

Aus dem Institut für Tieranatomie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Tieranatomie II,  
insbesondere Allgemeine Anatomie, Histologie und Embryologie  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

**Isolierung und Charakterisierung der hämatopoietischen Stammzellen aus  
dem Nabelschnurblut beim Rind  
(*Bos taurus*)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Dagmar Grandel  
aus  
Regensburg

München 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Hermanns

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Für Alex,  
meine Eltern  
und  
meine Geschwister



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
<b>1</b>	<b>Ontogenese des hämatopoietischen Systems .....</b>	<b>2</b>
1.1	Entstehung und Bedeutung des Hämangioblasten .....	2
1.2	Hämatopoese im Dottersack (megaloblastische Phase) .....	3
1.3	Hämatopoese in der PAS /AGM-Region .....	4
1.4	Hämatopoese in Leber und Milz (hepato-lienale Phase) .....	5
1.5	Hämatopoese im Knochenmark (myeloische Phase) .....	7
<b>2</b>	<b>Unterschiede in HSC aus verschiedenen ontogenetischen Quellen .</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Biologie der HSC .....</b>	<b>9</b>
3.1	Verhalten der HSC im Zellzyklus .....	9
3.2	Telomere und Telomerase in HSC .....	11
3.2.1	Aufbau und Funktion der Telomere .....	11
3.2.2	Funktion der Telomerase .....	11
3.2.3	Telomerlänge und Telomeraseaktivität in HSC .....	12
3.3	Selbsterneuerung, Differenzierung und „commitment“ .....	13
3.3.1	Selbsterneuerung und Differenzierung .....	13
3.3.2	Lineage-commitment .....	15
<b>4</b>	<b>In vitro- und in vivo-Testverfahren zum Nachweis von HSC .....</b>	<b>16</b>
4.1	In vitro-Testverfahren .....	17
4.2	In vivo-Testverfahren .....	18
<b>5</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung der HSC .....</b>	<b>20</b>
5.1	CD34 .....	20
5.1.1	Aufbau und Vorkommen von CD34 .....	20
5.1.2	Funktion und Bedeutung von CD34 .....	21
5.1.3	Expression von CD34 auf UCB-HSC .....	22
5.1.4	Bovines CD34 .....	23

<b>5.2</b>	<b>c-kit .....</b>	<b>24</b>
5.2.1	Aufbau und Vorkommen von c-kit.....	24
5.2.2	Expression von c-kit auf UCB-HSC.....	26
5.2.3	Funktion von c-kit .....	27
5.2.4	Bovines c-kit.....	27
<b>5.3</b>	<b>Rhodamin 123, Hoechst 33342 und die ABC-Transporter-Familie .....</b>	<b>28</b>
5.3.1	Rhodamin 123 .....	28
5.3.2	Hoechst 33342 und die „Side Population“ .....	30
5.3.3	Funktion von Rhodamin 123 und Hoechst 33342.....	31
<b>6</b>	<b>Morphologie der HSC und Blutzellen aus dem Nabelschnurblut..</b>	<b>31</b>
<b>6.1</b>	<b>Morphologie der HSC .....</b>	<b>31</b>
6.1.1	Lichtmikroskopie.....	31
6.1.2	Ultrastruktur der Hämatopoietischen Stammzellen.....	32
<b>6.2</b>	<b>Morphologie und Kinetik der Blutzellen beim bovinen Fetus .....</b>	<b>33</b>
6.2.1	Erythropoiese.....	34
6.2.2	Kinetik der Erythrozyten .....	34
6.2.3	Granulopoiese.....	35
6.2.4	Lymphopoiese .....	36
6.2.5	Monozytopoiese .....	36
6.2.6	Thrombopoiese .....	37
6.2.7	Kinetik der Leukozyten .....	38
<b>6.3</b>	<b>Ultrastruktur der Blutzellen und ihrer Vorläufer .....</b>	<b>39</b>
6.3.1	Erythrozyten und ihre Vorläufer .....	39
6.3.2	Granulozyten und ihre Vorläufer.....	39
6.3.2.1	<i>Neutrophile Granulozyten</i> .....	40
6.3.2.2	<i>Eosinophile Granulozyten</i> .....	41
6.3.2.3	<i>Basophile Granulozyten</i> .....	41
6.3.3	Lymphozyten.....	41
6.3.4	Monozyten.....	42
6.3.5	Megakaryozyten und Thrombozyten.....	42
<b>7</b>	<b>Glykohochemische Eigenschaften der HSC und der Blutzellen</b>	<b>44</b>

---

<b>III</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>48</b>
1	<b>Untersuchungsmaterial .....</b>	<b>48</b>
2	<b>Probennahme und Aufarbeitung.....</b>	<b>48</b>
2.1	Probennahme .....	48
2.2	Leukozytenzählung.....	49
2.3	Aufarbeitung der Blutproben für die Lichtmikroskopie.....	49
2.4	Aufarbeitung der Blutproben für die Elektronenmikroskopie.....	50
3	<b>Lichtmikroskopie .....</b>	<b>51</b>
3.1	<b>Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen .....</b>	<b>51</b>
3.2	<b>Immunhistochemische Färbungen.....</b>	<b>52</b>
3.2.1	APAAP-Methode .....	53
3.2.2	ABC-Methode .....	54
3.2.3	Immunfluoreszenz .....	55
3.3	<b>Glykohistochemische Färbungen .....</b>	<b>56</b>
3.3.1	Doppelfärbungen mit FITC- und Rhodamin-markierten Lektinen .....	56
3.3.2	Kompetitive Hemmung .....	57
4	<b>Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>57</b>
5	<b>Herstellung, Isolierung und Charakterisierung von Antikörpern aus dem Dottersack.....</b>	<b>57</b>
5.1	Immunisierung der Legehennen .....	58
5.2	Fällung der Antikörper aus dem Eidotter.....	59
5.3	ELISA und Western Blot.....	60
5.3.1	ELISA.....	61
5.3.2	Western Blot.....	62
<b>IV</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
1	<b>Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen.....</b>	<b>64</b>
1.1	<b>Morphologie der Blutzellen aus dem Nabelschnurblut .....</b>	<b>64</b>
1.1.1	Erythrozyten .....	64
1.1.2	Granulozyten .....	65

---

1.1.2.1	<i>Neutrophile Granulozyten</i> .....	65
1.1.2.2	<i>Eosinophile Granulozyten</i> .....	66
1.1.2.3	<i>Basophile Granulozyten</i> .....	67
1.1.3	Lymphozyten .....	67
1.1.4	Monozyten .....	68
1.1.5	Thrombozyten .....	68
1.1.6	Nicht klassifizierbare Zellen .....	69
1.1.7	Sonstige Zellen im Nabelschnurblut .....	70
1.1.7.1	<i>Vakuolisierte Zellen</i> .....	70
1.1.7.2	<i>Längliche Zellen</i> .....	70
<b>1.2</b>	<b>Kinetik der Blutzellen im Nabelschnurblut</b> .....	<b>71</b>
<b>2</b>	<b>Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen</b> .....	<b>74</b>
2.1	Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67 .....	74
2.2	Immunhistochemischer Nachweis von CD68 .....	75
2.3	Immunhistochemischer Nachweis von c-kit (C-19) .....	77
<b>3</b>	<b>Ergebnisse aus der Isolierung und Charakterisierung der polyklonalen anti-bovinen c-kit- und CD34-Antikörpern aus dem Eidotter</b> .....	<b>78</b>
3.1	Gewinnung der Antikörper aus dem Dotter .....	78
3.2	Charakterisierung der polyklonalen Dotterantikörper CD34 und c-kit im ELISA und Western Blot .....	79
3.2.1	Ergebnisse aus ELISA und Western Blot für CD34 .....	79
3.2.2	Ergebnisse aus ELISA und Western Blot für c-kit .....	80
3.3	Immunhistochemischer Nachweis von CD34 und c-kit unter Verwendung der Dotterantikörpern .....	81
3.3.1	Immunhistochemischer Nachweis von CD34 .....	82
3.3.2	Immunhistochemischer Nachweis von c-kit .....	84
<b>4</b>	<b>Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen</b> .....	<b>87</b>
4.1	Erythrozyten .....	87
4.2	Granulozyten .....	94
4.2.1	Neutrophile Granulozyten .....	94



---

4.2.2	Eosinophile Granulozyten .....	99
4.2.3	Basophile Granulozyten .....	101
4.3	<b>Lymphozyten.....</b>	<b>101</b>
4.4	<b>Monozyten .....</b>	<b>103</b>
4.5	<b>Thrombozyten.....</b>	<b>106</b>
4.6	<b>Nicht klassifizierbare stammzell-ähnliche Zellen.....</b>	<b>110</b>
4.7	<b>Phagozytierende Zellen .....</b>	<b>112</b>
5	<b>Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen .....</b>	<b>114</b>
5.1	<b>Erythrozyten .....</b>	<b>115</b>
5.2	<b>Neutrophile Granulozyten .....</b>	<b>115</b>
5.3	<b>Eosinophile Granulozyten.....</b>	<b>116</b>
5.4	<b>Lymphozyten.....</b>	<b>117</b>
5.5	<b>Monozyten .....</b>	<b>117</b>
5.6	<b>Thrombozyten.....</b>	<b>117</b>
5.7	<b>Nicht klassifizierbare Zellen.....</b>	<b>118</b>
<b>V</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>120</b>
1	<b>Morphologie der reifen Blutzellen und deren Vorläufer .....</b>	<b>120</b>
2	<b>Kinetik der Blutzellen während der Gravidität.....</b>	<b>126</b>
3	<b>Immunhistologische Untersuchungen.....</b>	<b>127</b>
3.1	<b>Vorkommen und Bedeutung des Proliferationsmarkers Ki-67 im Nabelschnurblut .....</b>	<b>127</b>
3.2	<b>Vorkommen und Bedeutung von CD68 im Nabelschnurblut .....</b>	<b>128</b>
4	<b>Isolation und Charakterisierung der HSC im Nabelschnurblut..</b>	<b>129</b>
4.1	<b>Morphologie der HSC im Nabelschnurblut .....</b>	<b>129</b>
4.2	<b>Vorkommen und Bedeutung von CD34 und c-kit im Nabelschnurblut.....</b>	<b>130</b>
4.2.1	<b>Charakterisierung und immunhistochemischer Nachweis von CD34.....</b>	<b>130</b>
4.2.2	<b>Charakterisierung und immunhistochemischer Nachweis von c-kit .....</b>	<b>132</b>
5	<b>Vorkommen und Bedeutung der Zuckerreste im Nabelblut.....</b>	<b>135</b>

---

<b>VI</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>138</b>
<b>VII</b>	<b>Summary .....</b>	<b>140</b>
<b>VIII</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>142</b>
<b>IX</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>169</b>
<b>X</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen, Abbildungen und Diagramme..</b>	<b>173</b>
<b>XI</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>177</b>
<b>XII</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>183</b>
<b>XIII</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>184</b>

## I Einleitung

Die Zelldifferenzierung ist ein grundlegender biologischer Prozess, bei dem aus einer totipotenten Eizelle über pluripotente Zwischenstufen (Stammzellen) spezialisierte, differenzierte Zellen entstehen. Pluripotente Stammzellen werden heute noch bevorzugt aus frühen Embryonen gewonnen. Auf Grund der rechtlichen Gegebenheiten in Deutschland werden von vielen Institutionen zurzeit erhebliche Anstrengungen unternommen, nicht embryonale Stammzellquellen zu erschließen.

Die Erforschung der hämatopoietischen Stammzellen (HSC) liefert hierbei eine Vielzahl an wichtigen Grundlagen zur Erforschung neuer Stammzellkompartimente, wie z.B. der neuronalen Stammzellen. Inzwischen wird davon ausgegangen, dass jedes Gewebe eine geringe Anzahl an pluripotenten Stammzellen besitzt, die sich in die verschiedenen benötigten Zellarten dieses Gewebes differenzieren können. Zusätzlich wird diskutiert, ob Stammzellen über Re- oder Transdifferenzierung Zellen eines anderen Gewebetyps bilden können.

Im hämatopoietischen System besitzen die HSC ein enormes Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential. Pro Tag werden in einem 70 kg schweren Menschen ca. 200 Milliarden Erythrozyten und 70 Milliarden neutrophile Granulozyten gebildet. Insgesamt werden jeden Tag ca. 1 Billion neue Blutzellen von nur einigen Tausend HSC gebildet.

Beim Menschen werden HSC aus verschiedenen Quellen gewonnen. Das Nabelschnurblut (UCB) neugeborener Kinder stellt inzwischen eine wichtige Quelle an Stammzellen, sowohl zur Forschung, als auch zur Therapie verschiedenster Erkrankungen dar. Das hohe Selbsterneuerungspotential und die starke Proliferationsbereitschaft der HSC macht sie zu idealen Zielzellen in der Biotechnologie. Als solche könnten sie auch eine weitreichende Verwendung in der Veterinärmedizin erfahren, da bekannt ist, dass UCB-HSC sowohl einfach zu gewinnen, als auch gut zu transfizieren sind.

Obwohl in der Humanmedizin die HSC und speziell die HSC aus dem Nabelschnurblut sehr gut erforscht sind, fehlen in der Veterinärmedizin und insbesondere beim Rind die Grundlagen für die Erforschung dieser Zellen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die primitiven Stammzellen und die Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut beim Rind morphologisch zu beschreiben und zu charakterisieren sowie mögliche Aufreinigerungsverfahren für diese Zellen zu entwickeln, um eine Basis für die Kultivierung und weitere Charakterisierung dieser Zellen zu schaffen. Des Weiteren sollten die im Nabelschnurblut der Kälber auftretenden, heranreifenden Blutzellen sowie deren Kinetik während der Fetalentwicklung beschrieben werden.

## II Literaturübersicht

### 1 Ontogenese des hämatopoietischen Systems

Die Entwicklung des hämatopoietischen Systems beim Säugetier ist gekennzeichnet durch das zeitlich aufeinanderfolgende Auftreten verschiedener hämatopoietischer Organe. Die erste Blutbildung findet im Mesoderm des Dottersacks und/oder im Mesoderm um die Aorta [para-aortic-splanchnopleura (PAS), aorta-gonad-mesonephros (AGM)] statt. Anschließend übernehmen die fetale Leber, die Milz und schließlich das Knochenmark diese Aufgabe. Nach der Geburt bleibt das Knochenmark lebenslang das Hauptorgan der Blutbildung.

Die Entwicklung des hämatopoietischen Systems der Säugetiere ist am besten erforscht bei der Maus. Daher beziehen sich die folgenden Ausführungen, soweit nicht anderes erwähnt, auf die Maus. Über die Differenzierung des blutbildenden Systems beim Rind gibt es nur wenige Angaben in der Literatur.

#### 1.1 Entstehung und Bedeutung des Hämangioblasten

Embryologisch sind alle Blutzellen mesodermalen Ursprungs. Da sie sowohl im Dottersack, als auch im Mesoderm um die Aorta in sehr enger zeitlicher und räumlicher Beziehung zu den Endothelien entstehen, wird schon lange ein gemeinsamer Vorläufer dieser beiden Zelltypen vermutet (Sabin, 1920). Unterstützt wird diese Vermutung durch neuere Untersuchungen, in denen nachgewiesen wurde, dass hämatopoietische und endotheliale Zellen gemeinsame Gene exprimieren. So kommt der Endothel-Rezeptor flk-2 (VEGF-R2) auch auf frühen Blutzell-Progenitoren vor (Christensen et al., 2001). Ebenso wurde der hämatopoietische Stammzell-Marker CD34 auf endothelialen Zellen gefunden (Fina et al., 1990). Auch weisen verschiedene knockout-Modelle an der Maus auf einen solchen gemeinsamen Vorläufer hin. Flk1<sup>-/-</sup> knockout-Mäuse sterben zwischen Tag 8,5 p.c. und 9,5 p.c. auf Grund fehlender Entwicklung von Gefäßen und Blutzellen im Dottersack (Shalaby et al., 1995). Dem Transkriptionsfaktor Runx1 wird eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Hämangioblasten zugeschrieben. Bei in vitro Untersuchungen an „embryoid bodies“ (EB) konnte gezeigt werden, dass Runx1<sup>-/-</sup> knock out-EB weitaus weniger „Blast-Cell forming Colonies“ [Bl-CFC, in vitro Äquivalent des Hämangioblasten (Choi et al., 1998)] hervorbringen, als EBs vom Wild-Typ (Lacaud et al., 2002). Bei Kultivierung von EBs unter Zugabe von VEGF entstanden Bl-CFCs, die sich bei Transfer in ein geeignetes Medium

sowohl in längliche endothel-ähnliche Zellen (CD31<sup>+</sup>) als auch in nicht-adherente runde Blutzellen entwickelten (Choi et al., 1998).

Der Hämangioblast stellt somit höchstwahrscheinlich die Ursprungszelle der HSC dar. Für die Entstehung der Stammzellen aus dem Hämangioblasten werden als Hauptlokalisationen das Mesoderm des Dottersacks und die Splanchnopleura um die Aorten-Anlage diskutiert.

## **1.2 Hämatopoiese im Dottersack (megaloblastische Phase)**

Metcalf und Moore (1970) stellten aufgrund früherer in vivo- und in vitro-Untersuchungen die Hypothese auf, dass sowohl die primitive als auch die definitive Hämatopoiese im Dottersack initiiert wird und die dort entstandenen Blutzellen alle anderen hämatopoietischen Organe besiedeln. Im Mausembryo entstehen am Tag 7,5 p.c. Verdickungen im extraembryonalen Mesoderm des Dottersacks, aus denen sich Blutinseln mit peripher gelegenen Endothelzellen und zentral befindlichen hämatopoietischen Zellen formieren. Die ersten sich differenzierende Blutzellen gehören der erythroiden Linie an (Moore & Metcalf, 1970). Des Weiteren werden im Dottersack primitive Megakaryoblasten und Makrophagen gebildet. Die Granulo- und Monozytopoiese ist im Dottersack kaum ausgeprägt. Ab Tag 9 p.c. besteht bereits ein Kapillarnetz, das die Blutinseln untereinander und den Dottersack mit dem Embryo verbindet. Ab diesem Zeitpunkt sind Blutzellen auch intraembryonal in der Zirkulation zu finden. Die Blutbildung im Dottersack hält bis Tag 12 p.c. an (Haar et al., 1971).

Beim Rind und beim Schaf übernimmt der Dottersack ebenso hämatopoietische Aktivität. Ab einer Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von 3 mm sind Blutinseln und entstehende Kapillaren mit primitiven Erythroblasten im Dottersack nachweisbar. Die primitive Hämatopoiese hält bis 11 mm SSL an, danach werden zunehmend kernlose definitive Blutzellen gebildet. Der Dottersack degeneriert ab 42 mm SSL (Rüsse et al., 1992).

Die Blutbildung im Dottersack kann in die primitive und definitive Hämatopoiese unterteilt werden. Ab Tag 7,5 p.c. beginnt die primitive Hämatopoiese, die die ersten primitiven erythroiden Vorläufer hervorbringt. Diese reifen zu großen primitiven kernhaltigen Erythrozyten (Megaloblasten), die sich in Morphologie und gebildetem embryonalen Hämoglobin von den definitiven Erythrozyten des Fetus und des Adulten unterscheiden (Goodall, 1908). Diese primitive Hämatopoiese findet nur vorübergehend im Dottersack statt und ist ab Tag 9 p.c. nicht mehr nachweisbar (Palis et al., 1999). Auch beim Mensch und beim Rind sind diese primitiven Erythrozyten nur temporär in der Zirkulation vorhanden (Winqvist, 1954; Oguro et al., 1978). Palis et al. (2001) wiesen neben der Bildung primitiver

erythroider Vorläufer im Dottersack der Maus auch die Entstehung von definitiven Vorläuferzellen nach. Die ersten definitiven hämatopoietischen Progenitoren können nach Beginn des 8. Tages p.c. im Dottersack nachgewiesen werden (Wong et al., 1986; Godin et al., 1995a). Im Gegensatz zu den primitiven Vorläufern verhalten sie sich *in vitro* multipotent (Palis et al., 1999) und treten als Blutzellen in den neu geformten Gefäßen auf (Palis et al., 2001).

