sind demgegenüber in der Kultur eher wanderungsträge. Sie breiten sich sehr flach aus. Kennzeichnend sind die leicht exzentrische Lage des kleinen Zellkerns, eine radiäre Anordnung der feingranulären Mitochondrien und cytoplasmatischen Granula in einer perinucleären Region und vor allem die undulierenden Bewegungen der Cytoplasmasäume. Die Monocyten zeigen deutliche Phagocytose- und Pinocytoseerscheinungen.

Bereits nach 12—24stündiger Züchtung unter der Wirkung von

Abb. 5a—d. Serie aus einer Lebendbeobachtung einer Kultur nach 72stündiger Einwirkung von Phytohämagglutinin;

Phytohämagglutinin ändert sich dieses Bild: Man findet immer weniger isolierte Lymphocyten in amöboider Lokomotion. Dagegen überwiegen jetzt größere Zellen, die nur noch ab und zu in ruckartigen Schüben und großer Geschwindigkeit umherwandern und immer mehr dazu übergehen, sich an Oberflächen anzuheften. Dabei „verwurzeln“ sie sich meist mit einem basalen Fortsatz entweder untereinander (vgl. Abb. 2c) oder an einem Substrat (Abb. 4 und 5). Derartige Ansatzflächen zur Anheftung bieten sich in den Kulturen etwa an degenerierenden Granulocyten oder an kleinen Agglomerationen von Thrombocyten. Der Kern dieser Zellen wird zunehmend heller, der Nucleolarapparat größer (Abb. 5). Am auffälligsten aber ist die überaus lebhafte Motilität, die die großen „blasten“-artigen Zellen nunmehr entfalten: Mit dem freien Zellkörper (vgl. Abb. 5) führen sie gleichsam pumpende Bewegungen aus; durch rasches amöboides Fließen des Cytoplasmas ändern sie ihre Form innerhalb weniger Minuten mehrmals. Ständig werden Cytoplasmafortsätze ausgestoßen und wieder zurückgebildet. Mehr noch als an den ursprünglichen kleinen Lymphocyten scheint der Zellkern aktiv seine Form zu ändern: er „führt“ nicht selten eine bestimmte Bewegung an, die dann erst vom Cytoplasma weitergeführt wird. Diese sehr aktive, kaum von Ruheperioden unterbrochene Motilität dieser Zellen verhindert eine genauere Beobachtung cytoplasmatischer Einzelheiten oder Strukturen. Es ergeben sich jedoch an ihnen keine Hinweise für das Vorkommen von Phagocytose oder Pinocytose.

Diskussion

Die im vorigen Abschnitt geschilderten Befunde sollen in erster Linie zu einer weiteren und besseren Charakterisierung des Zelltyps beitragen, der unter der Phytohämagglutinineinwirkung aus den Blutlymphocyten entsteht. Bereits in einer früheren Arbeit (FISCHER und GROPP) wurden einige Eigenschaften der „blasten“-artigen, basophilen Zellen hervorgehoben und auf ähnliche Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen verwiesen. Mit der vorliegenden Untersuchung wird dieses Bild erweitert durch die Ergebnisse einer histochemischen Bausteinanalyse und durch die Vervollständigung der Kenntnisse der Enzymausstattung. Sie liefert ferner eine Vorstellung des Verhaltens der stimulierten Zellen unter den Bedingungen der Lebendbeobachtung. Einige Befunde sind darunter besonders hervorzuheben: 1. der Nachweis grober sudanschwarzfärbarer Lipidgranula im Cytoplasma; — 2. die recht starke Aktivität an saurer Phosphatase (Azofarbstoffmethode nach BARKA und ANDERSON) bei einzelnen dieser Zellen im Vergleich zu einer negativen Reaktion anderer, sonst gleichartiger Elemente; — 3. der Nachweis einer Adenosintriphosphatase an den Zellsäumen und Zellgrenzen; — 4. unter den allgemeinen Eigenschaften die äußerst lebhafte Motilität bei einer Art Verwurzelung an einem Substrat sowie das Fehlen von Pinocytose und Phagocytose.