Bei getrennter Kultivierung von Dottersack und Embryo am Tag 7 p.c. entstehen nur in der Dottersack-Kultur Blutzellen (Metcalf & Moore, 1970). Metcalf und Moore (1970) konnten am Tag 8 p.c. vor Etablierung der Zirkulation in *in vivo* Progenitor-Versuchen (colony-forming unit spleen, CFU-S) Vorläufer-Aktivität im Dottersack, nicht aber im Embryo selbst nachweisen. Weiteren Autoren gelang der Nachweis von Progenitor-Aktivität erst ab Tag 9 p.c. (Medvinsky et al., 1993). In den gängigen *in vivo*-Tests zum Nachweis funktioneller hämatopoietischer Stammzellen (Langzeit-Transplantations-Versuch in letal bestrahlte adulte Empfängertiere) konnte allerdings keine Stammzell-Aktivität im Dottersack vor Etablierung der Zirkulation gefunden werden (Müller et al., 1994). Nur bei Transplantation von Dottersackzellen in bestrahlte neugeborene Mäuse konnte eine Rekonstitution des gesamten hämatopoietischen Systems gezeigt werden (Yoder et al., 1997).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Dottersack die ersten noch primitiven Erythrozyten entstehen, deren Hauptaufgabe die Bereitstellung von Sauerstoff im Embryo ist (Moore & Metcalf, 1970; Palis et al., 2001). Über die Entstehung von definitiven Stamm- und Vorläuferzellen im Dottersack herrscht allerdings Uneinigkeit.

### **1.3 Hämatopoiese in der PAS /AGM-Region**

Im Mausembryo entsteht paraxial im Mesoderm die paarige Aortenanlage. Aus dem Mesoderm um die Aortenanlage (para-aortic splanchnopleura, PAS) entwickeln sich, zusätzlich zur bereits bestehenden Aorta, die Gonaden und die Urnieren (Mesonephros). Daher wird dieser Bereich auch Aorta-Gonaden-Mesonephros-(AGM)-Region genannt. Beim Vogel ist die hämatopoietische Aktivität dieser Region seit längerem bekannt (Dieterlen-Lievre, 1975). Medvinsky et al. (1993) entdeckten, dass in der Maus neben der Blutbildung im Dottersack auch intraembryonal Blutzellen entstehen. Sie wiesen in einem *in vivo*-Test (CFU-S8 und CFU-S11) die Entstehung von hämatopoietischen Vorläuferzellen im periaortalen Mesoderm ab Tag 9 p.c. nach. Von Tag 9,5 bis Tag 10 p.c. befanden sich sogar mehr CFU-S8 Zellen in dieser Region als im Dottersack (Medvinsky et al., 1993).

Cumano et al. (2001) stellten in einem Langzeit-Rekonstitutionsversuch fest, dass nur Vorläufer aus der AGM-Region und nicht aus dem Dottersack langfristig (6 Monate) die Bildung aller Blutzellen in bestrahlten Mäusen aufrechterhalten konnten. Wichtig hierbei war, dass die transferierten Zellen aus den embryonalen Donormäusen vor Etablierung der Zirkulation entnommen wurden. Auch konnte in weiteren in vivo Versuchen an Mäusen (colony-forming units spleen, CFU-S) die Entstehung von hämatopoietischen Vorläuferzellen in der AGM-Region früher als im Dottersack nachgewiesen werden (Medvinsky & Dzierzak, 1996; de Bruijn et al., 2000b). Die hämatopoietischen Progenitoren der PAS- und AGM-Region sind multipotent (Godin et al., 1993; Medvinsky & Dzierzak, 1996; Cumano et al., 2001). Über die Multipotenz der Vorläuferzellen aus dem Dottersack hingegen besteht Uneinigkeit (Palacios & Imhof, 1993; Godin et al., 1995a; Godin et al., 1995b; Cumano et al., 1996; Palis et al., 1999).

Innerhalb der AGM-Region besitzt die Aorta das größte hämatopoietische Potential (Tavian et al., 1996; de Bruijn et al., 2000b). Garcia-Porrero et al. (1998) und Tavian et al. (1996) wiesen in der Maus und im Menschen immunhistochemisch nach, dass nur die endothelialen Zellen der ventralen Aortenwand hämatopoietische Marker aufweisen. Dort entstehen von Tag 9,5 bei der Maus bzw. Tag 28 beim Menschen an sogenannte Cluster. Diese Zellansammlungen ragen ins Gefäßlumen hinein, stehen basal aber in Verbindung mit dem Endothel.

Immunhistochemisch handelt es sich bei diesen Zellen um Blutzellen, da sie sowohl mit dem hämatopoietischen Marker CD45, als auch mit dem Stammzellmarker CD34 positiv reagieren (Tavian et al., 1996; Garcia-Porrero et al., 1998; Labastie et al., 1998). Diese Clusterbildung aus hämatopoietischen Zellen wurde auch beim Rind nachgewiesen, wobei die Zellen den Progenitormarker c-kit exprimieren (Kritzenberger & Wrobel, 2004).

Außer in der AGM-Region wurde auch im Endothel der Dottersack- und Nabelgefäße sowie in der Urogenitalleiste (de Bruijn et al., 2000b) und in der Plazenta der Maus (Alvarez-Silva et al., 2003) hämatopoietische Aktivität gefunden.

Die Frage, ob die hämatopoietischen Stammzellen aus dem Dottersack und/oder aus der AGM-Region stammen, bleibt letztendlich ungeklärt. Viele Ergebnisse deuten auf einen Ursprung der HSC aus der AGM-Region hin, jedoch kann das oben erwähnte hämatopoietische Potential des Dottersacks nicht vernachlässigt werden.

#### **1.4 Hämatopoiese in Leber und Milz (hepato-lienale Phase)**

Im Mausfetus besiedeln ab Tag 10 p.c. hämatopoietische Zellen die sich differenzierende Leber und produzieren dort neue Blutzellen (Moore & Metcalf; 1970; Houssaint, 1981;

Garcia-Porrero et al., 1998). Bei der Blutbildung in der Leber, die im Gegensatz zum Knochenmark extravaskulär statt findet, steht die Produktion von erythroiden Zellen im Vordergrund (Tavassoli, 1991; Roy & Verfaillie, 1999).

Beim Menschen beginnt die hepatische Phase der Blutbildung in der 6. Gestationswoche (Petti et al., 1985). Die Hauptphase der hepatischen Hämatopoese bei der Maus beschränkt sich auf Tag 12-15 p.c. (Ikuta et al., 1992). Mit dem Ansteigen der hämatopoietischen Aktivität in der Leber, kommt es zu einem Abfall an Blutzellen sowohl in Dottersack (Moore & Metcalf, 1970) als auch in der AGM-Region (Medvinsky et al., 1993; Godin et al., 1995). Da die Leber selbst keine hämatopoietischen Stammzellen bilden kann, muss sie exogen von anderen hämatopoietischen Organen aus mit Stammzellen besiedelt werden (Houssaint, 1981; Houssaint & Hallet, 1988). Hierbei ist bis heute nicht geklärt, ob diese hämatopoietischen Stammzellen aus der AGM-Region, aus dem Dottersack oder aus beiden Lokalisationen stammen (Müller et al., 1994; Medvinsky Dzierzak, 1996; Palis et al., 1999; Kumaravelu et al., 2002). Bei der Hämatopoese in der Leber spielen Kupfferzellen, bzw. deren Vorläufer eine entscheidende Rolle. Sie stammen von den primitiven Makrophagen aus dem Dottersack ab und treten bereits am Anfang (ab Tag 10 p.c.) der hämatopoietischen Phase in den Sinusoiden der Leber auf (Naito et al., 1997). Um die sinusoidalen Makrophagen bilden sich erythroblastische Inseln aus, die auch einige Lymphozyten enthalten können. Es konnte gezeigt werden, dass diese Makrophagen von entscheidender Bedeutung für die Erythrozytenreifung sind, da sie zum einen Wachstumsfaktoren (EPO) produzieren und zum anderen die Enukleation der kernhaltige Erythroblasten unterstützen. Ebenso scheinen sie die streng regulierte, zeitlich aufeinanderfolgende Proliferation der T- und B-Zellen zu unterstützen (Li et al., 2004). Progenitor-Aktivität (CFU-S) wurde in der Leber der Maus ab Tag 10 p.c. (Moore & Metcalf, 1970) bzw. ab Tag 11 p.c. (Medvinsky et al., 1993) nachgewiesen. Zwischen Tag 12 und 15 p.c. kommt es zu einer starken Vermehrung der Progenitorzellen, die Anzahl der Blutzellen verdoppelt sich (Morrison et al., 1995). Der Nachweis von Stammzell-Aktivität in der Leber der Maus im Langzeit-Transplantationsversuch gelang ab Tag 11 p.c. (Müller et al., 1994) bzw. Tag 12 p.c. (Ema & Nakauchi, 2000). Ab Tag 16 p.c. kommt es zu einem Abfall der Progenitor-Aktivität in der Leber (Morrison et al., 1995; Ema & Nakauchi, 2000).

Bei in utero-Transplantation von HSC aus der fetalen Leber in die Bauchhöhle von Schaffeten bewiesen diese FL-HSC Stammzellpotential (Zanjani et al., 1994).



Die Leber bleibt das Hauptorgan der Blutbildung während der fetalen Entwicklung. In der Maus besiedeln ab Tag 17 hämatopoietische Stammzellen die Milz, die bei dieser Spezies lebenslang ihr hämatopoietisches Potential beibehält (Tavassoli, 1991).

### **1.5 Hämatopoiese im Knochenmark (myeloische Phase)**

Parallel zur Besiedelung der Milz wandern ab Tag 17/18 p.c. die hämatopoietischen Stammzellen auch in das fetale Knochenmark ein (Tavassoli, 1991). Beim Menschen beginnt die myeloische Phase der Hämatopoiese ab der 10. Woche, wobei die Granulopoiese überwiegt (Charbord et al., 1996). Nach der Geburt bleibt bei allen Säugetieren das Knochenmark das wichtigste Organ der Blutbildung. Hier siedeln die hämatopoietischen Stammzellen im roten Knochenmark und bilden lebenslang entsprechend dem aktuellen Bedarf neue Blutzellen. Unter pathologischen Bedingungen können auch andere, ehemals hämatopoietische Organe, wie die Milz oder die Leber die Blutbildung wieder aufnehmen. Während dem Übergang der Blutbildung von Dottersack und AGM-Region zur Leber und von der Leber in das Knochenmark kommt es zu einem Anstieg der Stamm- und Vorläuferzellen im peripheren Blut (Moore & Metcalf, 1970). Ebenso ist der hohe Stammzellgehalt des Nabelschnurblutes bedingt durch die noch nicht abgeschlossene Verlagerung der Hämatopoiese von der Leber ins Knochenmark. Durch diese Wanderung befinden sich vermehrt Stammzellen im zirkulierenden Blut. Der z.T. stark variierende Gehalt an HSC im Nabelblut wird durch die zeitlich unterschiedlich stark auftretenden Wanderungswellen der HSC in das Knochenmark erklärt (Roy & Verfaillie 1999; Wunder et al., 2001).

Worauf die aufeinander folgende Besiedelung der verschiedenen hämatopoietischen Organe beruht, ist letztendlich nicht geklärt. Eine entscheidende Rolle spielt die zeitlich unterschiedliche Ausdifferenzierung der Organe. Sie werden in der Reihenfolge besiedelt in der sie sich entwickeln. Des Weiteren sind Adhäsionsmoleküle sowohl auf den Blutzellen, als auch in den entsprechenden Organen von Bedeutung. Vorläuferzellen aus der fetalen Leber, dem Nabelschnurblut und dem adulten Knochenmark besitzen unterschiedliche Adhäsionsmoleküle auf ihren Oberflächen und binden so abhängig vom Gestationsstadium unterschiedlich gut an die verschiedenen hämatopoietischen Lokalisationen (Charbord et al., 1996; Roy & Verfaillie 1999).

### **2 Unterschiede in HSC aus verschiedenen ontogenetischen Quellen**

Stammzellen können aus verschiedenen Lokalisationen gewonnen werden. Am besten untersucht und experimentell am häufigsten verwendet werden Stammzellen aus der fetalen Leber, dem Nabelschnurblut, dem peripheren Blut und dem adulten Knochenmark. Die Stamm- und Progenitorzellen aus diesen verschiedenen Quellen unterscheiden sich sowohl phenotypisch, morphologisch, wie auch funktionell voneinander. Fetale Stammzellen aus der Leber oder dem fetalen Knochenmark sowie neonatale HSC weisen einige gemeinsame Charakteristika auf und unterscheiden sich von den adulten Stammzellen aus Knochenmark und Blut (Lansdorp, 1995b).

Phenotypisch identische Populationen aus der fetalen Leber, dem Nabelschnurblut und dem adulten Knochenmark bilden *in vitro* mit unterschiedlicher Kinetik Kolonien, wobei sich die zelluläre Zusammensetzung der einzelnen Kolonien in Abhängigkeit von der HSC-Quelle unterscheidet (Weekx et al., 1998; Holyoake et al., 1999). Die drei verschiedenen HSC-Populationen werden unterschiedlich gut durch Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert bzw. blockiert (Weekx et al., 1998). HSC aus der fetalen Leber und UCB-HSC zeigen einen erhöhten Zellumsatz mit mehr Zellteilungen als Knochenmarks-Stammzellen und bilden dabei mehr CD34<sup>+</sup>-Stammzellen. Knochenmarkszellen bilden im Gegensatz dazu vermehrt CD34<sup>-</sup>-Vorläuferzellen (Lansdorp et al., 1993). FL- und UCB-HSC besitzen des Weiteren einen höheren Gehalt an Vorläufer- und Stammzellen, die *in vitro* über lange Zeit Kolonien bilden (LTC-IC, long term culture-initiating cells) (Holyoake et al., 1999). Im Milzbesiedelungstest bilden Progenitoren aus der fetalen Leber mehr Milzkolonien und lassen sich zwei- bis dreimal besser serientransplantieren als Knochenmarksprogenitoren (Metcalf & Moore et al., 1970). Der Gehalt an primitiven CD38<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup>-HSC ist im Nabelschnurblut und der fetalen Leber höher (20,5 und 17,2 %) als im Knochenmark (Weekx et al., 1998).

Wie oben bereits erwähnt, werden auch Adhäsionsmoleküle auf HPC entsprechend der ontogenetischen Phase unterschiedlich exprimiert (Roy & Verfaillie, 1999).

Insgesamt lässt sich sagen, dass eine negative Korrelation zwischen Proliferationspotential sowie Selbsterneuerungsfähigkeit gegenüber dem ontogenetischen Stadium besteht (Lansdorp, 1995a; Lansdorp, 1995b).

### 3 Biologie der HSC

#### 3.1 Verhalten der HSC im Zellzyklus

Traditionell wurde angenommen, dass HSC eine ruhende Zellpopulation darstellen, in der die meisten Stammzellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus sind. Einige wenige Stammzellklone teilen sich aktiv und decken so den Bedarf an neuen Blutzellen (Lemischka et al., 1986). Nur ca. 8 % aller Stammzellen im Knochenmark treten pro Tag in den Zellteilungszyklus ein, wobei sich statistisch nach 180 Tagen über 99 % der HSC geteilt haben (Bradford et al., 1997; Cheshier et al., 1999). Die Anzahl der Zellteilungen steigt mit Differenzierung der HSC in Progenitorzellen. Folglich proliferieren die gemeinsamen lymphoiden oder myeloiden Vorläufer stärker als die primitiven Stammzellen (Morrison & Weissman, 1994; Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000). Ebenso verändert sich im Laufe der Ontogenese innerhalb des Stammzellpools die Zellteilungsaktivität. Einzelne HSC-Klone aus der fetalen Leber und dem Nabelschnurblut teilen sich häufiger als Knochenmarks-Stammzellen (Fleming et al., 1993; Lansdorp et al., 1993; Morrison et al., 1995). Die HSC aus diesen verschiedenen Quellen verhalten sich auch bezüglich der Aktivierbarkeit der ruhenden Stammzellen unterschiedlich. Auffallend hierbei ist der hohe Prozentsatz an ruhenden Stammzellen im Nabelschnurblut (>97% der CD34<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) im Vergleich zu anderen HSC-Kompartimenten (Knochenmark 88%). Diese ruhenden UCB-Stammzellen lassen sich *in vitro* nach Zytokin-Stimulation jedoch schneller aktivieren, als identische Zellpopulationen aus dem Knochenmark (Traycoff et al., 1994b; Rosti et al., 2000). In diesem Zusammenhang wird auch die Rolle des UCB-Plasmas und der darin enthaltenen Zytokine und Wachstumsfaktoren diskutiert (Traycoff et al., 1994b). Weiterhin besitzt die Zellzyklus-Phase Auswirkungen auf die biologischen und funktionellen Eigenschaften hämatopoietischer Stammzellen. Damit HSC proliferieren und expandieren können, müssen sie vermehrt die G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase verlassen und in die Mitose eintreten. Dieser Eintritt wird durch Zytokine reguliert, wobei so genannte „early acting“-Zytokine, wie z.B. der Stem Cell Factor (SCF) eine wichtige Rolle spielen, da sie als einzige ruhende HSC aktivieren können (Leary et al., 1992; Traycoff et al., 1994b; Uchida et al., 1997). Der Aktivierungszustand und damit das Zellzyklusstadium beeinflussen die Transplantationsfähigkeit der HSC stark. Die niedrigste Rekonstitutionsquote weisen HSC in der späten S-/frühen G<sub>2</sub>-Phase auf (Fleming et al., 1993; Habibian et al., 1998; Lambert et al., 2003). Die unterschiedliche Transplantationsfähigkeit der HSC in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus kann mit unterschiedlicher Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. VLA-4) während des Zellzyklus in Verbindung gebracht werden (Yamaguchi et al., 1998). Jedoch

wurden auch Veränderung im Adhäsionsverhalten der HSC gefunden, ohne offensichtliche Unterschiede in der Verteilung der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche nachweisen zu können (Glimm et al., 2000).

Die mitotische Inaktivität der HSC ist auch dafür verantwortlich, dass Stammzellen in kurz angelegten *in vitro*- und *in vivo*-Testverfahren, wie z.B. in der Kurzzeitkultur (STC) und Milzbesiedelungstest (CFU-S) nicht erfasst werden können, da der Zeitraum zur Aktivierung und Differenzierung in aktive, proliferierende Zellen nicht ausreicht (Magli et al., 1982). Des Weiteren inkorporieren ruhende HSC in der  $G_1/G_0$ -Phase nicht oder kaum Vital-Fluoreszenzfarbstoffe, wie Hoechst 33342 oder Rhodamin 123 und stellen sich so im Gegensatz zu den hell fluoreszierenden aktiven Zellen als nicht oder nur gering fluoreszierende Zellen dar (Spangrude & Johnson, 1990; Goodell et al., 1996). Ebenso sind sie resistent gegenüber Behandlungen mit bestimmten zytotoxischen Substanzen, wie Hydroxyharnstoff (Hydroxycarbamid) oder 5-Fluorouracil. Diese wirken selektiv auf sich teilende Zellen und töten sie ab. Ruhende HSC hingegen werden durch diese Stoffe nicht beeinflusst (Hodgson & Bradley, 1979). Beide Phänomene werden genutzt, um HSC selektiv zu kennzeichnen bzw. anzureichern (Spangrude & Johnson, 1990; Katayama et al., 1993; Goodell et al., 1996).

Abgeleitet von dem Verhalten hämatopoietischer Stammzellen im Zellzyklus gibt es zwei verschiedene Modelle, die Proliferation und Expansion der Stamm- und Progenitorzellen im hämatopoietischen System beschreiben. Die „clonal succession“ Theorie postuliert, dass im „steady state“ Knochenmark jeweils nur ein, maximal einige wenige Stammzellklone sich aktiv teilen und den Nachschub an Blutzellen gewähren. Die restlichen HSC befinden sich in der  $G_0$ -Phase bis die aktiven Klone verbraucht sind und durch neue bis dahin inaktive ersetzt werden (Kay, 1965). Transplantationsversuche unter Verwendung von retroviral markierten Stammzellen unterstützen diese Theorie (Lemishka et al., 1986; Capel et al., 1989). In dem anderen Modell hingegen wird davon ausgegangen, dass immer mehrere Klone gleichzeitig die Blutzellbildung aufrechterhalten und dass alle Stammzellen regelmäßig in den Zellzyklus eintreten (Bradford et al., 1997; Cheshier et al., 1999).

Möglicherweise haben beide Theorien ihre Gültigkeit, da nach Transplantation eine Vielzahl an HSC-Klonen aktiv sind, nach einigen Monaten die Hämatopoiese allerdings nur noch von einigen wenigen Klonen aufrecht erhalten wird (Lemishka et al., 1986).

### 3.2 Telomere und Telomerase in HSC

#### 3.2.1 Aufbau und Funktion der Telomere

Telomere sind nicht kodierende Tandemstrukturen an Chromosomenenden bestehend aus der Nukleotidabfolge (5'-TTAGGG-3')<sub>n</sub>. Am 3' Ende befindet sich zudem eine überhängende G-reiche einzelsträngige Nukleotidsequenz, die zusammen mit einem Proteinanteil die sog. T-Schleife am Chromosomenende bildet (Blackburn, 1992; Griffith et al., 1999).

Telomere dienen zum einen als Bindungsstelle für verschiedene DNA-bindende Proteine, zum anderen kennzeichnen sie die natürlichen Enden der Chromosomen, schützen sie vor ungewollter Fusion oder Degradierung und bilden einen Puffer für die kodierende DNA (Blackburn, 1992). Des Weiteren koordinieren sie die Positionen der Chromosomen im Kern während des Zellzyklus (Elwood et al., 2004).

Telomere besitzen eine geschätzte Größe von 5-10 kb (Harley et al., 1990). Während jedes Replikationszyklus verkürzen sie sich um eine bestimmte Anzahl an Basenpaaren (Allsopp et al., 1995). Da die DNA-Polymerasen zum Starten der DNA-Synthese einen RNA-Primer benötigen und einen neuer DNA-Strang ausgehend von diesem Primer nur in 5', 3'-Richtung synthetisieren werden kann, bleiben nach Verdauung des Primers am Ende des Replikationszyklus 25-100 Basenpaare am 3' Ende jedes Chromosoms untranslatiert („end replication problem“) (Harley et al., 1990; Vaziri et al., 1994). Somit kann eine Zelle voraussichtlich 50-200 Replikationszyklen durchlaufen, bis eine kritische Telomerlänge erreicht wird (Lansdorp, 1995a). Haben Telomere eine kritische Kürze erreicht, kommt es zur Unterbrechung des Zellzyklus im G<sub>2</sub>-Stadium und die Zellen verlieren ihr Proliferationspotential. Die Verkürzung der Telomere in jedem Replikationszyklus führt zur Zellalterung (Harley et al., 1992; Vaziri et al., 1994).

Die Telomerlänge ist abhängig von der Spezies, vom Alter, vom Geschlecht und vom Zelltyp (Allsopp et al., 1995; Allsopp et al., 2001; Cherif et al., 2003), wobei sich auch starke individuelle Schwankungen zeigen (Slagboom et al., 1994)

#### 3.2.2 Funktion der Telomerase

Telomere können nach jedem Zellzyklus de novo von dem Enzym Telomerase synthetisiert werden. Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, das aus einer katalytisch aktiven reversen Transkriptase und einem „telomerase RNA template“ besteht (Weinrich et al., 1997). Sie fügt in der S-Phase TTAGGG-Sequenzen an das überhängenden 3' Ende des Telomers an und wirkt so dem Verlust der Telomere in jedem Zellzyklus entgegen. Bis jetzt konnte dieses

Enzym nur in wenigen Zellpopulationen nachgewiesen werden. Neben einigen Tumor-Arten (Counter et al., 1994), immortalisierten Zelllinien (Counter et al., 1992) und den Keimzellen (Wright et al., 1996), besitzen auch hämatopoietische Stammzellen Telomerase (Morrison et al., 1996).

### 3.2.3 Telomerlänge und Telomeraseaktivität in HSC

HSC unterscheiden sich abhängig vom Ontogenesestadium und ihrem Alter in ihrer Telomerlänge. Stammzellen aus der fetalen Leber oder dem Nabelschnurblut besitzen längere Telomere als solche aus dem adulten Knochenmark (Lansdorp, 1994; Vaziri et al., 1994). Verkürzungen der Telomere treten, wie oben beschrieben auch bei Alterung des Organismus in HSC (Vaziri et al., 1994) und bei Kultivierung von Stammzellen auf (Engelhardt et al., 1997). Die Telomeraseaktivität sinkt also nicht nur während der Ontogenese, sondern auch bei der Differenzierung und Proliferation der Stammzellen (Chiu et al., 1996; Morrison et al., 1996).

Engelhardt et al. (1997) stellten fest, dass die Telomerase in humanen HSC mit dem Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus hoch reguliert wird. Ebenso kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg der Telomerase während der Expansionsphase von HSC in Zellkultur unter Zugabe von Zytokine (Chiu et al., 1996; Engelhardt et al., 1997). Ruhende HSC in der G<sub>0</sub>-Phase besitzen demnach gegenüber aktiven S/G<sub>2</sub>/M-Stammzellen eine reduzierte Telomeraseaktivität. Bei Expansionshemmung (z.B. durch TGFβ) oder Apoptoseinduktion kommt es zu einer Reduktion der Telomerase (Engelhardt et al., 1997).

Obwohl HSC Telomeraseaktivität besitzen, kommt es während der Replikation dennoch zu einem Verlust von Telomerstrukturen. (Engelhardt et al., 1997; Greenwood & Lansdorp, 2003). Dieses Phänomen spiegelt sich auch in der begrenzten Proliferationsfähigkeit hämatopoietischer Stammzellen bei den verschiedenen Transplantationsversuchen wieder. Bei Serientransplantation von HSC in Mäuse kommt es von Empfänger zu Empfänger zu einer deutlichen Abnahme der Telomerlänge, wobei die Verkürzung umso stärker ausfällt, je weniger Stammzellen infundiert werden (Allsopp, 2001). Die Telomerlänge steht also im Verhältnis zur Teilungshäufigkeit der einzelnen Zellen. Entsprechend diesen Ergebnisse können HSC aus Telomerase-k.o. Mäuse (Telomerase -/-) weniger oft nacheinander in neue Empfängertiere transplantiert werden, als Vergleichszellen aus Wildtyp-Mäusen und weisen zudem deutlich verkürzte Telomere auf (Allsopp et al., 2003).

Samper et al. (2002) hingegen konnten keine reduzierte Transplantationsfähigkeit in Serientransplantationen feststellen, beobachteten aber im kompetitiven Test bei gleichzeitiger

Infusion von Wildtyp-HSC und Telomerase-/- HSC einen Proliferationsnachteil der Telomerase-defizienten Zellpopulation gegenüber den Wildtypzellen. HSC aus Telomerase-defizienten Mäusen können demnach über eine verminderte Anzahl an Generationen HSC hervorbringen, besitzen aber nicht das für Stammzellen postulierte unbegrenzte Proliferationspotential (Samper et al., 2002).

Die Telomeraseaktivität in HSC wurde sowohl mit der hohen Selbsterneuerungsrate (Morrison et al., 1996) als auch mit dem hohen Proliferationspotential (Vaziri et al., 1994) der HSC in Verbindung gebracht. Obwohl hämatopoietische Stammzellen Telomerase bei Zellteilung hoch regulieren, kommt es dennoch zu einer Verkürzung der Telomere. Die Telomerase arbeitet nicht absolut, sondern sie scheint nur eine Telomerverkürzung zu verlangsamen (Engelhardt et al., 1997; Samper et al., 2002; Greenwood & Lansdorp, 2003).

### **3.3 Selbsterneuerung, Differenzierung und „commitment“**

Zu den wichtigsten Eigenschaften der hämatopoietischen Stammzellen gehören die Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit sowie das enorme Proliferationspotential. Das hämatopoietische System ist auf der Basis dieser Eigenschaften hierarchisch geordnet. Die primitivsten HSC besitzen das höchste Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential sowie die ausgeprägteste Multipotenz. Mit Reifung der HSC nehmen diese Charakteristika ab und der Differenzierungsgrad zu.

Bei jeder Zellteilung einer Stammzelle gibt es die Möglichkeiten, entweder durch Selbsterneuerung wieder eine Stammzelle hervor zu bringen, oder durch Differenzierung eine Progenitorzellen zu generieren. Progenitorzellen erfahren bei Zellteilung eine fortschreitende Festlegung auf eine bestimmte Zelllinie hin (engl: „commitment“).

#### **3.3.1 Selbsterneuerung und Differenzierung**

Bei der Entscheidung Selbsterneuerung oder Differenzierung ist von Bedeutung, dass Stamm- und Progenitorzellen sich auf zwei Arten teilen können. Bei einer symmetrischen Zellteilung entstehen aus einer Stammzelle zwei identische Tochterzellen, also entweder zwei Stammzellen oder zwei Progenitoren (Morrison et al., 1997a). Nach einer asymmetrischen Zellteilung unterscheiden sich die beiden Tochterzellen. So kann eine HSC eine neue Stammzellen und ein sich differenzierender Progenitor und ein multipotenter Progenitor zwei sich unterschiedlich differenzierende Progenitoren hervorbringen (Mayani et al., 1993b; Ema et al., 2000; Takano et al., 2004). Im hämatopoietischen System treten beide Formen der

Zellteilung auf, um zum einen eine Konstanthaltung bzw. Vergrößerung des Stammzellpools zu gewährleisten und zum anderen entsprechend den aktuellen Anforderungen differenzierte Blutzellen produzieren zu können (Mayani et al., 1993b; Morrison et al., 1997a; Aglietta et al., 1998; Brümmendorf et al., 1998).

Obwohl eine Reihe an kontroversen Modellen zur Selbsterneuerung und Differenzierung existieren, sind die Regulationsmechanismen weitgehend unbekannt (Till, 1963; Hayflick, 1965; Kay, 1965; Helman et al., 1978; Rosendaal et al., 1979; Reineck et al., 1982). Die beiden wichtigsten Modelle werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Im sog. stochastischen Modell stellt die Selbsterneuerung einen rein zufälligen Prozess dar. Bei jeder Zellteilung einer Stammzelle wird zufällig festgelegt, welchen weiteren Entwicklungsweg die Tochterzellen einschlagen (Ogawa et al., 1993). Die Wahrscheinlichkeit zur Bildung einer Stammzelle bzw. eines Progenitors liegt bei ungefähr 0,5 (Ogawa, 1993; Mayani et al., 1993b). Ebenso ist diesem Modell nach die Festlegung eines Progenitors auf eine bestimmte Zelllinie ein rein stochastischer Prozess (Lemischka et al., 1986).

In dem konträren deterministischen Modell hingegen wird davon ausgegangen, dass die Selbsterneuerung intrinsisch gesteuert und entsprechend dem genetischen Programm vorbestimmt ist (Müller-Sieburg et al., 2002), da sich anhand von Oberflächenmolekülen Stamm- und Progenitorzellpopulationen isolieren lassen, die sich bezüglich ihrer Selbsterneuerungsfähigkeit identisch verhalten. Diese Ergebnisse deuten somit auf eine Verknüpfung von Selbsterneuerungsaktivität und Genexpression hin (Morrison & Weissman, 1994). Anhand von Genexpressionsanalysen lassen sich Gene identifizieren, die in primitiven HSC hoch reguliert sind und bei Differenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien identisch herab reguliert werden (Bruno et al., 2004). Diese Gene, wie z.B. JAK/STAT, IL3, NOV (nephroblastoma overexpressed), könnten eine entscheidende Rolle in der Selbsterneuerung von HSC spielen.

Das Homeobox-Gen Produkt HoxB4 besitzt eventuell ebenfalls eine bedeutende Funktion bei der Regulation der Selbsterneuerung von Stammzellen. Bei Überexpression nach Transduktion von HoxB4 ist eine bis zu 1000-fach stärkere Expansion mit einer Vermehrung der HSC zu beobachten (Antonchuk et al., 2001). Ebenso scheinen Genprodukte der Polycomb Group (PcG)-Gene, wie Bmi-1 und der Transkriptionsfaktor Wnt an der Regulierung der Selbsterneuerung beteiligt zu sein (Lessard et al., 2003).

Auch die Differenzierung unterliegt deterministischen intrinsischen Faktoren. In Experimenten an klonalen Tochterzellen einer HSC aus dem Knochenmark adulter Mäuse konnte nachgewiesen werden, dass sich alle Tochterzellen identisch verhalten, wenn sie



einzel in verschiedenen Kulturen bzw. bestrahlten Empfänger-mäusen vermehrt werden. Diese monoklonalen Zellen bilden alle mit gleicher Kinetik Blutzellen einer bestimmten Zelllinie (Müller-Sieburg et al., 2002).

Die Rolle von exogenen Faktoren, wie Wachstumsfaktoren und Zellinteraktionen wird kontrovers diskutiert (Metcalf, 1998). In verschiedenen Experimenten wird eine Regulierung von Selbsterneuerung und Differenzierung durch Wachstumsfaktoren und Zytokine ausgeschlossen (Mayani et al., 1993b; Müller-Sieburg et al., 2002). Im Gegensatz dazu stehen Versuche, in denen die Häufigkeit der asymmetrischen Zellteilung und die Festlegung auf eine Zelllinie durch Zytokine und Wachstumsfaktoren verändert werden konnten (Kondo et al., 2000; Iwasaki-Arai et al., 2003; Takano et al., 2004).

Zusammenfassend erscheint das deterministische Modell zur Selbsterneuerung als wahrscheinlicher. Inwieweit das genetisch festgelegte Programm der Selbsterneuerung und Differenzierung durch exogene Faktoren beeinflusst werden kann, bleibt allerdings fraglich. Im Zusammenhang mit der Selbsterneuerungskapazität von Stammzellen wird immer wieder die Funktion der Telomerase diskutiert. Die funktionelle Verknüpfung von Telomeraseaktivität und Selbsterneuerungsfähigkeit ist jedoch letztendlich noch nicht endgültig aufgeklärt (Lansdorp et al., 1995a).

### 3.3.2 Lineage-commitment

Differenziert sich eine hämatopoietische Stammzelle verliert sie zunehmend ihr Selbsterneuerungspotential und legt sich auf eine bestimmte Zelllinie fest.

Im englischen Sprachgebrauch wird die Differenzierung einer Zelle auf einen bestimmten Entwicklungsweg (engl.: „lineage“) hin oder die Produktion eines Progenitors, der sich in eine bestimmte Richtung differenziert als „commitment“ bezeichnet.

Die primitivste aus der Maus isolierbare Stammzellpopulation mit dem Phenotyp  $c\text{-kit}^+$  Thy-1.1<sup>low</sup> Sca-1<sup>hi</sup> Lin<sup>-</sup> Mac-1<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> besitzt ein hohes Selbsterneuerungspotential sowie die Fähigkeit zur Langzeit-Rekonstitution nach Transplantation und zur Bildung aller Blutzellen (engl.: „multilineage“). Diese Population wird als „long term“ (LT)-HSC bezeichnet. „Short term“ (ST)-HSC ( $c\text{-kit}^+$  Thy-1.1<sup>low</sup> Sca-1<sup>hi</sup> Lin<sup>low</sup> Mac-1<sup>-</sup> CD4<sup>low</sup>) weisen nur noch begrenzte Selbsterneuerung und somit transiente, dennoch „multilineage“ Rekonstitution auf.

Multipotente Progenitoren (MPP,  $c\text{-kit}^+$  Thy-1.1<sup>low</sup> Sca-1<sup>hi</sup> Lin<sup>low</sup> Mac-1<sup>low</sup> CD4<sup>low</sup>) hingegen besitzen keinerlei Selbsterneuerung mehr (Morrison & Weissman, 1994). Die Differenzierung der HSC läuft immer von LT-HSC über ST-HSC zu MPP, wobei jeder Differenzierungsschritt irreversibel ist (Morrison et al., 1997b). In den Populationen der LT-

HSC bis zu den MPP nimmt auch der Gehalt an Telomerase ab. Im Weiteren treten oligopotente Vorläuferzellen auf, die zum einen auf den lymphoiden (Kondo et al., 1997) und zum anderen auf den myeloiden (Akashi et al., 2000) Entwicklungsweg fest gelegt sind. Der gemeinsame lymphoide Vorläufer (CLP: common lymphoid progenitor) produziert ausschließlich Vorläufer der B-, T- und Natural Killer-Zellen. Diese Zellen werden als Pro-B- und Pro-T-Zellen bezeichnet (Kondo et al., 1997). Aus dem gemeinsamen myeloiden Progenitor (CMP: common myeloid progenitor) entstehen die Vorläufer der Granulozyten und Makrophagen (GMP: Granulozyten-Makrophagen-Progenitor) und der Megakaryozyten und Erythrozyten (MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor). Diese spalten sich weiter auf in die Vorläufer der einzelnen Blutzelllinien. Die Zellen werden entsprechend ihres Koloniebildungsverhaltens in vitro (colony-forming unit, CFU) als CFU-MG (Macrophagen-Granulozyten), CFU-M (Makrophagen), CFU-G (Granulozyten), CFU-MegE (Megakaryozyten-Erythrozyten), CFU-Meg (Megakaryozyten) und BFU-E (Blast-forming unit erythrocyte) bezeichnet (Akashi et al., 2000).

Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die diesem strikten CLP-CMP-Modell widersprechen (Lu et al., 2002; Ema & Nakauchi, 2003; Takano et al., 2004).

Werden CLP-Zellen mit den Rezeptoren GM-CSF (colony stimulating factor) und IL-2 transduziert, die charakteristisch für myeloide Zellen sind, können diese an sich lymphoiden Zellen in geeigneter Kultur granulozytären und monozytären Zellen bilden (Kondo et al., 2000).

Sicher ist, dass HSPC im Laufe der Differenzierung ihr Selbsterneuerungspotential verlieren und sich auf eine Zelllinie festlegen. Ebenso wie bei der Selbsterneuerung ist jedoch der Mechanismus hinter diesem Reifungsprozess nicht bekannt. Auch die Endgültigkeit der Festlegung auf eine Zelllinie wird immer wieder diskutiert (Kondo et al., 2000). In neueren Untersuchungen wird immer wieder von der Differenzierung der UCB-Zellen in endotheliale Vorläufer, neuronale oder mesenchymale Stammzellen berichtet (Erices et al., 2000; Huss et al., 2000; Harraz et al., 2001; Bicknese et al., 2002). Von vielen Wissenschaftlern werden diese als De- oder Transdifferenzierung bezeichneten Prozesse allerdings angezweifelt (Weissman et al., 2001; Wells, 2002; Liu & Rao, 2003).

#### **4 In vitro- und in vivo-Testverfahren zum Nachweis von HSC**

Da es bis heute noch nicht gelungen ist, mit Hilfe von Markern eine funktionell einheitliche HSC-Population zu isolieren, sind in vitro- und in vivo-Tests unumgänglich, um den Gehalt

an HSC in einer phenotypisch charakterisierten Stammzellpopulation zu bestimmen. Experimentell werden HSC als sich selbsterneuernde, hämatopoietisch aktive Zellen definiert, die in der Lage sind, über einen langen Zeitraum alle Linien der reifen Blutzellen zu generieren.