Der Befund sudanschwarzfärbarer *Lipidgranula* stimmt mit der Beobachtung von ELVES u. Mitarb. über das Vorhandensein osmophiler Granula bei elektronenmikroskopischer Untersuchung der phytohämagglutinin-stimulierten Lymphocyten überein. Die genannten Autoren glauben, daß sie sich aus dem endoplasmatischen Reticulum oder aus Strukturen des Golgi-Apparates entwickelt haben könnten. Diese Lipidgranula sind jedenfalls ein charakteristisches Merkmal der phytohämagglutinin-stimulierten Zellen; da sie durch Fettlösemittel leicht herausgelöst werden, findet man bei den üblichen cytologischen Färbungen nur die verbleibenden Vacuolen des Cytoplasmas, die nach verschiedenen Untersuchern eine bezeichnende Eigenschaft dieser Zellen darstellen. Es ist daher auffällig, daß es QUAGLINO u. Mitarb.

nicht gelang, in den großen „blasten“artigen Zellen Sudanschwarz-färbbare Strukturen darzustellen.

Das Vorhandensein von *Adenosintriphosphatase* (ATPase) in cytochemisch faßbarer Menge könnte mit der besonders lebhaften Motilität der großen phytohämagglutinin-aktivierten Zellen in Zusammenhang stehen. Für diese Annahme spricht die Bedeutung, die allgemein dem ATP nach den Untersuchungen unter anderem von LETTRÉ und SCHLEICH und HORMANN-BERLING und WEBER als Energiequelle für die Formehaltung und die Motilität der Zelle bzw. ihrer Oberfläche zuzumessen ist.

Tatsächlich muß die auffällige Aktivierung aller Motilitätsphänomene im Laufe der Umwandlung zu den großen „blasten“artigen Zellen in der Kultur als eine Besonderheit erscheinen, zumal sie gleichzeitig verknüpft ist mit einer Neigung dieser Zellen zur Fixierung an einem Substrat mittels einem „haftfüßchen“ähnlichen basalen Cytoplasmafortsatz. Das Tempo dieser Bewegungsvorgänge ist unter den Motilitätserscheinungen lebender Zellen allenfalls dem von Megakaryozyten vergleichbar. Über die Bedeutung der Aktivierung der Zellbewegungen im Laufe der Umwandlung zu den großen „blasten“ähnlichen Zellen läßt sich noch keine Aussage machen. In diesem Zusammenhang sei allerdings darauf hingewiesen, daß TANAKA u. Mitarb. bei phasenkontrastmikroskopischen Studien von phytohämagglutinin-induzierten großen „blasten“artigen Zellen keine besondere Bewegungsaktivität vermerkten. Wir möchten dennoch unsern in mehreren Versuchsreihen gesicherten Beobachtungen einer aktiven Motilität, wie sie auch etwa aus der Abb. 6 ersichtlich ist, genügend Beweiskraft für die Annahme zubilligen, daß diese Eigenschaft zu den eigentümlichen Merkmalen der stimulierten großen „blasten“ähnlichen Zellen gehört.

Bei gleichzeitiger Berücksichtigung der cytochemischen Beobachtungen von QUAGLINO u. Mitarb. und der elektronenmikroskopischen Untersuchung von TANAKA u. Mitarb. sowie ELVES u. Mitarb. lassen sich die Merkmale der aktivierten Lymphocyten der Kultur wie folgt skizzieren: eine besondere Zellgröße; einer sehr lebhaften schubartige Mitoseaktivität, die nach einem Intervall dem Beginn der Aktivierung folgt; eine ausgeprägte Basophilie (und auch Pyroninophilie) des Cytoplasmas, die auf einem hohen Ribosomengehalt beruht; eine lockere Chromatinstruktur des Zellkerns; ein fast riesenhafter Nucleolarapparat und schließlich besondere Verhaltensweisen, wie die aktive Motilität, die auffällige Neigung zu einer Verwurzelung an einem Substrat und das Fehlen von Phagocytose und Pinocytose.