Jeder Test sollte folglich die Kerneigenschaften Selbsterneuerung, Multipotenz und langfristige Hämatopoiese abdecken.

Zu unterscheiden sind die direkten und indirekten in vitro-Tests von den in vivo-Testsystemen.

#### **4.1 In vitro-Testverfahren**

Die direkten in vitro Tests erfassen den Gehalt an HSC anhand des Koloniebildungspotentials in Kultur. Optimalerweise besteht eine Kolonie aus klonalen Zellen einer Stammzelle, der sog. colony forming cell (CFC). Die Anzahl der Kolonien korreliert dann mit dem Gehalt an HSC in der Probe. Da auch bereits differenzierte Progenitoren in begrenztem Umfang noch Kolonien bilden können, entstehen entsprechend des Progenitortyps auch Kolonien, die nur eine oder einige wenige Blutzelllinien enthalten. Anhand der entstehenden Blutzelltypen kann eine Aussage über die Multipotenz getroffen werden. Über Passagen der Zellen aus der Kultur (engl.: „replating“) wird die Selbsterneuerungskapazität dieser Zellen getestet.

Abhängig von der Ausgangspopulation, dem Kulturmedium und dem Zusatz an wachstumsfördernden Faktoren gibt es verschiedene direkte Testsysteme:

- Blast Colony-Forming Cell Assay (CFC-Blast)
- High Proliferative Potential Colony-Forming Cell Assay (HPP-CFC)
- Cobblestone Area-Forming Cell Assay (CAFC).

Im „Limiting Dilution Assay“ kann durch Anfertigen einer Verdünnungsreihe aus einer Progenitor-Stammzellpopulation und anschließender Kultivierung der einzelnen Verdünnungsstufen die Anzahl der enthaltenen Stammzellen quantifiziert und statistisch erfasst werden (Ploemacher et al., 1991).

In einem indirekten „clonogenic“ Test können die eingesetzten Progenitoren selbst keine Kolonien bilden, sondern nur einzelne Vorläuferzellen generieren. Zu diesem Testverfahren zählen:

- Long Term Culture Assays (LTC)
- Delta ( $\Delta$ )-Assays.

### 4.2 In vivo-Testverfahren

In den in vivo-Tests können humane Stammzellen durch Xenotransplantation in Versuchstiere auf alle obligatorischen Charakteristika der HSC überprüft werden. Gegenüber den in vitro-Verfahren besteht der Vorteil, dass eine optimale Umgebung zur Proliferation und Differenzierung besteht und die Zellen so über Monate bis Jahre untersucht werden können. Die Selbsterneuerung kann durch serielle Transplantation / Serientransplantation der entsprechenden Zellpopulationen vom ersten in weitere Empfängertiere nachgewiesen werden.

Zur Xenotransplantation von humanen HSC wurden 2 wichtige Modelle etabliert:

- fetal sheep modell
- immunodeficient mice

Im „fetal sheep“-Modell werden in utero die zu untersuchenden Blutzellpopulationen in die Bauchhöhle von präimmunen Schaffeten transplantiert, so dass ovin-humane Blutchimären entstehen. Die humanen Blutzellen besiedeln die hämatopoietischen Organe des Schaffetus und können sich über Monate bis hin zu Jahren in der ovinen Umgebung vermehren und differenzieren (Flake et al., 1986, Srour et al., 1992, Zanjani et al., 1994).

Die in vivo-Tests in immundefizienten Mäusen beruhen darauf, dass Stamm- und Progenitorpopulationen in Mäuse infundiert werden, deren eigenes hämatopoietisches System zuvor durch Bestrahlung zerstört wurde. Nach einem definierten Zeitraum werden den Mäusen Knochenmark, Milz, Leber, Thymus oder das periphere Blut entnommen und die Organe auf Besiedelung durch Spender-Blutzellen untersucht. Bilden die infundierten Zellen differenzierte Blutzellen aller Linien, dann waren in den Spenderzellen multipotente Stammzellen enthalten, bilden sie nur wenige Blutzelllinien, stammen sie von festgelegten Progenitoren ab.

Um humane Blutzellen Mäusen transplantieren zu können, wurden spezielle Mauslinien gezüchtet, deren Immunabwehr stark reduziert ist. Bei Injektion von humanem Blut in diese Mäuse entstehen human-murine Blutchimären. Die sog. non-obese/severe combined immunodeficient (NOD/LtSz-scid/scid, NOD/SCID) Mäuse haben einen Defekt in den B- und T-Lymphozyten und Makrophagen sowie im hämolysischen Komplement (Greiner et al., 1995; Larochelle et al., 1996; Cashman et al., 1997; Bhatia et al., 1998). Durch Knock-out von  $\beta 2$  Mikroglobulin, einem MHC I-Klasse Molekül, wird in den NOD/SCID/ $\beta 2m$  null-Mäusen zusätzlich die Natural Killer-Zell-Aktivität ausgeschaltet (Christianson et al., 1997; Kollet et al., 2000). Durch Transplantation von Zellen aus einer Verdünnungsreihe („limiting

dilution“) kann auch in den in vivo-Testsystemen eine Quantifizierung erreicht werden. Die Anzahl an HSC in einer Ausgangspopulation kann so abgeschätzt werden.

Der erste funktionelle Test zur Charakterisierung von HSC, der Milzbesiedelungstest (colony forming units spleen assay, CFU-S), wurde von Till und McCulloch (1961) entwickelt. Er beruht darauf, dass hämatopoietische Vorläuferzellen, die Mäusen transfundiert werden, auch die Milz besiedeln und dort makroskopisch sichtbare Knötchen bilden. Der Ursprung dieser Knötchen ist jeweils eine hämatopoietische Vorläuferzelle, die die Kolonien klonaler Blutzellen bildet (Becker et al., 1963; Siminovitch et al., 1963). Hierbei treten abhängig von der Zeit zwei unterschiedliche Kolonietypen auf. Die zeitigen Kolonien am Tag 8 (CFU-S d8) und die späten am Tag 12 oder 13 können unterschieden werden (CFU-S d12 oder d13) (Magli et al., 1982). Funktionell stellen diese beiden Population unterschiedliche Differenzierungsstufen der transplantierten Vorläuferzellen dar. Die Blutzellen, die als erste Milzkolonien bilden, sind weiter differenzierte und zu einem höheren Prozentsatz im Zellzyklus als die Vorläuferzellen in den späten Milzknötchen (Wu et al., 1969; Magli et al., 1982). Beide Populationen stellen allerdings keine echten HSC dar, sondern sind nur wenig differenzierte Progenitoren. Auch im Milzbesiedelungstest lässt sich die dennoch vorhandene Selbsterneuerungsrate über Transfer der entsprechenden Milzkolonien aus dem ersten Empfängertier in ein zweites überprüfen (Siminovitch et al., 1963). Zusätzlich zu den CFU-S-Zellen wurden pre-CFU-S-Populationen beschrieben, die aufgrund ihrer Unreife per se noch nicht in der Lage sind Milzknötchen zu bilden. Erst nach vorheriger Aktivierung erlangen sie das Potential Kolonien zu bilden (Hodgson & Bradley, 1979).

HSC, die in einem bestimmten Testverfahren hämatopoietisches Stammzellpotential gezeigt haben, werden entsprechend diesem Test benannt. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die gängigen Testverfahren und die damit verbundenen Zellpopulationen.

Tab. 1: Übersicht über häufig verwendete in vitro- und in vivo-Tests zum allgemeinen Nachweis von HSC

	Versuch	Stammzellpopulation	Literatur
in vitro-Testsysteme	Blast Colony-Forming Cell Assay	Bl-CFC, Blast Colony-Forming Cell	Nakahata & Ogawa, 1982 Leary & Ogawa, 1987
	High Proliferative Potential Colony-Forming Cell Assay	HPP-CFC, High Proliferative Potential Colony-Forming Cell	McNiece et al., 1989 McNiece et al., 1990
	Cobble-Stone Area Forming Cell Assay	CAFC = Cobble-Stone Area Forming Cell	Gordon et al., 1985 Gordon et al., 1987
	Long Term Culture Assay	LTC-IC = Long Term Culture Initiating Cell	Sutherland et al., 1989
in vivo-Testsysteme	NOD/SCID-Assay	SRC = SCID-repopulating Cells	Shultz et al., 1995 Bhatia et al., 1998
	NOD/SCID/B2mnull-Assay		Christianson et al., 1997 Kollet et al., 2000
	Fetal Sheep Assay		Flake et al., 1986 Srouf et al., 1992; Zanjani et al., 1994
	Milzbesiedelungs-Test	CFU-S = Colony-forming Unit Spleen	Till & McCulloch, 1961
		pre-CFU-S	Hodgson & Bradley, 1979

## 5 Phänotypische Charakterisierung der HSC

### 5.1 CD34

#### 5.1.1 Aufbau und Vorkommen von CD34

Das CD34-Protein zählt zu den wichtigsten Proteinen zur Phänotypisierung von HSC.

Bisher konnte dieses Protein bei Mensch (Simmons et al., 1992; Sutherland et al., 1988), Maus (Brown et al., 1991; Suda et al., 1992), Hund (McSweeney et al., 1996; McSweeney et al., 1998), Katze (Yogalingam et al., 2003), Rind (Zhou et al., 2001) und Ziege (Frederici et al., 1995) isoliert werden.

CD34 ist ein integrales Membranprotein vom Typ I (Simmons et al., 1992). Es besteht aus einer zytoplasmatischen Domäne, einem transmembranösen Anteil und einer extrazellulären N-terminalen Domäne. Die zytoplasmatische Domäne (73 Aminosäuren) besitzt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für verschiedene Tyrosin-Kinasen, u.a. Protein-Kinase C (Fackler et al., 1992). Der proximale Bereich der extrazellulären Domäne (66 Aminosäuren) ist mit 6 Cystein-reichen Bereichen globulär angeordnet, der restliche extrazelluläre Anteil weist eine Vielzahl an O- und N-glykosidisch gebundenen Zuckern auf (Sutherland et al., 1988). Die O-glykosidisch gebundenen Zucker binden viele Sialinreste, so dass CD34 auch als Sialomiucin bezeichnet wird. Diese gebundenen Zucker scheinen einen modulierenden Einfluss auf die Funktion von CD34 zu haben (Sutherland & Keating, 1992; Baumhüter et al., 1993).

Bis auf das N-terminale Ende weist das CD34-Molekül unter den Säugetieren eine Homologie von 70-80 % auf (Brown et al., 1991).

Neben der 110-120 kDa-Form gibt es noch eine trunkeerte, durch alternatives Splicing entstandene verkürzte Form von ca. 100 kDa (Suda et al., 1992; Nakamura et al., 1993).

CD34 wird von primitiven Blutvorläuferzellen exprimiert. Während der Embryonal- und Fetalentwicklung ist dieses Antigen auf den hämatopoietischen Stammzellen aus Dottersack (Fina et al., 1990; Yoder et al., 1997), AGM-Region (Tavian et al., 1996), fetaler Leber sowie fetalem Knochenmark (DiGiusto et al., 1994) nachweisbar. Des Weiteren kommt es auf den HSC des adulten Knochenmarks, des peripheren Blutes und des Nabelschnurblutes vor.

Bei Differenzierung und Reifung der Vorläuferzellen wird CD34 auf der Oberfläche herunter reguliert (Terstappen et al., 1991; Tjonnfjord et al., 1996).

CD34 ist nicht auf hämatopoietische Zellen beschränkt, sondern wird unter anderem auch auf den Endothelien der meisten Kapillaren und kleiner Blutgefäße (Fina et al., 1990; Young et al., 1995), in „high endothelial venules“ (Baumhüter et al., 1993), in embryonalen Fibroblasten, in Knochenmarksstroma-Vorläufern sowie in einigen Zellen des Nervensystems exprimiert (Lin et al., 1995).

### 5.1.2 Funktion und Bedeutung von CD34

Die Funktion von CD34 ist noch nicht genau bekannt. Bei Versuchen mit CD34- knock-out Mäusen wurde zwar eine verzögerte myeloide und erythroide Differenzierung aus „embryoid bodies“ sowie eine verminderte Bereitschaft der hämatopoietischen Vorläuferzellen aus Dottersack, fetaler Leber und adultem Knochenmark zur Koloniebildung festgestellt. Die Mäuse entwickelten sich aber normal und wiesen auch keine weiteren Veränderungen des blutbildenden Systems auf (Cheng et al., 1996). Verschiedene Versuche weisen auf eine Rolle bei der Adhäsion der Stamm- und Vorläuferzellen hin (Majdic et al., 1994; Healy et al., 1995; Hu & Chien, 1998). Es konnte nachgewiesen werden, dass CD34 über Adhäsion die Proliferation der HSC verhindert und so die hämatopoietische Aktivität reguliert (Gordon et al., 2000).

Der Ligand für CD34 auf HSC ist noch unbekannt. CD34 der „high endothelial venules“ im Lymphknoten interagiert mit L-Selektin der Lymphozyten und vermitteln so eine Adhäsion an das Endothel (Baumhüter et al., 1993). Diese Interaktion besteht für HSC allerdings nicht (Sackstein et al., 1997). Die Bedeutung von CD34 als Marker für HSC wurde in einer Vielzahl von in vivo- und in vitro-Versuchen bestätigt. CD34<sup>+</sup> HSC besiedeln erfolgreich das

Knochenmark von Schimpansen, Mäusen, Menschen und Hunden nach myelosuppressiver Bestrahlung (Berenson et al., 1988; Hartnett et al., 2002).

In den verschiedenen in vivo-Verfahren zum Nachweis von HSC (NOD/SCID, LTC-IC) erwiesen sich CD34<sup>+</sup> HSC als besser geeignet als die CD34<sup>-</sup> Subpopulation (Civin et al., 1996; Morell et al., 1996; Hogan et al., 1997; Bathia et al., 1998; Donnelly et al., 1999).

Die Entdeckung, dass das Blutbildungssystem von Mäusen nach Bestrahlung durch eine einzige CD34<sup>-</sup> HSC wiederhergestellt werden kann (Osawa et al., 1996), führte zu einer Kontroverse über die Bedeutung von CD34 als Marker für HSC. In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte das hämatopoietische Potential der CD34<sup>-</sup> Stammzellen bestätigt werden (Goodell et al., 1997; Bhatia et al., 1998; Zanjani et al., 1998; Gallacher et al., 2000).

In weiteren Versuchen über den Phenotyp von HSC stellte sich heraus, dass die Expression von CD34 auf der Oberfläche der HSC sich im Laufe der Entwicklung veränderte. Langzeit-Transplantationsversuche mit Mäusen ergaben, dass Stammzellen aus fetalen Mäusen mit hohem „engraftment“ in der CD34<sup>+</sup> Population liegen, wohingegen bei adulten Tieren diese Fraktion eher CD34<sup>-</sup> ist. Die Konversion von CD34<sup>+</sup> zu CD34<sup>-</sup> findet demnach zwischen der 7. und 10. Woche nach der Geburt statt (Ito et al., 2000). In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass - zumindest in der Maus - die HSC aus dem adulten Knochenmark uneinheitlich CD34 exprimieren und dass diese Expression reversibel ist und nicht mit dem „engraftment“-Potential, sondern vielmehr mit dem Aktivierungszustand der HSC zusammenhängt (Goodell, 1999; Sato et al., 1999).

Insgesamt stellen die CD34<sup>+</sup> Stammzellen keine einheitlich Zellpopulation dar, sondern verhalten sich heterogen. Sie können durch eine Vielzahl an anderen Differenzierungsmarkern in funktionell unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden. Insbesondere das Oberflächenprotein CD38 unterteilt die CD34<sup>+</sup> Population in bereits sich differenzierende CD38<sup>+</sup> Progenitoren und noch primitive CD38<sup>-</sup> Stammzellen (Terstappen et al., 1991; Saeland et al., 1992; Mayani et al., 1993a; D’Arena et al., 1996).

### 5.1.3 Expression von CD34 auf UCB-HSC

CD34<sup>+</sup> Stammzellen verhalten sich abhängig von ihrer Herkunft bezüglich Expansions-, Proliferations- und Rekonstitutionspotential unterschiedlich (Traycoff et al., 1994b; Fritsch et al., 1996; Ito et al., 2000).

Während der Ontogenese nimmt der Gehalt an CD34<sup>+</sup> Zellen im peripheren und Nabelschnurblut ab (Wyrsh et al., 1999; Gasparoni et al., 2000; Tocci et al., 2003). Im UCB neugeborener Kinder ist der Gehalt an CD34<sup>+</sup> mononukleäre Zellen (MNC) geringer (1-3%)



als im adulten Knochenmark (3%) (Traycoff et al., 1994a; de Bruyn et al., 1995). Jedoch weisen die UCB-CD34<sup>+</sup> Zellen weniger Differenzierungsmarker (CD33, CD38) als die entsprechenden Populationen aus Knochenmark und peripherem Blut auf (Traycoff et al., 1994a; de Bruyn et al., 1995; Belvedere et al., 1999). Zudem besitzen sie ein höheres Potential in vitro Kolonien (viermal mehr CFU-GEMM, dreimal mehr BFU-E, zweimal mehr CFU-GM) zu bilden als myeloische CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> Zellen (Cardoso et al., 1993). Obwohl die Gesamtheit der mononukleären Zellen (MNC) aus dem Nabelblut im Vergleich zum Knochenmark ein höheres Rekonstitutionspotential in bestrahlten NOD/SCID-Mäusen zeigt, ist dieses in der CD34<sup>+</sup> Subpopulation geringer (Kim et al., 1999). Des Weiteren wurde in den MNC des UCB die höchste Frequenz an „SCID repopulating cells“ (SRC) nachgewiesen (1 aus  $9,3 \times 10^5$  in UCB, 1 aus  $3,0 \times 10^6$  im adulten Knochenmark, 1 aus  $6,0 \times 10^6$  im peripheren Blut, Wang et al., 1997).

Auch bei Untersuchungen der HSC aus Nabelschnurblut besteht bezüglich der CD34-Expression und ihrer Korrelation mit Stammzell-Eigenschaften Uneinigkeit. In NOD/SCID-Mäusen kann eine aus 614 CD34<sup>+</sup> humanen UCB-Stammzellen das Blutbildungssystem wiederherstellen. Dies bedeutet eine 1500-fache Anreicherung an HSC durch Selektion der CD34<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu den MNC aus dem Nabelblut (1 aus  $9,3 \times 10^5$ ). In der CD34<sup>-</sup> Population konnte hingegen kein hämatopoietisches Potential nachgewiesen werden (Bhatia et al., 1997). Im Gegensatz dazu stehen Versuche, in denen auch CD34<sup>-</sup> HSC aus dem Nabelschnurblut NOD/SCID-Mäuse rekonstituierten (Wang et al., 1997; Bhatia et al., 1998; Gallacher et al., 2000).

Auch wenn die Verwendung von CD34<sup>+</sup> HSC zu Transplantationszwecke immer wieder in Frage gestellt wird, beruhen die meisten Aufreinigungsverfahren zur Transplantation weiterhin auf der Selektierung der CD34<sup>+</sup> Zellen (Gluckman et al., 2000). Insgesamt wird davon ausgegangen, dass im UCB gleich viele oder sogar weniger CD34<sup>+</sup> HSC als im Knochenmark vorkommen, die UCB-HSC aber einem unreiferen Differenzierungsgrad entsprechen und deswegen besser geeignet sind für Transplantation und Gentransfer (Cardoso et al., 1993; Traycoff et al., 1994a; Gluckman et al., 2000).

#### 5.1.4 Bovines CD34

Beim Rind ist sowohl die Nukleotid-, als auch die Proteinsequenz des CD34-Moleküls bekannt (Zhou et al., 2001). Dabei ist das Protein identisch zum Menschen aufgebaut. Es besitzt eine N-terminale extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 35-286) mit einem Signalpeptid (Aminosäuren 1-34), einen hydrophoben transmembranösen Abschnitt

(Aminosäuren 287-311) und eine zytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 312-382), die an verschiedene Phosphorylasen gekoppelt ist. Die extrazelluläre Proteinkette besitzt sieben mögliche Stellen für N-glykosidische Bindungen und einen Cystein-reichen Abschnitt. Die Aminosäuresequenz des bovinen CD34 ist zu 66,1 % mit dem kaninen, zu 61,1 % mit dem humanen und zu 56,0 % mit dem murinen Protein identisch. Homologien von bis zu 90% bestehen in dem zytoplasmatischen und transmembranösen Abschnitten, wohingegen die extrazelluläre Domäne nur zu 45,8-57,4 % identisch ist (Zhou et al., 2001).

Im Northern Blot konnte eine einzelsträngige, 3,0 kb schwere CD34-RNA in Gehirn, Milz, Lunge, und Herz von fetalen Kälbern detektiert werden. Die Expression in der Leber hingegen war nur schwer nachzuweisen (Zhou et al., 2001). Über die Bedeutung von CD34 bei der Hämatopoiese des Rindes liegen keine Untersuchungen vor.

## 5.2 c-kit

### 5.2.1 Aufbau und Vorkommen von c-kit

Der Rezeptor c-kit stellt ein weiteres wichtiges Protein in der Entwicklung der Blutzellen dar und dient so als Marker für HSC. Dieser Rezeptor wurde als CD117 eingeordnet. Bisher wurden die Aminosäuresequenzen für c-kit bei Mensch (Yarden et al., 1987), Maus (Qiu et al., 1988), Ratte (Tanaka et al., 1991), Hund (Ma et al., 1999), Katze (Herbst et al., 1995), Schwein (Le Guern et al., 2003), Rind (Kubota et al., 1997), Ziege (Tanaka et al., 1997) und Huhn (Sasaki et al., 1993) sequenziert.

Strukturell gehört c-kit zu den Tyrosin-Kinase-Rezeptoren vom Typ III (Ullrich & Schlessinger, 1990) und weist Ähnlichkeiten zu weiteren in der Hämatopoiese wichtigen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie dem *flt3* (*fms-like tyrosine kinase 3*) / *flt2* (*fetal liver kinase 2*)-, dem M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*)- und dem PDGF (*platelet derived growth factor*) -Rezeptor auf (Lyman & Jacobsen, 1998).

Entdeckt wurde der c-kit-Rezeptor im Zusammenhang mit der Erforschung von Mutationen bei Mäusen im „Dominant White Spotting“(W)- und „Steel“(Sl)-Locus. Mäuse mit diesen Mutationen zeigen Anämie, fehlende Mastzell-Entwicklung, Pigmentierungsstörungen und Störungen in der Gametogenese (McCulloch et al., 1964; McCulloch et al., 1965; Russell et al., 1979). Die beiden Loci kodieren für ein Rezeptor-Ligand-Paar. Der W-Lokus kodiert für den Rezeptor c-kit, der Sl-Lokus für den entsprechenden Ligand „*steel factor*“ (SLF), ein integrales Membranprotein vom Typ I (Huang et al., 1990), auch *stem cell factor* (SCF), *kit Ligand* (KL) oder *mast cell growth factor* (MGF) genannt.

c-kit gehört strukturell zu der „Immunoglobulin gene superfamily“ und stellt ein „cell adhesion molecule“ (CAM) dar (Majumder et al., 1988). Das Protein besitzt bei Mensch und Maus 976 Aminosäuren und neun mögliche N-glykosidische Bindungsstellen im extrazellulären Bereich (Yarden et al., 1987). Dieser besteht aus fünf Ig-ähnlichen Bereichen mit der Bindungsstelle für SCF (Broudy, 1997).

Abhängig vom Gewebe variiert die kDa-Größe von c-kit entsprechend dem unterschiedlichen Glykosylierungsgrad von 140-155 kDa (Majumder et al., 1988). Das Proteingerüst besitzt bei Mensch und Rind ein geschätztes Gewicht von ca. 110 kDa. Es existieren mehrere Isoformen von c-kit. Durch alternatives Splicing entstehen zwei Isoformen, die sich in vier Aminosäuren unterscheiden (Broudy, 1997). Auch wurde eine lösliche Form des Rezeptors gefunden, deren Funktion jedoch unbekannt ist (Turner et al., 1995).

c-kit wird auf einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Es ist im Hoden, im Knochenmark, im embryonalen Gehirn, in Endothelien, in Cajal-Zellen des Darmapparates, Astrozyten, Nierentubuli, Epithelzellen, Schweißdrüsen und Milchdrüsenepithel, in Mastzellen und in Melanozyten vorhanden (Ashman et al., 1999; Rossi et al., 2000). Im hämatopoietischen System kommt c-kit auf Vorläuferzellen vor. Ca. 3 % der MNC aus dem Knochenmark sind deutlich c-kit-positiv, weitere 2-4% sind schwach positiv (Ogawa et al., 1991; Okada et al., 1991).

Über das hämatopoietische Potential der c-kit<sup>+</sup> Blutzellen besteht Uneinigkeit. Die meisten Autoren beschreiben ein erhöhtes hämatopoietisches Potential in der c-kit<sup>+</sup> Subpopulation, allerdings gibt es auch Versuche in denen nur die c-kit<sup>-</sup> Zellen in der Lage waren, Blutbildung in Empfängertieren nach Bestrahlung zu initiieren. Die c-kit<sup>+</sup> HSC bilden im CFU-S-Versuch Milzkolonien. Im Langzeit-Transplantationsversuch mit bestrahlten Mäusen lag das hämatopoietische Potential ausschließlich in der c-kit<sup>+</sup> Population (Okada et al., 1991; Ikuta & Weissman, 1992). Werden die c-kit<sup>+</sup> Zellen aus einer Knochenmark-Probe entfernt oder die Knochenmarkszellen mit c-kit-Antikörper vorbehandelt, bilden diese Zellpopulationen in vitro keine Kolonien mehr und auch die Fähigkeit zur Bildung von Milzkolonien nach Infusion in Mäuse geht verloren (Ogawa et al., 1991). Im Knochenmark von Antikörper-behandelten Tieren entstehen keine erythroiden und myeloiden Zellen mehr, nur B-lymphoide Zellen entwickeln sich weiterhin. Dies deutet darauf hin, dass c-kit hauptsächlich eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der myeloiden Zellen und Erythroblasten spielt, wohingegen die lymphoide Entwicklung unabhängiger von c-kit zu sein scheint (Ogawa et al., 1991; Okada et al., 1991).

In Transplantationsversuchen in der Maus wurde entdeckt, dass die primitiven ruhenden Progenitoren im Knochenmark nur sehr geringe Mengen an c-kit exprimieren. Aktivierte, im Zellzyklus befindliche Vorläufer regulieren c-kit an ihrer Oberfläche stark herauf. Mit zunehmender Differenzierung und Reifung nimmt c-kit wieder deutlich ab, so dass die reifen Blutzellen mit Ausnahme der Mastzellen c-kit-negativ sind (Katayama et al., 1993).

In Zellkultur entwickeln sich aus gering c-kit-exprimierenden Zellen ( $c\text{-kit}^{\text{low}}$ )  $c\text{-kit}^{\text{+}}$  Blutzellen. Diese Entwicklung läuft ohne Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ab, kann durch diese aber noch zusätzlich gefördert werden. Parallel zur Induktion von c-kit kommt es zur Aktivierung der Blutzellen.  $c\text{-kit}^{\text{-}}$  Zellen sind ruhende Blutzellen, da sie den Vitalfarbstoffe Rhodamin 123 in nur sehr geringen Mengen aufnehmen und durch Zytokine nur sehr schwer aktiviert werden können. (Sogo et al., 1997).

Mit einer einzigen  $CD34^{\text{-}}$   $c\text{-kit}^{\text{-}}$  Blutzelle konnte das hämatopoietische System von Mäusen nach Bestrahlung rekonstituiert werden (Osawa et al., 1996). Auch im fetalen Schaf-Modell konnte die Blutbildung mit diesen Zellen initiiert werden (Kawashima et al., 1996).

Allerdings war die  $c\text{-kit}^{\text{-}}$  Population nicht in der Lage, in vitro Kolonien zu bilden (Sogo et al., 1997).

Da  $c\text{-kit}^{\text{+}}$  Blutzellen zusätzlich auf ihrer Oberfläche in kleinen Mengen Differenzierungsmarker exprimieren, handelt es sich bei diesen Zellen um sehr frühe, aber bereits festgelegte („committed“) Vorläuferzellen (Ashman et al., 1991; Reisbach et al., 1993). Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die primitivsten HSC c-kit-negativ sind und  $c\text{-kit}^{\text{+}}$  Zellen aktivierte festgelegte Vorläuferzellen darstellen.

### 5.2.2 Expression von c-kit auf UCB-HSC

Im Nabelschnurblut sind fünf Prozent der mononukleären Zellen c-kit-positiv und unterscheiden sich somit nicht stark von dem Gehalt im Knochenmark. Nur 16% der  $c\text{-kit}^{\text{+}}$  Zellen exprimieren auch CD34 auf ihrer Oberfläche (Reisbach et al., 1993). Hingegen ist ein Großteil der  $CD34^{\text{+}}$  Progenitoren auch c-kit-positiv. Abhängig von der Herkunft der Vorläuferzellen unterscheidet sich der Gehalt an c-kit. Im Nabelschnurblut sind 80,7% der  $CD34^{\text{+}}$  Zellen c-kit-positiv, im Knochenmark 72,3% und im peripheren Blut 64,2% (Broudy et al., 1997; D’Arena et al., 1998). Bezüglich der hämatopoietischen Aktivität unterscheiden sich  $c\text{-kit}^{\text{+}}$  Zellen aus dem Nabelschnurblut nicht von denen aus anderen Quellen (Reisbach et al., 1993).

### 5.2.3 Funktion von c-kit

c-kit und sein Ligand SCF spielen eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Hämatopoese. SCF wird auch als „early acting cytokine“ bezeichnet (Leary et al., 1992; Uchida et al., 1997). c-kit stimuliert die Proliferation von Stammzellen. Insbesondere wird das Wachstum von frühen erythroiden Kolonien (blast forming units erythrocyte, BFU-E) gefördert, wohingegen spätere „colony-forming units erythrocyte“ (CFU-E) durch c-kit/SCF nicht so stark beeinflusst werden. Des Weiteren besitzen sie auch einen positiven Einfluss auf myeloide und gemischte Kolonien (CFU-GM, CFU-GEMM) (Papayannopoulou et al., 1991; Broudy et al., 1992). Hierbei entfalten c-kit/SCF ihre volle Wirkung nur im Synergismus mit anderen Wachstumsfaktoren, wie GM-CSF (Granulocyte-Macrophgen-colony stimulating factor), G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor), Erythropoeitin, Thrombopoeitin und IL-3 (Brandt et al., 1992; McNiece et al., 1991a). Die Proliferation von frühen pro-B-Zellen wird durch SCF in Kombination mit IL-7 gefördert (McNiece et al., 1991b). c-kit aktiviert den Eintritt der Stammzellen in den Zellzyklus und erhöht eventuell den Anteil an symmetrischen Zellteilungen und sorgt so für eine verstärkte Proliferation (Leary et al., 1992; Mantel et al., 2001). Die Selbsterneuerungsrate der HSC wird entgegen früherer Meinungen (Ogawa et al., 1991) nicht durch c-kit gesteigert (Li & Johnson, 1994). Eventuell spielt c-kit/SCF auch eine Rolle in der Adhäsion der HSC im Knochenmark (Sogo et al., 1997), bzw. in der Umverteilung der Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut und bei Mäusen auch in die Milz (Fleming et al., 1993).

### 5.2.4 Bovines c-kit

Beim Rind ist sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäure-Sequenz von c-kit bekannt. Das bovine Protein weist zu 83% bzw. 90% Homologien mit dem murinen und humanen c-kit auf, auch die verschiedenen Strukturelemente sind identisch zum Menschen angeordnet (Kubota et al., 1994). Die Antikörper gegen das bovine c-kit reagieren mit Blastenzellen im peripheren Blut (Hikono et al., 1999a).

18,3% aller Blutzellen im Knochenmark von Kälbern und 1,5% der Blutzellen im peripheren Blut adulter Kühe sind c-kit-positiv (Hikono et al., 2001a, Hikono et al., 2001b). Im Knochenmark coexprimieren nur sehr wenige c-kit<sup>+</sup> Zellen Differenzierungsmarker (0,7% G-1<sup>+</sup>, 0,7% CD14<sup>+</sup>, 8,2% CD3<sup>+</sup>, 1,0% IgM<sup>+</sup>). Die Gesamtpopulation der c-kit<sup>+</sup> Zellen sind morphologisch sehr heterogen. Die c-kit<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> besitzen vorwiegend Blasten-ähnliche Charakteristika. Sie stellen sich als große Zellen mit großem runden Zellkern, nur wenigen

oder keinen Nukleoli, leicht kondensiertem Chromatin, basophilem Zytoplasma und zum Teil rötlichen Granula dar. Hingegen ähneln die c-kit<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen morphologisch großen Lymphozyten und besitzen einen runden Kern mit großen deutlichen Nukleoli und reichlich Euchromatin sowie einen blassen Zytoplasmasaum (Hikono et al., 2001b). Im peripheren Blut herrschen die lymphozyten-ähnlichen Zellen vor. Entgegen dem Verhalten der c-kit<sup>+</sup> Zellen beim Menschen coexpressieren die bovinen c-kit<sup>+</sup> Zellen keine Marker für Granulozyten (G-1) und Monozyten (CD14), sondern lymphoide Marker (CD3, IgM, CD11b) (Hikono et al., 2001a).

c-kit konnte beim Rind mittels PCR im bovinen Knochenmark, im Lymphknoten und in der Milz nachgewiesen werden (Mertens et al., 1997). In einer immunhistologischen Studie über das Vorkommen von c-kit in Rinderfeten reagierten die primordiales Keimzellen in den Gonadenanlagen, das Rückenmark einschließlich der Spinalganglien und Spinalnerven, die Podozyten des Mesonephros sowie das Epithel von Darm, Lungenknospen und Gallenblase positiv. Zellanhäufungen an der dorsalen Aortenwand sowie Blutzellen im Leberparenchym stellten sich ebenso c-kit-positiv dar (Kritzenberger & Wrobel, 2004).

### **5.3 Rhodamin 123, Hoechst 33342 und die ABC-Transporter-Familie**

Werden lebende Blutzellen in bestimmten fluoreszierenden Farbstoffen inkubiert, nehmen sie diese Farbstoffe auf und fluoreszieren selbst. Hämatopoietische Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen fluoreszierende Vitalfarbstoffe aus ihrem Zytoplasma auszuschleusen, korrelieren funktionell mit „repopulating“ HSC (Leemhuis et al., 1996).

Die beiden meistverwendeten Farbstoffe sind Rhodamin 123 und Hoechst 33342. Nach Inkubation mit Rhodamin und Hoechst können die Blutzellen in nicht bis stark fluoreszierend eingeteilt werden (negativ, low/dull, positiv/bright).

#### **5.3.1 Rhodamin 123**

Rhodamin 123 akkumuliert in Mitochondrienmembranen abhängig von der metabolischen Aktivität der entsprechenden Zelle. In ruhenden Zellen häuft sich wenig, in aktiven viel Rhodamin an (Johnson et al., 1981). Früher wurde angenommen, dass die Stärke der Fluoreszenz in HSC ausschließlich auf den Aktivitätszustand der Mitochondrien zurückzuführen sei (Spangrude & Johnson, 1990). Es konnte aber gezeigt werden, dass reduzierte Fluoreszenz mit erhöhter Expression eines energieabhängigen transmembranösen Efflux-Pumpen-Proteins einhergeht (Chaudhary & Roninson, 1991), so dass die Zellen den Farbstoff

zwar aufnehmen, ihn aber über das Carrierprotein sofort wieder aktiv ausschleusen. Dieser Carrier, das P-Glycoprotein (P-gp), wird durch das MDR-1 Gen (multidrug resistance) kodiert. Das MDR-Gen zählt zu einer Familie von Transporterproteinen, die die ATP-binding cassette-Sequenz beinhalten (ABC-Transporter-Familie) und für eine Vielzahl an verschiedenen Carriern kodieren, die für den unspezifische Efflux verschiedenster Stoffe in vielen Geweben (Niere, Leber, Darm, Pankreas, Gehirn, Plazenta, Hoden, Ovar) verantwortlich sind. Neben den o.g. Farbstoffen werden auch viele Chemotherapeutika, andere zytotoxische Substanzen sowie Stoffwechselprodukte über diese Carrier aus den Zellen gepumpt. Die Pumpen können durch spezifische Hemmer, wie z.B. Verapamil oder Reserpin blockiert werden (Litman et al., 2001).

Das MDR-1-Gen konnte in CD34<sup>+</sup>, myeloiden und lymphoiden Vorläufern nachgewiesen werden (Drach et al., 1992). Auch in einer Vielzahl von nicht hämatopoietischen Geweben kommt MDR-1 vor (Cordon-Cardo et al., 1990). Die geringe Anfärbarkeit der HSC lässt sich folglich nicht nur durch ihren mitotisch inaktiven Zustand, sondern auch durch den vermehrten, aktiven und energieabhängigen Efflux der Farbstoffe über P-gp erklären (Goodell et al., 1996; Bradford et al., 1997). Rho<sup>low</sup> Blutzellen exprimieren also mehr P-gp als stark fluoreszierende Zellen.

Rho<sup>low</sup> besitzen im Vergleich zu Rho<sup>high</sup> Subpopulationen ein deutlich höheres Proliferationspotential, bilden mehr späte Milzkolonien (CFU-S d13) und sind ausschließlich in der Lage in Serientransplantationen Blutzellen zu bilden (Spangrude et al., 1990). In vivo rekonstituieren ausschließlich Rho<sup>low</sup> Zellen bestrahlte SCID-Mäuse im Langzeittransplantationsversuch (Zijlmans et al., 1995; Uchida et al., 1996).

Durch retroviralen Gentransfer von zusätzlichen MDR-Sequenzen in Knochenmark-HSC kommt es zu einer Überexpression von P-gp. Diese führt zu einer starken Expansion der Stammzellen in vivo und in vitro. Allerdings traten in vivo nach Transplantation in einigen Mäusen myeloproliferative Erkrankungen auf (Bunting et al., 1998). Die transduzierten Zellen zeigen zusätzlich erhöhte „repopulating activity“ und erhöhte Klonanzahl im seriellen Transplantationsversuch, wobei dieses auf erhöhte Selbsterneuerungsrate hinweist (Bunting et al., 2000). HSC mit defektem MDR-1 Gen zeigen keinerlei Expansion und „repopulating activity“ (Bunting et al., 2000).

Es bestehen Unterschiede in Verhalten von HSC aus verschiedenen Quellen gegenüber Rhodamin 123. Im fetalen Knochenmark liegen 15%, im adulten Knochenmark 42% und im mit Chemotherapeutika mobilisiertem Blut 79% der Stammzellen in der Rho<sup>low/med</sup> Fraktion (Uchida et al., 1996).

### 5.3.2 Hoechst 33342 und die „Side Population“

Der Vitalfarbstoff Hoechst 33342 bindet an die DNA lebender Zellen und spiegelt so ihren Zellzyklus-Status wider (Leemhuis et al., 1996). Hoechst 33342 wird aber auch, wie Rhodamin, über Transporter aus den Zellen ausgeschleust.

Durch Inkubation von Stammzellen mit Hoechst 33324 lässt sich die Stammzellpopulation in funktionell unterschiedliche Subpopulationen unterteilen. Die Hoe<sup>low</sup> Zellen werden als „Side Population“ (SP) bezeichnet, da sie sich in der Durchflußzytometrie im roten und blauen Wellenlängenbereich von Hoechst 33342 als Randgruppe darstellen („Side Population“) (Goodell et al., 1996). Im Gegensatz zu Rhodamin kann Hoechst 33342 alleine zur Charakterisierung von HSC eingesetzt werden (Goodell et al., 1996).