Die Anwendung von Kultivierungsmethoden bei menschlichen weißen Blutzellen hat eine Reihe älterer Autoren (vor allem MAXIMOW; AWROW und TIMOFJEWSKI) zu einer dynamisch geprägten Anschauungsweise des Lymphocyten bewogen. Diese ging in der dem Lymphocyten zugebilligten Potenz bis zu der Annahme einer allgemeinen Stammzellfunktion des hämatopoetischen Gewebes. Ähnliche Vorstellungen erarbeitete in neuerer Zeit unter anderem eine Bristoler Arbeitsgruppe, voran YOFFEY. Die einzelnen Details der von den genannten älteren Autoren vertretenen Meinungen und manche ihrer Fehlinterpretationen brauchen hier nicht erörtert zu werden. Gegenüber der Theorie aber, nach der der Lymphocyt eine endgültige differenzierte Zellform darstellt (s. HEILMEYER und BEGEMANN; LENNERT), bringen die neueren Ergebnisse der Züchtung menschlicher Blutzellen *in vitro* jene Beobachtungen von MAXIMOW u. a. in einer allgemeinen Weise zu erneuter Aktualität.

Beweise dafür, daß sich die großen „blasten“artigen Zellen der Kultur tatsächlich unter der Einwirkung von Phytohämagglutinin aus den kleinen Lymphocyten entwickeln, wurden von mehreren Arbeitsgruppen vorgebracht (CARSTAIRS; ASTALDI u. Mitarb.; BERMANN und STULBERG; ELVES u. ISRAELS; ELVES und WILKINSON; LING und HUSBAND; FISCHER und GROPP). Einen quantitativen

Beleg lieferten MCKINNEY u. Mitarb. mittels Untersuchungen zur DNS-Synthese der Zellen im Laufe dieser Umwandlungsvorgänge. Auch nach den hier mitgeteilten Beobachtungen kann es nicht zweifelhaft sein, daß die phytohämagglutinin-aktivierten Zellen der Kultur nur aus den Blutlymphocyten entstehen und umgekehrt, daß sich unter den besonderen Züchtungsbedingungen bei Phytohämagglutinin-einwirkung nahezu sämtliche Lymphocyten des Ausgangsmaterials zu den großen „blasten“artigen Zellen umwandeln. Der menschliche kleine Blutlymphocyt ist demnach keine Endstufe einer Differenzierungsreihe ohne Entwicklungspotenz, sondern vielmehr eine Zellform, der zumindest in vitro eine ausgeprägte Transformationsfähigkeit und morphogenetische Plastizität zu kommt.

Damit könnte auch die Frage gestellt werden, ob eine Unterscheidung verschiedener Lymphocytenarten aufgrund morphologischer Merkmale allein, etwa der Kernform, der Nucleoli usw. (s. GRUNDMANN, LENNERT), gerechtfertigt ist; denn die unterscheidenden Merkmale gehören zu denen, die sich im Verlaufe der Lymphocytentransformation als besonders variabel erweisen.

Eine ähnliche Wirkung wie das Phytohämagglutinin können bakterielle Antigene, wie Tetanus-, Diphtherie-Toxoid u. a., vor allem aber auch das Tuberkulin auf Lymphocyten ausüben, vorausgesetzt, daß es sich um kompetente Lymphocyten eines sensibilisierten Spenders handelt (PEARMAIN u. Mitarb.). Auch dann entstehen bei der Züchtung in vitro die gleichen großen mitoseaktiven Zellen. In einer ganz allgemeinen Weise ergibt sich daraus, daß es sich bei der Entstehung der „blasten“artigen Zellen um eine immunologische lymphocytenspezifische Reaktion auf ein Antigen handelt. Möglicherweise beruht aber die besondere Wirksamkeit des Phytohämagglutinins nur auf einer Kopie einer derartigen, sonst von spezifischen Antigenen hervorgerufenen Reaktion. Zu der Frage des Wirkungsmechanismus des Phytohämagglutinins tragen jüngste Untersuchungen von MICHALOWSKI u. Mitarb. unter Verwendung eines durch einen Fluoreszenzfarbstoff markierten Phytohämagglutinins bei. Danach läßt sich annehmen, daß diese Substanz am Zellkern des Lymphocytens angreift.

Schlußfolgerungen

Es ließe sich die Frage stellen, ob die phytohämagglutinin-induzierte Transformation der Lymphocyten einer Rückdifferenzierung zu einer Stammzelle des lymphocytären Systems, ja, vielleicht weiter zurück noch einer primitiven Stammzelle des hämatopoetischen Systems entspricht (ASTALDI), oder ob es sich um eine besondere Form einer Stimulation und Aktivierung handelt. Diese Frage dürfte zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sicher zu entscheiden sein: Die Kenntnis derartiger Umwandlungen beruht bisher ganz vorwiegend auf Beobachtungen an einem Blutzellzüchtungs-System in vitro, bei dem die Vorgänge immer nach der gleichen Art einer vorübergehenden Stimulation mit einem Mitoseschub ablaufen, ohne daß die dann entstehenden großen „blasten“artigen Zellen eine weitere Entwicklung zeigen. Allerdings konnten ELVÉS u. Mitarb. nachweisen, daß die phytohämagglutinininduzierten großen Zellen γ -Globulin zu bilden in der Lage sind. In Anbetracht der Möglichkeit des Erwerbs solcher Fähigkeiten, wie auch aufgrund der Beobachtung, daß unter anderen Kulturbedingungen (FISCHER und GROPP) die Lymphocyten auch eine andere Form einer Umwandlung zeigen

können, ließe sich vielleicht eher schließen, daß es sich um eine *Aktivierung* einer Zellform handelt, die sonst als Ruheform vorliegt und aufgrund ihrer Modulationsfähigkeit (ASTALDI) je nach der Art des einwirkenden Reizes eine Umwandlung erfahren kann.

Die in der Kultur unter der Phytohämagglutinin-stimulation auftretenden großen „blasten“artigen Zellen besitzen morphologisch eine bis ins einzelne gehende Ähnlichkeit mit gewissen Zellformen, die im Lymphknoten unter krankhaften Bedingungen auftreten, oder auch zu Zellen, die zu den Vorstufen der