Den phenotypisch charakterisierten SP-Blutzellen entsprechen Carrier-exprimierenden HSC. Eine Blockade des Transporters durch Verapamil führt zu einem völligen Verlust der SP-Zellen. Anfangs wurde ausschließlich das P-gp für den Efflux verantwortlich gemacht (Goodell et al., 1997; Bunting et al., 2000). Neuere Untersuchungen beweisen, dass ein weiterer ABC-Transporter speziell den Efflux von Hoechst 33342 gewährleistet. In MDR-1-knock-out Mäusen kommt es weiterhin zu einem Abtransport von Hoechst 33342 aus den Zellen, der durch spezifische Hemmung des Transporters ABCG2, auch ABCP (ABC-Transporter Placenta) oder Bcrp1 (breast cancer resistant protein-1) genannt, blockiert werden kann. Hohe Expression von ABCG2 kommt in CD34<sup>-</sup> HSC und in den SP-Zellen vor (Scharenberg et al., 2000; Zhou et al., 2001; Kim et al., 2002). ABCG2 gehört, wie auch MDR-1, zur Familie der ABC-Transporter.

HSC sind auch hier in der nicht bzw. schwach fluoreszierenden Population (Hoe<sup>low</sup>), der „Side Population“ angereichert. Hoe<sup>low</sup> Zellen besitzen ein höheres Potential in vitro-Kolonien und Milzkolonien zu bilden und beinhalten die Mehrzahl an LTC-IC (Goodell et al., 1996; Leemhuis et al., 1996). Mit Reifung der Stammzellen nimmt die Expression von ABCG2 stark ab, so dass reife Zellen negativ sind (Goodell et al., 1997; Zhou et al., 2001). Der SP-Phenotyp ist nicht nur auf HSC beschränkt, sondern ist auch charakteristisch für Stammzellen aus anderen Geweben (Zhou et al., 2001).

HSC aus den verschiedenen Stammzellkompartimenten unterscheiden sich in ihrem Gehalt an SP-Zellen. Am höchsten ist ihr Gehalt im humanen Nabelschnurblut mit 0,1% der MNC. Im Knochenmark des Menschen beträgt der Wert 0,05% (Goodell et al., 1997; Storms et al., 2000). Die SP-Zellen im Nabelschnurblut lassen sich in CD34<sup>+</sup> (12%) und CD34<sup>-</sup> (88%) Subpopulationen unterteilen. Im UCB sind die LTC-IC-Zellen in der CD34<sup>+</sup> SP-Fraktion angereichert. Diese Population besitzt myeloid-erythroides Potential. Die CD34<sup>-</sup> Zellen



beinhalten eine Vielzahl an T- und NK-Zellen, sind also lymphoid determiniert (Goodell et al., 1997; Storms et al., 2000). SP-Zellen wurden bis jetzt bei Mensch, Maus, Rhesusaffe und Minipig nachgewiesen (Goodell et al., 1997). Über das Vorkommen dieser Population beim Rind und das Verhalten von bovinen HSC gegenüber Rhodamin 123 und Hoechst 33342 ist nichts bekannt.

### 5.3.3 Funktion von Rhodamin 123 und Hoechst 33342

Die Funktion der beiden o.g. Transporterproteine ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Verschiedene protektive und regulierende Aufgaben wurden beschrieben.

HSC, die hohe Spiegel an P-gp exprimieren, sind resistent gegenüber Apoptose-induzierenden Signalen des Caspase abhängigen Zelltods. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, vermutet wird aber der Efflux verschiedener wichtiger Mediatoren (Johnstone et al., 1999).

Des Weiteren könnten die Transporter eine Akkumulation von zytotoxischen Stoffwechselprodukten und exogener Zellgifte in HSC verringern oder verhindern, und so die HSC vor dem Zelltod oder Beschädigung, Mutation schützen (Cooper et al., 1999). Bekannt ist, dass P-gp eine Resistenz gegenüber Anthracyclinen (Daunorubizin, Doxorubizin), Vinca-Alkaloiden, Tubulin polymerisierende Substanzen (Colchizin), gewisse Protease Inhibitoren und Fluorophore (Rho, Hoe) vermittelt (Litman et al., 2001). Eine regulierende Funktion könnte über den Efflux von differenzierungs- oder proliferationsinduzierenden Molekülen ausgeübt werden (Zhou et al., 2001, Bunting et al., 1998).

## **6 Morphologie der HSC und Blutzellen aus dem Nabelschnurblut**

Obwohl sehr viel über Phänotyp, Biologie und funktionelle Physiologie der HSC bekannt ist, gibt es nur wenige Veröffentlichungen zum lichtmikroskopischen Aussehen und zur Ultrastruktur dieser Zellen.

### **6.1 Morphologie der HSC**

#### 6.1.1 Lichtmikroskopie

HSC wurden morphologisch bei Nagern, Primaten und beim Menschen untersucht, wobei sie bei allen Spezies gleiche Charakteristika besitzen (van Bekkum et al., 1971; Dicke et al.,

1973; van Bekkum et al., 1979; Visser et al., 1984; Wickenhäuser et al., 1995; Thiele et al., 1995).

Lichtmikroskopisch werden sie als mononukleäre Zellen beschrieben, die den Lymphozyten ähneln (van Bekkum et al., 1971; van Bekkum et al., 1979). Der runde bis nierenförmige Kern besitzt lockeres homogenes Chromatin und bis zu drei deutliche Nukleoli. Er färbt sich bei der Pappenheimfärbung hell-lila. Um den Kern befindet sich ein schmaler bläulicher Zytoplasmasaum ohne Granula und Vakuolen (Dicke et al., 1973; Wickenhäuser et al., 1995, Thiele et al., 1995). Die Größe der HSC beträgt im Ausstrich und im Zytozentrifugen-Präparat ca. 10  $\mu\text{m}$  (9,9  $\mu\text{m}$  und 10,3  $\mu\text{m}$ ). In Paraffinschnitten messen  $\text{CD34}^+$  HSC hingegen durchschnittlich nur 5,9  $\mu\text{m}$  (Thiele et al., 1995).

### 6.1.2 Ultrastruktur der Hämatopoietischen Stammzellen

Ultrastrukturell zeigen  $\text{CD34}^+$  und Rho/Hoe<sup>dull</sup> HSC des Menschen übereinstimmende morphologische Charakteristika. Die HSC sind runde bis leicht längliche Zellen und besitzen an ihrer Oberfläche manchmal kleine dünne Zytoplasmafortsätze. Sie zeichnen sich durch ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis aus. Die Größe der HSC beträgt, gemessen im Elektronenmikroskop 7-10  $\mu\text{m}$ . Der runde bis ovoide Kern besitzt leichte bis tiefe Einziehungen und besteht hauptsächlich aus Euchromatin, das regelmäßig verteilt ist. Heterochromatin ordnet sich nur als schmaler Saum unter der Kernmembran an. Im Kern sind ein bis mehrere deutliche, dichte Nukleoli zu sehen. Der schmale Zytoplasmasaum ist organellenarm, wobei regelmäßig einige mittelgroße Mitochondrien und ein dezenter Golgi-Apparat sowie Zentriolen vorkommen. Entsprechend dem unreifen Charakter dieser Zellen besitzen sie reichlich freie Ribosomen. Selten sind ER, Vakuolen oder lysosomale Vesikel zu sehen (Deliliers et al., 2001, Servida et al., Thiele et al., 1995, Radley et al., 1999).

Die HSC der Nager weisen eine identische Ultrastruktur auf (van Bekkum et al., 1971; Dicke et al., 1973; van Bekkum et al., 1979; Visser et al., 1984).

Abhängig von der Herkunft unterscheiden sich die einzelnen  $\text{CD34}^+$  humanen HSC geringfügig. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis der HSC aus dem Knochenmark beträgt ungefähr eins, im peripheren Blut und im Nabelschnurblut hingegen ist es größer als eins. Im Knochenmark befinden sich unter den  $\text{CD34}^+$  Zellen oft myeloide Zellen, die auf Grund von kleinen Myeloperoxidase-positiven Granula identifiziert werden können (BM 24%, PB 1,4 %, UCB 4,2-7,9%). Insgesamt ist die Ultrastruktur der  $\text{CD34}^+$  HSC aus dem Knochenmark heterogener, als die aus dem peripheren Blut oder aus dem Nabelschnurblut. Die HSC des Nabelschnurblutes verhalten sich sehr homogen und besitzen durchwegs das oben

beschriebene, für HSC-charakteristische Aussehen, da sich kaum myeloide Zellen in der CD34<sup>+</sup> Population befinden (Deliliers et al., 2001). Zusätzlich zu den primitiven Stammzellen kommen im Nabelschnurblut alle Stadien der Blutzellreifung vor (Mikami et al., 2002).

## 6.2 Morphologie und Kinetik der Blutzellen beim bovinen Fetus

Über die Morphologie der einzelnen Blutzellen und ihrer Entwicklungsstufen gibt es bei den verschiedenen Spezies eine Vielzahl an Veröffentlichungen (Bessis, 1963; Tanaka & Goodman, 1973; Jain, 1993; Feldman et al., 2002).

Die folgende morphologische Beschreibung beschränkt sich weitgehend auf die Blutzellen des Rindes und der kleinen Wiederkäuer. Hierbei beschreiben die meisten Autoren die Blutzellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut (Wilde, 1964; Kraft, 1965; Winqvist, 1965; Hubbert & Hollen, 1971; Frerking, 1975; Schalm, 1977; Jain, 1993; Kramer, 2000).

Angaben über die Größe der einzelnen Blutzellen beim Rind befinden sich in Tabelle 2. Die Ausführungen beziehen sich auf May-Grünwald-Giemsa oder Giemsa gefärbte Ausstriche. Abbildung 1 stellt die einzelnen Stadien der Hämatopoiese in einer Übersicht dar.

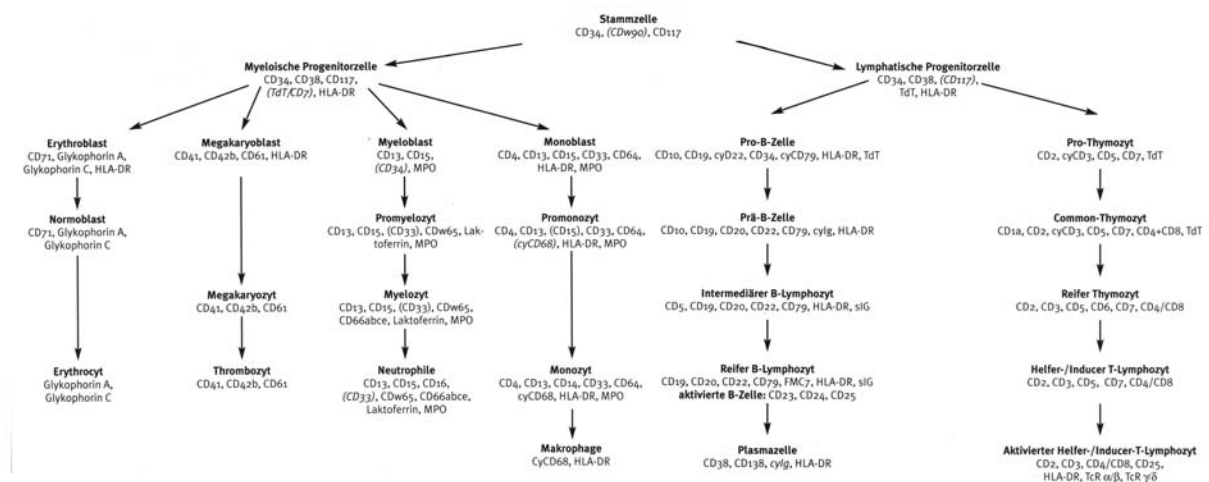


Abb. 1: Übersicht über die einzelnen Stadien der Hämatopoiese (modifiziert nach Heckner & Freund, 2001)

### 6.2.1 Erythropoiese

Die einzelnen Stadien der Erythrozytenentwicklung verlaufen, beginnend beim Proerythroblast, über den basophilen Erythroblast, polychromatischen Erythroblast, orthochromatischen Erythroblast, bis hin zum kernlosen Retikulozyt und reifen Erythrozyt. Die ersten vier Entwicklungsstadien der Erythrozyten weisen alle runde Kerne auf. Die Kondensation des Kerns steigt mit Reifung an, wodurch der Kern kleiner wird. Das Chromatin der frühen Stadien stellt sich noch feinkörnig dar, verklumpt dann aber zunehmend. In orthochromatischen Erythroblasten wird der Zellkern zunehmend pyknotisch. Im Kern des Proerythroblasten befinden sich noch ein bis zwei Nukleoli, die in den darauf folgenden Stadien fehlen.

Die Zellen aller Entwicklungsstadien sind rund, wobei die Zellgröße, ebenso wie die Kerngröße mit der Reifung abnehmen. Das Zytoplasma bildet einen, dem jeweiligen Entwicklungsstadium entsprechenden, mehr oder minder breiten Saum um den Kern. Im Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten färbt es sich auf Grund des hohen Ribosomengehalts blau, wird aber im polychromatischen Erythroblasten grau bis rosa-grau. Die Farbänderung ist bedingt durch die zunehmende Einlagerung von Hämoglobin und die Abnahme der Ribosomen (Bessis, 1973; Jain, 1993). Das Zytoplasma des orthochromatischen Erythroblasten ist im Lichtmikroskop kaum mehr erkennbar. Die Kernausschleusung (Expulsion) erfolgt im Stadium des orthochromatischen Erythroblasten (Wilde, 1964; Schalm, 1977).

Die kernlosen Retikulozyten sind größer als die reifen Erythrozyten, wobei das Zytoplasma leicht bläulich ist. In der Brillantkresylfärbung sind im Zytoplasma der Retikulozyten Organellenreste und aggregierte Ribonukleotide als so genannte Substantia reticulofilamentosa oder granulofilamentosa zuerkennen.

Die reifen Erythrozyten des Rindes sind 5-10 µm groß und blass rosa. Die zentrale Aufhellung bei Erythrozyten anderer Spezies, die der bikonkaven Zellform entspricht, ist beim Rind nur sehr schwach ausgeprägt (Jain, 1993; Kramer, 2000).

### 6.2.2 Kinetik der Erythrozyten

Während der Entwicklung des Rinderfetus kommt es zu einem enormen Anstieg an reifen kernlosen Erythrozyten im peripheren Blut von ungefähr  $3,5 \times 10^6/\text{mm}^3$  (20 cm SSL) auf bis über  $8 \times 10^6/\text{mm}^3$  (88 cm SSL) (Kraft, 1965; Hubbert & Hollen, 1971; Frerking, 1975).

Zwischen einer SSL von 20 bis 40 cm berichten verschiedene Autoren über einen

kurzfristigen Abfall der Erythrozytenzahlen (Kraft, 1965; Winqvist, 1965; Frerking, 1975). Im Gegensatz zu dem steigenden Erythrozytengehalt sinken mit zunehmendem Alter der Feten die Retikulozyten von 9,2% bzw. 11% auf Werte um Null ab (Hubbert & Hollen, 1971).

### 6.2.3 Granulopoiese

Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten besitzen als gemeinsame, morphologisch nicht differenzierbare Vorläuferstufen den Myeloblasten und den Promyelozyten. Die Differenzierung in die drei Granulozytenarten wird erst ab der Entwicklungsstufe des Myelozyten sichtbar, da hier die Einlagerung der spezifischen Granula beginnt. Es folgen die Stadien der Metamyelozyten und der reifen Granulozyten, wobei anhand der Segmentierung des Kerns eine Einteilung der neutrophilen Granulozyten in stabkernige und segmentkernige Granulozyten erfolgt.

Im Laufe der Entwicklung ändert sich die Kernform von rund im Myeloblasten und Promyelozyten über nierenförmig im Myelozyt bis hin zu länglich hufeisenförmig in Metamyelozyten und stabkernigen Granulozyten. In den reifen Granulozyten erhält der Kern sein typisches segmentiertes Aussehen. Die Myeloblasten und Promyelozyten besitzen lockeres feines Chromatin. Im Zellkern sind mehrere deutliche hellblaue Nukleoli vorhanden, die ab dem Stadium des Myelozyten fehlen. Das Chromatin der folgenden Stadien kondensiert zunehmend.

Wie bei der Entwicklung der Erythrozyten, werden die myeloiden Zellen mit zunehmender Reifung kleiner. Eine Ausnahme stellen die Promyelozyten dar, die größer als Myeloblasten sind. Das Zytoplasma beider Zellarten färbt sich blau bis hellblau. In den Promyelozyten kommt es zur Einlagerung von rötlichen, primären Granula (azurophile Granula). Ab dem Myelozyten-Stadium werden die spezifischen sekundären Granula der verschiedenen Granulozytenarten sichtbar. Die spezifischen Granula besitzen ihre typische, namensgebende Färbung, wobei sich die neutrophilen Granula farblos bis leicht rosa, die eosinophilen rötlich-pink und die basophilen bläulich-violett anfärben. In den folgenden Stadien nehmen die spezifischen Granula zu und füllen schließlich die gesamte Zelle aus, so dass das Zytoplasma kaum mehr sichtbar ist. Reife, segmentkernige, neutrophile Granulozyten besitzen meist drei bis sechs, eosinophile und basophile hingegen nur zwei bis drei dunkle, kondensierte Kernsegmente (Bessis, 1964; Wilde, 1964; Schalm, 1977).

Die Promyelozyten ähneln in ihrem Aussehen stark den Proerythroblasten. Der Kern und das Zytoplasma erscheinen aber etwas heller (Jain, 1993).

### 6.2.4 Lymphopoiese

Die Lymphozyten differenzieren sich aus dem Lymphoblasten. Lymphoblasten sind große runde Zellen, mit violett gefärbtem rundem bis leicht eingezogenem Zellkern, der mehrere Nukleoli beinhalten können. Das Zytoplasma färbt sich blau. In den folgenden Entwicklungsstufen verdichtet sich der Kern und wird dunkelviolett. Der Zytoplasmasaum wird schmaler und die Zellen somit kleiner. Im Zytoplasma erscheinen ab und zu kleine feine rötliche Granula (Wilde, 1964; Kramer, 2000). Auf Grund ihrer variierenden Größe (6-15 µm) können Lymphozyten in große, mittlere und kleine Lymphozyten eingeteilt werden. Die Größe korreliert mit dem Alter der Lymphozyten (Kramer, 2000). Beim Rind können auch in den reifen Lymphozyten noch Nukleoli gesehen werden, wobei diese Zellen von einigen Autoren auch als Lymphoblasten bezeichnet werden (Jain, 1993; Kramer, 2000). Die Lymphoblasten sind im Lichtmikroskop nur schwer von den Myeloblasten zu unterscheiden (Kraft, 1965)

### 6.2.5 Monozytopoiese

Reife Monozyten sind 13-19 µm große, rundliche Zellen mit einem bohnen- bis hufeisenförmigen Kern, der retikulär strukturiertes Chromatin besitzt. Das Zytoplasma färbt sich grau-blau und beinhaltet manchmal kleine, rote Granula. Im Zytoplasma der Monozyten können unterschiedlich große Vakuolen auftreten (Jain, 1993). Lichtmikroskopisch lassen sich beim Rind Monozyten und große Lymphozyten nur schwer differenzieren (Wilde, 1964; Kramer, 2000).