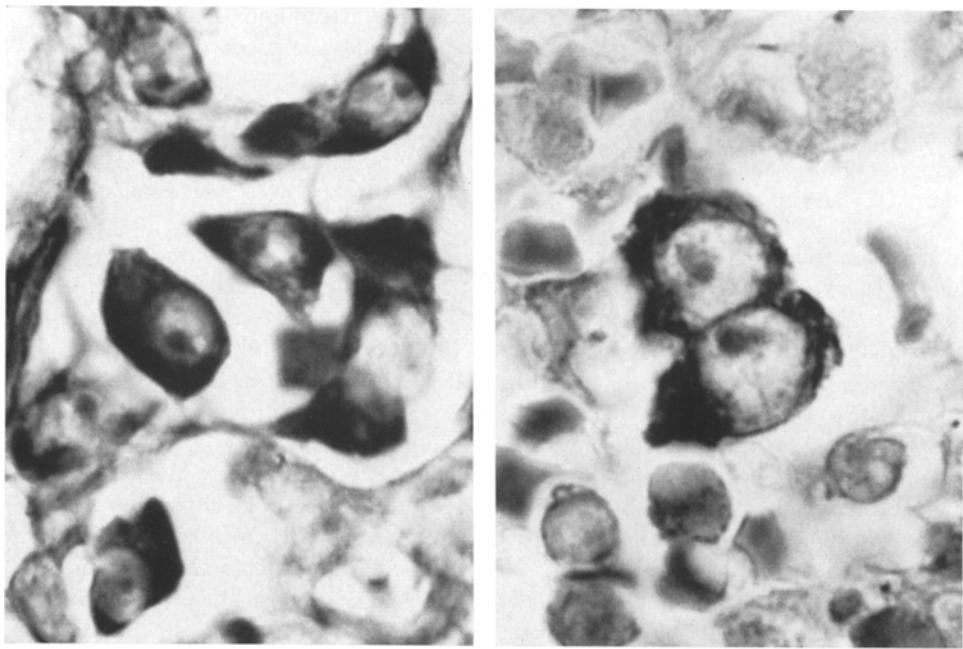


Abb. 6a u. b. Sogenannte basophile Stammzellen; Giemsa-Färbung. — a Ausschnitt aus einem Lymphknoten bei Lymphogranuloma inguinale. — b Zwei derartige Zellen in einem Milzsinus bei einem Fall von generalisierter hyperergischer Thrombangiopathie

Plasmazellen gerechnet werden (LENNERT). Besonders fällt die Ähnlichkeit der in der Kultur entstehenden großen Zellen mit den sog. *basophilen Stammzellen* (BEGEMANN; LENNERT) auf. Die Abb. 6 zeigt zum Vergleich derartige Zellen sowohl aus einem Lymphknoten bei Lymphogranuloma inguinale (Abb. 6a), wie auch bei einem Fall einer generalisierten hyperergischen Thrombangiopathie in den Milzsinus (Abb. 6b). Die bisher ungeklärte Stellung der sog. basophilen Stammzellen, von denen angenommen wird (vgl. LENNERT), daß sie unter anderem bei einer antigenen Stimulation auftreten und bei denen auch Beziehungen zur Antikörperproduktion zu vermuten sind, könnte — wenn man die Bildung der großen basophilen Zellen in der Kultur als Modell für ihre Entstehung ansieht — einer Aufklärung nähergebracht werden. Man dürfte dann annehmen, daß es sich bei den sog. basophilen Stammzellen nicht etwa um Vorstufen von Lymphocyten handelt, sondern um aktivierte Zellformen, die bei gegebener spezifischer Stimulation im Rahmen bestimmter Entzündungen oder anderer Alterationen des Lymphknotens auftreten.

Manche Eigenschaften der großen „blasten“artigen Zellen der Kultur, unter anderem auch das Vorhandensein von Adenosintriphosphatase und ihre besondere Lokalisation (SCHUBERT u. RINNEBERG), der gelegentlich stärkere Gehalt des Cytoplasmas an saurer Phosphatase und einzelne der anderen morphologisch-färberischen Eigenschaften, könnten auch an Beziehungen zu dem plasmacellulären System denken lassen: die Morphologie der aktivierten Zellen der Kultur und diejenige der sog. Plasmazellvorstufen ist jedenfalls von so großer Ähnlichkeit, daß von der vergleichenden Betrachtung her ein Unterschied nicht aufzufinden ist. Ob aber tatsächlich die sog. basophilen Stammzellen oder die Plasmazellvorstufen unter dem Blickpunkt einer Identität mit den aktivierten Lymphocyten *in vitro* betrachtet werden dürfen und ob sich die allein auf einer statisch ausgerichteten Cytologie aufgebauten Einteilungsschemata der lymphoiden Zellen durch die mehr dynamische Auffassung unterschiedlicher Transformationsfähigkeiten innerhalb eines Zellsystems ersetzen lassen, müßten zukünftige Forschungen erweisen.

Zusammenfassung

Bei der Züchtung von menschlichen weißen Blutzellen unter der Einwirkung eines aus Phaseolus vulgaris extrahierten Phytohämagglutinins entstehen aus den kleinen Blutlymphocyten große „blasten“artige Zellen, die sich mitotisch vermehren. Zu ihren wichtigsten Merkmalen aufgrund färberischer, baustein- und enzymcytochemischer Analyse gehören: ein ausgeprägt basophiles Cytoplasma mit groben sudanophilen Granula; ein locker strukturierter Zellkern und sehr große Nucleoli; eine deutliche ATPase-Aktivität an den Zellsäumen; eine in vereinzelten Zellen auftretende stärker positive Reaktion der sauren Phosphatase (Azofarbstoffmethode). — Bei phasenkontrastmikroskopischer Lebendbeobachtung zeigen die phytohämagglutinin-stimulierten Zellen eine verstärkte, sehr lebhafte Cytoplasmamotilität zugleich mit einer Neigung, sich mittels eines basalen Fortsatzes an ein Substrat anzuheften.