Tab. 2: Größe der Blutzellen aus dem bovinen Knochenmark in  $\mu\text{m}$ , modifiziert nach Wilde (1964)

		Größe in $\mu\text{m}$		
		Calhoun (1954)	Winqvist (1954)	Wilde (1964)
früher Erythroblast			12-17	11,7-18,2
später Erythroblast			7-12	10,1-13,9
Normoblast			5-7	5,5-10,9
Myeloblast				15,3-19,6
Promyelozyt		15-22	15-20	15,3-24,0
Myelozyt	neutro. eosino.	10-17	12-17	11,7-18,9
		bis 30	15-18	13,0-23,2
Metamyelozyt	neutro. eosino.		12-13	11,7-18,9
			11-15	12,0-19,6
stabkernige Granulozyten	neutro. eosino.		12-13	10,9-15,8
				10,9-16,0
segmentkernige Granulozyten	neutro. eosino.		10-13	10,1-14,5
			10-12	10,1-14,5
basophile Granulozyten			9-20	7,9-21,3
Lymphozyten	klein mittel groß			6,5-11,7
				9,5-16,0
				13,0-21,3
Plasmazellen				8,7-20,2
Monozyten				13,0-19,9

neutro.: neutrophil, eosino.: eosinophil

### 6.2.6 Thrombopoese

Als Vorläufer der Thrombozyten treten Megakaryozyten auf. Die Reifung der Megakaryozyten kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Hierbei nehmen sowohl die Größe der Zellen und des Zellkerns, als auch die Anzahl der Kerne zu.

Im Stadium I sind die Megakaryozyten 15-50  $\mu\text{m}$  groß und besitzen einen großen runden bis ovalen Zellkern. Das Zytoplasma verhält sich auf Grund vieler Ribosomen stark basophil.

Durch Zunahme des Zytoplasmas und starker Lobulierung des Kerns wächst der Megakaryozyt im Stadium II auf bis zu 75  $\mu\text{m}$  an. Das Zytoplasma färbt sich uneinheitlich blau mit vielen azurophilen Granula. Im Stadium III messen die reifen Megakaryozyten bis zu 150  $\mu\text{m}$  im Durchmesser. Der Kern ist stark lobuliert, wobei schmale Chromatinstränge die einzelnen Segmente verbinden. Mit zunehmender Reifung wird das Zytoplasma eosinophil und eine Vielzahl von azurophilen Granula treten auf. Auffällig ist das gut ausgebildete Netz

von Mikrofilamenten und Mikrotubuli in der Peripherie der reifen Megakaryozyten (Tablin et al., 1990).

Megakaryozyten besitzen mehrere Kerne, die durch eine Vielzahl an Endomitosen entstehen, einzelne Kerne können auch noch über schmale Nukleoplasma-Brücken verbunden bleiben. Aufgrund der Endomitosen besitzen Megakaryozyten auch mehrere Zentriolen und Golgi-Komplexe sowie einen polyploiden Chromosomensatz (Paulus 1970; Leven, 2000). Durch Zerfall und Abschnürung des Zytoplasmas vom Megakaryozyten entstehen die Plättchen (Tablin et al., 1990; Choi et al., 1995, Blood 85, 402). Die reifen Thrombozyten sind kernlose Zellen. Beim Rind besitzen sie eine sehr variable Größe von 0,8-2,5 µm. Das Zytoplasma ist angefüllt mit rötlich-violetten Granula. Riesenformen und Pseudopodien sind charakteristisch für gerade erst entstandene unreife Plättchen (Menard & Meyers, 1988; Kramer, 2000).

### 6.2.7 Kinetik der Leukozyten

Während der fetalen Entwicklung steigt die Gesamtleukozytenzahl von ca. 2000 auf bis zu 11000/mm<sup>2</sup> bei Geburt an (Winqvist, 1965; Frerking, 1975; Kraft, 1965), wobei die Werte trotz steigender Tendenz keinen kontinuierlichen Verlauf erkennen lassen (Hubbert & Hollen, 1971).

Die neutrophilen Granulozyten steigen während der Fetalentwicklung von ca. 9% auf knapp 50 % an (Frerking, 1975). Ein leichterer Anstieg ist bei den eosinophilen Granulozyten und bei Monozyten zu beobachten (eosinophile Granulozyten: von 2,5% auf 3,9%, Monozyten: von 0,9% auf 2,1 %) (Hubbert & Hollen, 1971; Frerking, 1975). Basophile Granulozyten sind im Blut bei SSL < 50 cm nicht nachweisbar und treten auch ab 50 cm SSL nur in einer Häufigkeit von unter 0,5% auf (Kraft, 1965; Frerking, 1975). Insgesamt steigen die Granulozyten stark ab dem 6. Graviditätsmonat an (Kraft, 1965). Im Gegensatz dazu kommt es bei den Lymphozyten zu einem kontinuierlichen Abfall von 80% auf 45% (Kraft, 1965; Frerking, 1975). Hubbert und Hollen (1971) hingegen beschrieben einen Anstieg der Lymphozyten im Blut der Feten im Laufe der Trächtigkeit. Durch den Abfall der Lymphozytenzahlen und den Anstieg der Granulozyten kommt es im 7. Monat zur Umkehr des Lymphozyten/Granulozyten-Verhältnisses. Es befinden sich ab diesem Zeitpunkt mehr Granulozyten als Lymphozyten im fetalen Blut (Kraft, 1965).

Untersuchungen über die Kinetik der unreifen Vorläuferzellen während der Trächtigkeit im Nabelschnurblut zeigten, dass die ersten auftretenden nicht-erythroiden Zellen in den SSL von 5,2 bis 12 cm Megakaryozyten sind (bis zu einem Megakaryozyten pro 500 RBC). In den darauf folgenden Gestationsstadien sind diese Zellen nicht mehr vorhanden. Myeloblasten



und Promyelozyten sind sehr vereinzelt über die gesamte Gravidität zu finden. Eosinophile und neutrophile Myelozyten und Metamyelozyten treten ab der Hälfte der Gravidität vermehrt im Nabelschnurblut auf, fallen ab dem 7. Monat aber wieder ab (Kraft, 1965).

### **6.3 Ultrastruktur der Blutzellen und ihrer Vorläufer**

#### 6.3.1 Erythrozyten und ihre Vorläufer

Über die Ultrastruktur der verschiedenen Reifungsstadien der Erythrozyten beim Rind wurden keine Angaben in der Literatur gefunden. Lediglich die Zellen der primitiven Erythropoese wurden beschrieben (Rüsse et al., 1982). Die einzelnen Stadien der Erythrozytenentwicklung bei den Säugetieren ähneln sich in ihrer Morphologie.

Allgemein nimmt die Größe der erythroiden Zellen sowie die ihres Kerns während der Entwicklung ab. Im Kern kommt es zur starken Kondensation des Chromatins. Das Zytoplasma wird wegen zunehmender Hämoglobineinlagerung elektronendichter. Im Proerythroblasten sind Nukleoli zu finden, die oft an der Kernmembran liegen. Die Nukleoli fehlen in den folgenden Stadien der Erythrozyten-Reifung. Das Zytoplasma beinhaltet zahlreiche ovale Mitochondrien, einen kleinen Golgi-Apparat sowie viele Polyribosomen und Ribosomen. Selten sind Mikrotubuli sichtbar. In den folgenden Stadien wird zunehmend Hämoglobin im Zytoplasma eingelagert, das sich elektronenmikroskopisch als dunkles, amorphes Material zeigt. Die Polyribosomen hingegen nehmen, ebenso wie die Anzahl der Mitochondrien und die Größe des Golgi-Apparates im Laufe der Entwicklung ab. Die Marginalisierung des Zellkerns beginnt bereits im polychromatischen Erythroblasten. Im orthochromatischen Erythroblasten kommt es dann zur Expulsion des Kerns. Nach der Kernausschleusung bleiben in den Retikulozyten noch Organellen, wie Mitochondrien, Ribosomen und selten auch der Golgi-Apparat erhalten. Diese Organellen werden während der weiteren Reifung zum Erythrozyten abgebaut und in Form von Exozytose ausgeschleust. Reife Erythrozyten sind runde, bikonkave Zellen ohne jegliche Organellen. Das Zytoplasma ist angefüllt mit Hämoglobin.

#### 6.3.2 Granulozyten und ihre Vorläufer

Allgemein gilt, dass die Promyelozyten einen runden sehr hellen euchromatinreichen Kern besitzen. Heterochromatin tritt nur entlang der Kernmembran auf. Meist sind Nukleoli

vorhanden. Im Zytoplasma befinden sich nur einige wenige Mitochondrien und rER, das manchmal dilatiert sein kann.

Während der Reifung der Blutzellen kommt es zur Kondensation des Chromatins, wobei das Heterochromatin aggregiert und immer weitere Bereiche des Kerns einbezieht. Die Form des Kerns wird oval bis abgeflacht im Myelozyten, länglich bis bohnenförmig im Metamyelozyten und erhält schließlich seine typische segmentierte Form in den reifen Granulozyten. Das Zytoplasma wird im Laufe der Reifung organellenreicher und ab dem Metamyelozytenstadium entstehen, ausgehend vom Golgi-Apparat, spezifische Granula (Bessis, 1973; Anosa, 1993).

### *6.3.2.1 Neutrophile Granulozyten*

Prinzipiell ähnelt die Ultrastruktur der bovinen neutrophilen Granulozyten denen anderer Tiere und des Menschen (Bessis, 1973; Kramer, 2000). In der Literatur beschränkt sich die Beschreibung der Ultrastruktur der bovinen neutrophilen Granulozyten weitgehend auf die vorkommenden Granulatypen (Gennaro et al., 1983; Baggiolini et al., 1985).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Spezies können beim Rind und den kleinen Wiederkäuern drei verschiedene Typen an Granula differenziert werden.

Die im Lichtmikroskop sich rötlich darstellenden runden azurophilen oder primären Granula sind Peroxidase-negativ und kommen beim Rind in reifen neutrophilen Granulozyten nur sehr spärlich vor. Die spezifischen sekundären Granula sind ungefähr gleich groß (0,15-0,3 µm) wie die primären, allerdings Peroxidase-negativ und stärker elektronendicht. Zusätzlich kommt bei den Wiederkäuern noch eine dritte Granulaart vor. Diese Granula sind größer (0,4-0,5 µm) und etwas heller als die sekundären Granula und überwiegen in ihrer Anzahl.

Während der Entwicklung entstehen zuerst die primären, anschließend die großen tertiären und als letztes die sekundären Granula. Primäre und sekundäre Granula werden vom Golgi-Apparat gebildet. (Baggiolini et al., 1985, Gennaro et al., 1983). Die primären Granula werden besonders zahlreich in Promyelozyten und Myeloblasten gefunden, in geringerer Anzahl kommen sie auch in den folgenden reiferen Stadien vor. Ab dem Stadium des Myelozyten treten die spezifischen Granula auf (Jain, 1993). Biochemisch unterscheiden sich diese drei Granulaarten durch ihren Enzymgehalt (Gennaro et al., 1983).

Die neutrophilen Granulozyten des Schafes sind rund bis oval und tragen zahlreiche zytoplasmatische Fortsätze an ihrer Oberfläche. Der Zellkern besitzt meist zwei bis vier Segmente und besteht zum großen Teil aus Heterochromatin. Im Zytoplasma befinden sich wenige, runde bis ovale 0,3 x 0,7 µm große Mitochondrien vom Cristae-Typ, glattes ER

sowie viele freie Ribosomen und Polyribosomen. Im Bereich der Zellmembran können phagozytotische Vakuolen auftreten (Yamada et al., 1970).

#### 6.3.2.2 *Eosinophile Granulozyten*

Ultrastrukturell ist die erste morphologisch differenzierbare Zelle der eosinophilen Reihe der Promyelozyt. Im Zytoplasma befinden sich große, homogene Granula, die drei- bis sechsmal größer sind als die neutrophilen Granula. Bei der Ziege tritt in den eosinophilen Myelozyten eine zweite Art von kleineren grobkörnigeren Granula auf, die seltener vorkommen als die ersten Granula. Bei Reifung entwickeln diese zunehmend kompakter werdende, kristalloide Strukturen. Die zweite Art umfasst zudem wabenartige und gewundene Granula (Anosa, 1993). Beim Rind bleiben die Granula homogen und bilden keine kristalloiden Innenstrukturen aus (Jain 1993).

#### 6.3.2.3 *Basophile Granulozyten*

Die Granula der basophilen Granulozyten sind größer als die der neutrophilen Granulozyten und besitzen keine kristalloiden Strukturen wie die eosinophilen Granula. Beim Schaf sind sie 0,4-1,0 µm groß. Anhand des Inhaltes können drei verschiedene Granulatypen identifiziert werden (Yamada und Sonoda, 1972). Der Granulainhalt bei der Ziege wird als fein- bis grobkörnig beschrieben (Anosa, 1993). Im Zytoplasma befinden sich außerdem 0,3 x 0,7 µm große Mitochondrien, ein kleiner Golgi-Apparat und wenig rER. Der Kern umfasst meist zwei bis drei Segmente und enthält Eu- und Heterochromatin (Yamada und Sonoda, 1972).

#### 6.3.3 Lymphozyten

Laut Sonoda und Marshak (1970) weichen die Lymphozyten des Rindes in ihrer Ultrastruktur nicht wesentlich von denen des Menschen ab (Jain, 1986).

Sie sind runde bis ovoide Zellen mit einem runden Zellkern, der unterschiedlich tiefe Einziehungen besitzen kann. Das Heterochromatin im Kern ordnet sich an der Kernmembran sowie aggregiert im Nukleoplasma an. Das Zytoplasma bildet einen Saum und beinhaltet mehrere runde (0,3-0,5 µm) bis längliche Mitochondrien, spärliches ER, meist nur einen kleinen Golgi-Apparat sowie einige kleine, elektronendichte membranbegrenzte Granula. Selten besitzen Lymphozyten Nukleoli, die 0,7-1,2 µm groß sind (Sonoda & Marshak, 1970; Beran & Pospisil, 1967).

Selten treten in Lymphozyten gesunder Rinder sog. Kerntaschen („nuclear pockets“) auf, die Einstülpungen der Kernmembran mit daraus resultierender Taschenbildung unter der Kernmembran darstellen (Weber et al., 1969).

### 6.3.4 Monozyten

Im Gegensatz zu den Lymphozyten besitzen die Monozyten eine unregelmäßige Zellkontur. Der Zellkern ist rund bis bohnenförmig, kann aber auch tiefe Einziehungen besitzen. Das Chromatin aggregiert an der Zellmembran. Das Zytoplasma enthält große Mengen an glattem und rER, einen gut ausgebildeten Golgi-Komplex, der viele kleine Vesikel abschnürt und kleine elektronendichte Granula (Sonoda & Marshak, 1970). Die Mitochondrien der Monozyten sind größer als die der Lymphozyten (Anosa, 1993).

### 6.3.5 Megakaryozyten und Thrombozyten

Megakaryozyten sind rundliche Zellen mit zahlreichen vielgestaltigen Zytoplasmafortsätzen und zum Teil tiefen Einziehungen. Im Zytoplasma sind mehrere deutliche Golgi-Komplexe und Zentriolenpaare, viele Mitochondrien, Polyribosomen, Ribosomen, rER und Lysosomen zu finden. Die sog. elektronendichten  $\alpha$ -Granula und die primären Lysosome werden vom Golgi-Apparat gebildet. In den Megakaryozyten des Rindes kommen 250-650 nm große, deutlich membranumgrenzte Vesikeln vor, die einen klaren Inhalt aufweisen und deren Anzahl während der Reifung zunimmt. Diese stellen wahrscheinlich die Vorläufer der „dense bodies“ oder  $\delta$ -Granula dar (Menard & Meyers, 1988). Das sog. offene kanikuläre System (OCS oder „surface connected canicular system“, SCCS) fehlt in den Megakaryozyten der Boviden (Menard & Meyers, 1988).

Mit der Reifung werden in den Megakaryozyten der Haussäugetiere Demarkationsmembranen sichtbar, die zunehmend gruppenartige Ansammlungen von Granula umgrenzen. Entlang dieser Membranen werden die Thrombozyten bei Zerfall des Megakaryozyten abgeschnürt (Jain, 1993).

Die diskoidalen Thrombozyten des Rindes messen durchschnittlich 0,8 bis 2,2  $\mu\text{m}$  (Du Plessis et al., 1996). Meyers et al. hingegen berechnete eine Größenvariation von 1,78  $\mu\text{m}$  bis 6,08  $\mu\text{m}$  (Meyers et al., 1982). Im Zytoplasma der Thrombozyten kommen wie bereits in den Megakaryozyten,  $\alpha$ -Granula und sog. „dense bodies“ oder  $\delta$ -Granula vor. Die membranumgrenzten  $\alpha$ -Granula besitzen einen homogenen, mittel bis stark elektronendichten Inhalt. Beim Rind sind sie größer und elektronendichter als beim Menschen, kommen aber in

geringerer Anzahl vor (5,7 vs 7,2/Thrombozyt). Auch weisen sie eine stark unterschiedliche Größe (0,8-2,2  $\mu\text{m}^2$ ) und Form auf (DuPlessis et al., 1996). Die „dense bodies“ bestehen aus einem kleinen runden stark elektronendichten Kern („core“), der exzentrisch in einer membranumgrenzten elektronendurchlässigen Vakuole liegt. Die „dense bodies“ kommen in geringerem Anzahl (0,8/Thrombozyt) als die  $\alpha$ -Granula vor. Zusätzlich zu diesen beiden Granulatypen werden beim Rind weitere granulaartige Strukturen beschrieben. Selten kommen ca. 1,25  $\mu\text{m}$  große, membranumgrenzte Granula vor, die Mikrotubuli-ähnliche Strukturen beinhalten. Die zweite nicht klassifizierte Granulaart beinhaltet amorphes Material unterschiedlicher Dichte und entspricht in der Größe den „dense bodies“ (Meyers et al., 1982). Diese Strukturen könnten identisch mit Lysosomen oder Peroxisomen sein (Jain, 1993).

Im Zytoplasma befinden sich neben den Granula runde bis ovoide Mitochondrien (0,7/Thrombozyt bis 6,2/ Thrombozyt, Meyers et al., 1982; DuPlessis et al., 1996) und Glykogengranula (>50% der Thrombozyten). ER und Golgi-Apparat fehlen hingegen. Das Zytoskelett der Thrombozyten ist beim Rind komplex aufgebaut. Peripher unter der Zellmembran befinden sich zahlreiche Mikrotubuli (Meyers et al., 1982; Takeuchi et al., 1990; DuPlessis et al., 1996) und 6-9 nm dicke Mikrofilamente. Diese ordnen sich parallel zur Oberfläche in einem unter der Zellmembran gelegenen Ring an. Im Zentrum der Zelle befinden sich ebenfalls Bündel aus Mikrofilamenten. Die Mikrofilamente bestehen aus Aktin, das als peripherer Ring in Phalloidin-gefärbten Präparaten sichtbar ist (Takeuchi et al., 1990). Ein innerer Aktin-haltiger Filamentring, der in Phalloidin behandelten Präparaten zu beobachten ist, kann elektronenmikroskopisch nicht dargestellt werden (Takeuchi et al., 1990). Die Aktin-Filamente sind eng assoziiert mit den Rezeptoren der Zelloberfläche und erfüllen so wichtige Aufgaben während der Thrombozytenaktivierung und -agglutination (Zucker-Franklin, 1965; Hartwig, 1992). Sowohl die Mikrotubuli, als auch die Mikrofilamente sind des Weiteren für die Aufrechterhaltung der Zellform wichtig (Takeuchi et al., 1990).

Ebenso wie den Megakaryozyten fehlt auch den bovinen Thrombozyten das OCS, das typischerweise in den Thrombozyten des Menschen zu sehen ist (Zucker-Franklin et al., 1985). Bei Aktivierung der bovinen Thrombozyten kann es nicht, wie beim Menschen, zu einer Ausschleusung der  $\alpha$ -Granula über das OCS kommen, sondern die Granula fusionieren mit der Zelloberfläche und schütten so den Granulainhalt aus (Grouse et al., 1990). Die Granula richten sich bei Aktivierung nach außen und ordnen sich nicht, wie beim Menschen im Zentrum an. Die oben erwähnten, zentral befindlichen Filamente unterstützen die

Exozytose des Granulainhalts (White, 1987). Des Weiteren bilden die bovinen Plättchen lange dünne Pseudopodien aus, die Mikrotubuli und Filamente beinhalten. Die Mikrotubuli und Filamente im Thrombozyten verlieren bei Aktivierung ihr definierte Anordnung (White, 1987).