Die Kultivierungsversuche beweisen, daß der Blutlymphocyt nicht eine Endstufe ohne Entwicklungspotenz ist, sondern vielmehr eine Zellform mit ausgeprägter Transformationsfähigkeit. Die besondere Art der Umwandlung des kleinen Lymphocyten zu der „blasten“artigen Zelle dürfte einer Aktivierung entsprechen, wie sie offenbar auch unter einem antigenen Stimulus hervorgerufen werden kann.

Die aktivierten Zellen der Kultur besitzen eine große Ähnlichkeit mit den sog. basophilen Stammzellen und gewissen Plasmazellvorstufen im lymphatischen Gewebe. Es wird die Möglichkeit erörtert, daß es sich bei diesen Zellformen um aktivierte Lymphocyten handeln könnte.

Studies of the Phytohemagglutinin-induced Transformation of Human Blood Lymphocytes to Blast-like Cells

Summary

When human white blood cells are cultured *in vitro* in the presence of phytohemagglutinin extracted from Phaseolus vulgaris, large "blast-like" cells develop from the small lymphocytes and divide mitotically. From the analyses of their staining properties and enzyme-cytochemical behavior their most important characteristics may be stated as: a pronounced basophilic cytoplasm with coarse

sudanophilic granules, a loosely structured nucleus, very large nucleoli, a distinct ATPase activity at the cell borders, and a strongly positive acid phosphatase reaction in individual cells (azo-dye method). Phase microscopic studies of living cells stimulated with phytohemagglutinin reveal an increased and very lively motility of the cytoplasm. At the same time the cells show a tendency to adhere to a substrate by means of a basal process.

The experiments on the cultures indicate, that the blood lymphocyte is not an end-stage cell without developmental potentialities, but rather a type of cell possessing obvious abilities to undergo transformation. The distinct type of change of the small lymphocyte to the "blast-like" form may well correspond to an activation, as it apparently may also be called forth by an antigenic stimulus.

The activated cells of the culture are very similar to the socalled basophilic stem cells (hyperbasophilic cells) and certain plasma cell precursors found in lymphatic tissue. The possibility is discussed, that these cell forms may represent activated lymphocytes.

Literatur

- ASTALDI, G.: Das Phytohämagglutinin und das Problem des Lymphocyten. *Med. Klin.* **59**, 368—371 (1964).
- E. STROSELLI e S. SAULI: Le cellule emiche nella ricerca citogenetica. *Haematologica* **47**, Suppl. 1—56 (1962).
- AWROROW, P. P., u. A. D. TIMOFEJEWSKI: Kultivierungsversuche von leukämischem Blute. *Virchows Arch. path. Anat.* **216**, 184—214 (1914).
- BARKA, T., and P. I. ANDERSON: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 741—753 (1962).
- BEGEMANN, H.: Klinische und experimentelle Beobachtungen an immunisierten Lymphknoten. Freiburg: H. F. Schulz 1953.
- BERMAN, L., and C. S. STULBERG: Primary cultures of macrophages from normal human peripheral blood. *Lab. Invest.* **11**, 1322—1331 (1962).
- CARSTAIRS, K.: The human small lymphocyte: its possible pluripotential quality. *Lancet* **1962 I**, 829.
- ELVES, M. W., J. GOUGH, J. A. CHAPMAN, and M. C. G. ISRAELS: Electron microscopy studies of lymphocytes. *Lancet* **1964 I**, 306—308.
- S. ROATH, G. TAYLOR, and M. C. G. ISRAELS: The in-vitro production of antibody lymphocytes. *Lancet* **1963 I**, 1292—1293.
- , and J. F. WILKINSON: The effects of phytohämagglutinine on normal and leukæmic leukocytes when cultured in vitro. *Exp. Cell Res.* **30**, 200—207 (1963).
- FISCHER, R., u. A. GROPP: Cytologische und cytochemische Untersuchungen an normalen und leukämischen in vitro gezüchteten Blutzellen. *Klin. Wschr.* **42**, 111—118 (1964).
- GRUNDMANN, E.: Neuere Befunde über Entstehung und Bedeutung des Lymphocyten. *Dtsch. med. Wschr.* **85**, 741—746 (1960).
- HEILMEYER, L., u. H. BEGEMANN: Blut und Blutkrankheiten. In: *Handbuch der inneren Medizin*, 4. Aufl., Bd. 2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951.
- HOFMANN-BERLING, H., u. H. H. WEBER: Die Isolierung des kontraktilen Eiweisses aus Sarkomzellen. *Naturwissenschaften* **42**, 608 (1955).
- LENNEET, K.: Lymphknoten. Cytologie und Lymphadenitis. In: *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Bd. I/3, Bandteil A. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1961.
- LETTRÉ, H., u. A. SCHLEICH: Zur Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure für Formkonstanz und Formänderungen von Zellen. *Protoplasma (Wien)* **44**, 314—321 (1954).
- LING, N. R., and E. M. HUSBAND: Specific and non-specific stimulation of peripheral lymphocytes. *Lancet* **1964 I**, 363—365.

- MAXIMOW, A.: Der Lymphocyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postnatalen Leben der Säugetiere. *Folia haemat.* (Lpz.) 8, 125—134 (1909).
- Bindegewebe und blutbildende Gewebe. In: *Handbuch der normalen mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. II/1, S. 232—583. Berlin: Springer 1927.
- MCKINNEY, A. A., F. STOHLMAN, and G. BRECHER: The kinetics of cell proliferation in cultures of human peripheral blood. *Blood* 19, 349—358 (1962).
- MICHALOWSKI, A., J. JASTNSKA, W. J. BRZOSKO, and A. NOWOSLAWSKI: Cellular localization of the mitogenic principle of phytohaemagglutinin in leukocyte cultures. *Exp. Cell Res.* 34, 417—429 (1964).
- NOWELL, P. C.: Differentiation of human leukemic leukocytes in tissue culture. *Exp. Cell Res.* 19, 267—277 (1960).
- ODUNJO, F., u. A. GROPP: Eine einfache Extraktionsmethode zur Herstellung von Phaseolin (Phytohaemagglutinin) aus *Phaseolus vulgaris*. *Naturwissenschaften* (im Druck).
- PEARMAIN, G., R. R. LYCETTE, and P. H. FITZGERALD: Tuberculin-induced mitosis in peripheral leukocytes. *Lancet* 1963 I, 637—638.
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. London: J. and A. Churchill 1960.
- QUAGLINO, D., F. G. J. HAYHOE, and R. J. FLEMANNS: Cytochemical observations on the effect of phytohaemagglutinin in short-term tissue cultures. *Nature (Lond.)* 196, 338—340 (1962).
- SCHUBERT, J. C. F., u. H. RINNEBERG: Der cytochemische Nachweis von Adenosintriphosphat spaltenden Fermenten bei pH 7,2 in menschlichen Knochenmarkausstrichen. *Blut* 8, 282—293 (1962).
- STOCKINGER, L., u. G. KELLNER: Der Lymphocytenukleolus. I. Mitt. Die Darstellung und Bedeutung des Nukleolus. *Wien. Z. inn. Med.* 33, 135—141 (1952).
- TANAKA, Y., L. B. EPSTEIN, G. BRECHER, and F. STOHLMANN jr.: Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood. *Blood* 22, 614—629 (1963).
- YOFFEY, J. M.: The present status of the lymphocyte problem. *Lancet* 1962 I, 206—211.

Priv.-Doz. Dr. A. GROPP und Priv.-Doz. Dr. R. FISCHER
Pathologisches Institut der Universität,
53 Bonn-Venusberg