Das sog. „dense tubular system“ (DTS) ist in Rinder-Thrombozyten vorhanden (White, 1987).

### **7 Glykohistochemische Eigenschaften der HSC und der Blutzellen**

Lektine sind kohlehydratbindende Proteine nicht immunogener Herkunft und enzymatisch inaktiv (Rüdiger & Gabius, 2001). Seit neuerem werden auch Rezeptoren für Mono- und Disaccharide ausgeschlossen, die als Rezeptoren für Transport und Chemotaxis dienen (Gabius et al., 2002). Lektine kommen vor in Pflanzen, Viren, Bakterien oder in tierischen Geweben. Bis heute konnten eine Vielzahl an Lektinen aus diesen Quellen isoliert werden (Gabius et al., 2002; Loris et al., 2002). Entdeckt wurden die Lektine auf Grund der Fähigkeit des Lektins aus *Ricinus communis*, Erythrozyten zu agglutinieren (Stillmark, 1888). Die Agglutination von Zellen ist möglich, da Lektine mehrere zuckerbindenden Untereinheiten enthalten und daher polyvalent sind (Sharon & Lis, 2004).

Lektine finden Verwendung in der Charakterisierung von Blutgruppen, da sie spezifisch an die verschiedenen Zuckerreste auf der Oberfläche der Erythrozyten binden (Boyd & Regura, 1949; Boyd & Shapleigh, 1954; Khan et al., 2002). Außerdem besitzen bestimmte Lektine (z.B. Con A, PHA-M und PWM) mitogene Eigenschaften, d.h. sie sind in der Lage, lebende Zellen, wie z.B. T- oder B-Lymphozyten zur Proliferation und zur Transformation zu Blastenzellen anzuregen (Ashra & Khan, 2003). Des Weiteren sind sie bei vielen Prozessen der Zellerkennung und -interaktion von entscheidender Bedeutung und dienen außerdem als wichtige Informationsträger (Gabius, 2000; Gabius et al., 2002).

Entsprechend ihrer Zuckerspezifität können sie in Glukose/Mannose-, N-Acetylglukosamin-, N-Acetylgalaktosamin/Galaktose- und L-Fukose-bindende Lektine eingeteilt werden (siehe Tabelle 3).

Tab. 3: Einteilung der Lektine nach ihrer Zuckerspezifität (modifiziert nach Goldstein & Poretz, 1986)

Abk.	Lektin / Ursprung	Zuckerspezifität
<b>Glukose/Mannose Gruppe</b>		
Con A	Concanavalin A / <i>Canavalia ensiformis</i>	$\alpha$ Man > $\alpha$ Glc > GlcNAc
<b>N-Acetylglukosamin Gruppe</b>		
WGA	Wheat germ / <i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc( $\beta$ 2,4 GlcNAc) <sub>1-2</sub> > $\beta$ GlcNAc
<b>N-Acetylgalaktosamin / Galaktose</b>		
SBA	Soybean / <i>Glycine max</i>	$\alpha$ und $\beta$ GalNAc > $\alpha$ und $\beta$ Gal
ECA	<i>Erythrina cristagalli</i> / Korallenpflanze	Gal $\beta$ 1,4 GlcNAc > $\alpha$ GalNAc
PNA	Peanut / <i>Arachis hypogea</i>	Gal $\beta$ 1,3 GlcNAc > $\alpha$ und $\beta$ Gal
GSA I	<i>Griffonia simplicifolia</i> / Griffonia	$\alpha$ -GalNAc > $\alpha$ -Gal
VVA	<i>Vicia villosa</i> / Wicke	D-GalNAc
<b>L-Fucose</b>		
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> / Stechginstersamen	$\alpha$ L-Fuc
LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i> / Lotus	$\alpha$ -Fuc

Bezogen auf das hämatopoietische System sind Glykokonjugate auf der Zelloberfläche von entscheidender Bedeutung bei der Adhäsion von Zellen an andere Zellen und an ihre Umgebung sowie in der Aktivierung und Regulierung des Immunsystems (Ni & Tizard, 1996; Timoshenko et al., 2003). Im Bereich der HSC spielen sie eine große Rolle beim „homing“ bzw. bei der Aktivierung und dem Übertritt von HSC aus den hämatopoietischen Organen ins periphere Blut (Shimizu & Shaw, 1993). Zudem sind sie in der Tumorforschung von großem Interesse, da sich bei verschiedenen Leukämieformen das Glykoproteinmuster auf der Oberfläche von Blutzellen ändert, so dass Lektine zur Diagnose verschiedener leukämischer Erkrankungen herangezogen werden können (Koch et al., 1983; Gabius & Gabius, 1993; Gabius, 1997).

In der Literatur existieren einige Angaben zum glykohistochemischen Verhalten der humanen CD34<sup>+</sup> HSC. Über die Lektinbindungsstellen der HSC bei den Haussäugetieren und insbesondere beim Rind gibt es keine Angaben. Bei den Wiederkäuern ist vor allem das Verhalten von B- und T-Lymphozyten gegenüber verschiedenen Lektinen untersucht worden (Pearson et al., 1979; Johanson et al., 1983; Djilali et al., 1987; Haig et al., 1990).

WGA wurde zu Beginn der HSC-Forschung zur Aufreinigung muriner HSC verwendet (Visser et al., 1994). Beim Menschen allerdings reagiert WGA sowohl mit CD34<sup>+</sup> als auch CD34<sup>-</sup> Zellen sowie mit reifen Leukozyten (Zinsmeister & Ackerman, 1983; Craig et al., 1992; Thiele et al., 1995). Ebenso bindet SBA an humane CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup> HSC. SBA wird des Weiteren zur Aufbereitung von Knochenmarkstransplantaten verwendet. Um die Abstoßungsgefahr bei Stammzelltransplantation aus dem Knochenmark möglichst gering zu halten, wird die T-Zell-aufgereinigte SBA<sup>-</sup> Subpopulation verwendet, da SBA<sup>+</sup> Knochenmarkszellen sich zum großen Teil aus GvHD (Graft versus Host Disease)-

induzierenden T-Zellen zusammensetzen (Lebkowski et al., 1992). Über die Reaktion von UEA mit CD34<sup>+</sup> HSC gibt es unterschiedliche Angaben, da sowohl eine Bindung als auch das Fehlen dieser bei Inkubation mit CD34<sup>+</sup> HSC beschrieben wurde (Thiele et al., 1995; Craig et al., 1992). Eine schwache bzw. mittlere Reaktion von CD34<sup>+</sup> HSC wird bei Verwendung von PNA und LPA erreicht (Craig et al., 1992; Thiele et al., 1995). LEA scheint HSC stark und selektiv zu markieren (Craig et al., 1992; Thiele et al., 1995). Im humanen Knochenmark reagieren die Lektine BSL1, BSL2, SJA, DBA und VVA nicht mit CD34<sup>+</sup> HSC und ECA nur mit CD34<sup>-</sup> HSC (Craig et al., 1992). In ultrastrukturellen Untersuchungen des Lektinbindungsverhaltens hämatopoietischer Stammzellen reagiert Con A deutlich mit der Kernmembran, leicht mit der Zellmembran und moderat mit der Zytoplasmamatrix. WGA hingegen färbt deutlich das Plasmalemm. Eine schwache diffuse Reaktion zeigte sich mit den Lektinen UEA-I im Zyto- und Nukleoplasma. SBA, PNA und ECA binden nur sehr schwach an die Zytoplasmamembran (Kümmel et al., 1997). Einige Lektine (u.a. Con A, PNA und ECA) färben alle Blutzellen im peripheren Blut des Menschen mehr oder minder gut (Craig et al., 1992). Beim Schaf binden insbesondere Con A und WGA an fast alle Blutzellen aus dem Knochenmark. Die ovinen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten reagieren mit sehr vielen Lektinen (Haig et al., 1990). Im Rind bindet die Mehrheit der Lymphozyten Con A, wohingegen keine Reaktion mit UEA zu beobachten ist. PNA reagiert im peripheren Blut v.a. mit bovinen T-Lymphozyten. Nur ein geringer Anteil (2%) der PNA<sup>+</sup> Zellen tragen B-Zell-Marker (Pearson et al., 1979; Johanson et al., 1983; Djilali et al., 1987). Auch SBA und WGA binden an Lymphozyten, wobei für diese Lektine keine B- oder T-Zell-Spezifität nachgewiesen wurde (Pearson et al., 1979; Djilali et al., 1987).

Ultrastrukturell kann die Lokalisation der Lektinbindungsstellen genauer beschrieben werden (Kümmel et al., 1996). In ultrastrukturellen lektin histochemischen Untersuchung von peripheren humanen Blutzellen zeigen neutrophile Granulozyten eine starke Reaktion der Zytoplasmamembran mit WGA und eine schwache fokale mit Con A, BPA und ECA. Das Zytoplasma selbst reagiert schwach mit WGA, Con A und ECA. Die Lektine WGA, Con A, UEA-I, BPA, ECA, SBA und PNA binden spezifisch an die zwei verschiedenen Granulaarten. In unreifen Granulozytenvorläufern fällt die Reaktion mit den Granula unspezifisch aus. Die Zytoplasmamembran der eosinophilen Granulozyten zeigt eine starke Reaktion mit WGA, und eine schwache ungleichmäßige mit Con A, BPA und PNA. Die Granula reagieren unabhängig von ihrer Art stark mit WGA und Con A und schwach mit UEA-I, SBA, ECA und PNA. Die Zytoplasmamatrix zeigt eine schwache, diffuse Reaktion mit WGA, Con A, UEA-I, ECA und PNA. In Erythroblasten kommt es nur an der



Zellmembran zu einer Bindung von Lektinen, wobei UEA-I stark und WGA, ECA und Con A leicht reagieren. Con A zeigt zusätzlich eine diffuse Verteilung im Zellkern. WGA und Con A binden stark, UEA-I schwach an die Zytoplasma- und Demarkationsmembranen in Megakaryozyten. Die Granula der Megakaryozyten reagieren nicht („dense bodies“) oder nur schwach ( $\alpha$ -Granula) mit Con A und WGA. Con A bindet bei allen aufgeführten Blutzellen an die Kernmembran (Kümmel et al., 1997).

### III Material und Methoden

#### 1 Untersuchungsmaterial

Untersucht wurde das Nabelschnurblut von 35 Feten bzw. neugeborenen Kälbern. Es wurde sowohl Nabelschnurblut beim Rind unmittelbar nach Geburt, als auch von Feten aus dem Schlachthof entnommen. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Proben.

Das Alter der Feten wurde durch Messung der Scheitel-Steiß-Länge (SSL) bestimmt (nach Rüsse und Sinowatz, 1998).

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Proben aus dem Nabelschnurblut

SSL in cm	Alter in Tagen	Geschlecht	SSL in cm	Alter in Tagen	Geschlecht
8,5	65	w	42	160	m
10	75	m	51	170 – 180	w
10		w	53		m
13	80	w	53		w
15	90	m	73	200 – 230	m
18	95	m	89	250 – 280	m
18		m	94	280 – 290	w
19		m	Geburt	---	w, tot
20,5	100 – 110	m	Geburt	---	w
21		w	Geburt	---	n. b., ZW
21		w	Geburt	---	n. b.
23		w, ZW	Geburt	---	n. b.
28,5	120	n. b.	Geburt	---	m
31	130 – 140	m	Geburt	---	w
33		w	Geburt	---	m
35		w	Geburt	---	m
42	160	w	Geburt	---	w

m: männlich, w: weiblich, n.b.: nicht bestimmt, ZW: Zwillinge

#### 2 Probennahme und Aufarbeitung

Die Zusammensetzungen aller verwendeten Lösungen und Reagenzien befinden sich im Anhang.

##### 2.1 Probennahme

Die Proben von neugeborenen Kälbern wurden in der gynäkologischen Tierklinik der LMU oder von einem praktizierenden Tierarzt entnommen. Unmittelbar nach der Geburt wurde Blut aus dem intrauterin verbleibenden Teil der Nabelgefäße entnommen. Hierbei konnte vaginal immer nur die Vene erreicht werden.

Die Probennahme bei den Feten erfolgte am Schlachthof München. Das Nabelschnurblut der Feten wurde nach Eröffnung des Uterus und der Eihäute gewonnen.

Sowohl bei der Probennahme postnatal, als auch bei den Feten wurden die Gefäße mit einer Klemme abgeklemmt. Da es bei Aspiration des Blutes mit einer Spritze immer wieder zur Kollabierung des Gefäßes kam, wurden im Folgenden die Gefäße mit einer Schere angeschnitten und das Blut in einem Kalium-EDTA-Röhrchen (1,6 mg EDTA/ml Blut, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) aufgefangen. Je nach Größe des Fetus konnten 2-25 ml Blut gewonnen werden.

Die Proben wurden innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme weiterverarbeitet und bis dahin gekühlt aufbewahrt.

## **2.2 Leukozytenzählung**

Die Anzahl der Leukozyten/ $\mu$ l Blut wurde möglichst bald nach Gewinnung der Proben bestimmt. Hierzu wurde dem Blut 3%ige Essigsäure (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) im Verhältnis 1:20 zugesetzt und gut vermischt. Anschließend wurde eine Neubauer-Kammer mit dieser Probe beschickt. Entsprechend des Volumens der Kammer wurde die Leukozytenanzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{gezählte Leukozyten} / \text{ausgezählter Bereich} \times \text{Kammertiefe} \times \text{Verd.} = \text{Leukozyten}/\mu\text{l Blut}$$

$$\text{gezählte Leukozyten} \times 50 = \text{Leukozyten}/\mu\text{l Blut}$$

Verd.: Verdünnung

ausgezählter Bereich:  $4 \times 1 \text{ mm}^2$

Kammertiefe: 0,1 mm

Verdünnung: 1:20

## **2.3 Aufarbeitung der Blutproben für die Lichtmikroskopie**

Von jeder Probe wurden native Blutausrüche auf entfetteten nicht beschichteten SuperFrost<sup>®</sup>-Objektträgern mit Hilfe eines weiteren Objektträger angefertigt. Zur Lyse der Erythrozyten wurden je nach Ausgangsmenge des Blutes 2-5 ml im Verhältnis 1:3 mit einem Ammoniumchlorid-Lysispuffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Proben 10 min bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Der klare rötliche Überstand wurde abgekippt und der entstandene Bodensatz in 10 ml PBS pH 7,4 resuspendiert und 10 min bei  $180 \times g$  zentrifugiert. Anschließend folgte ein 2. Waschgang. Zum Schluss wurde der Bodensatz in ca.

1/10 der Ausgangsmenge in PBS pH 7,4 gelöst und auf SuperFrost<sup>®</sup>-Objektträgern ausgestrichen.

Um eine Anreicherungen der mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Vorläuferzelle) zu erhalten wurde das Blut über einem Dichtegradienten mit Ficoll<sup>®</sup> (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) zentrifugiert. Hierzu wurden 2 ml Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS-Puffer verdünnt und vorsichtig auf 3 ml Ficoll<sup>®</sup> geschichtet. Anschließend wurde 30 min bei 700 x g (fetale Proben) oder 30 min bei 400 x g (Proben der neugeborenen Kälber) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde vorsichtig der über dem Dichtegradienten entstandene hellweiße Zellsaum abpipettiert und in 8 ml PBS pH 7,4 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Der 2. Waschgang wurde mit 400 x g durchgeführt. Wenn nach dem ersten Waschgang im Bodensatz eine starke Rotfärbung auftrat (Erythrozyten), wurde die Probe wie oben beschrieben mit dem Ammoniumchlorid-Lysispuffer behandelt.

Anschließend wurde die Zellsuspension ausgestrichen. Alle Ausstrichpräparate wurden für 12 Stunden luftgetrocknet und anschließend in Aluminiumfolie verpackt und bei -20°C aufbewahrt (Farmilo & Stead, 2003).

Zur Weiterverwendung wurden die Ausstriche in Aluminiumfolie aufgetaut und entsprechend dem jeweiligen Färbeprotokoll fixiert.

#### 2.4 Aufarbeitung der Blutproben für die Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden Blutproben verschiedener SSL entsprechend der Tabelle 5 verwendet. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben auf Eis gelagert. Je nach Ausgangsmenge wurden 2-10 ml des EDTA-Blutes zur Fixierung für die Elektronenmikroskopie verwendet.

Tab. 5: Proben für die Elektronenmikroskopie

SSL in cm	Alter in Tagen	Art der Probe
3,4	ca. 40	Blut in den Gefäßen der Wharton Sulze
21	100-110	Nabelschnurblut
42	ca. 160	Nabelschnurblut
53	170-180	Nabelschnurblut
89	250-280	Nabelschnurblut
Geburt	- - -	4 Proben aus dem Nabelschnurblut

Die Proben wurden für 15 min bei 700 x g zentrifugiert. Der entstandene Plasmaüberstand wurde bis auf 2 mm abpipettiert, ohne den Leukozytensaum zu zerstören. Anschließend

wurde vorsichtig das gleiche Volumen an frisch angesetzter Karnovsky Gebrauchslösung (Karnovsky, 1975) auf den Leukozytensaum pipettiert. Anfangs wurde 2,5% Glutaraldehyd als Fixans verwendet.

Die überschichteten Proben wurden 1h im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Der Leukozytensaum und die angrenzende Erythrozytenschicht verfestigten sich und das so entstandene ca. 2 mm dicke Zellpellet wurde zur Entfernung des anhaftenden flüssigen Blutes in 0,1 M Cacodylat-Puffer gespült. Das Pellet wurde nochmals über Nacht bei 4°C in Karnovsky gegeben (Watanabe, 1967). Am nächsten Tag wurde das Pellet in 1 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten und in 0,1 M Cacodylat-Puffer dreimal gewaschen.

Anfangs wurde die Fixierungslösung über Nacht, bei 4°C auf der Probe belassen. Der Leukozytensaum und das darunter liegende Blut gelierten ca. 5 bis 6 mm tief (Anderson, 1965). Der überflüssige Saum an Erythrozyten musste dann beim Zuschneiden der Probe mit Mikrotomklingen entfernt werden.

Die Proben wurden 2 h bei 4°C im Dunklen in einer Lösung aus Osmiumtetroxid (1%ig) und Kaliumferrocyanid (1,5%ig) kontrastiert und anschließend dreimal 20 min in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen.

Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90% je 30 min, abs. Ethanol drei mal 30 min) und die schrittweise Einbettung in Epon (2 x 15 min Propylenoxid, 1 h Propylen-Epon-Gemisch 2:1, über Nacht Propylen-Epon-Gemisch 1:1, 30 min reines Epon). In Gelatine kapseln (Plannet, Wetzlar) eingebettet wurden die Blöcke schließlich bei 60°C über 24 h polymerisiert.

Zur Übersicht wurden am Ultramikrotom Ultracut E (Reichert-Jung, Wien) 1 µm dicke Semidünn-Schnitte angefertigt und mit Methylen-Blau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) gefärbt. Mit Hilfe dieser Semidünn-Schnitte wurden die einzelnen Blöcke auf Leukozyten-Anzahl und Morphologie hin untersucht. Waren ausreichend gut erhaltene weiße Blutzellen vorhanden, wurden die Blöcke ultradünn geschnitten (60 nm), auf Kupfer-Grids (SSI, Science Services, München) aufgezogen und in 2%igem Uranylacetat (5 min) und der Bleizitrat-Lösung nach Reynolds (Reynolds, 1962) nachkontrastiert.

### **3 Lichtmikroskopie**

#### **3.1 Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen**

Zur Übersicht wurde von allen Blutausrichen eine Schnellfärbung angefertigt. Hierbei wurden die Ausstriche in Methanol fixiert, mit Eosin (1,25 g/l) und Azur- und Methylenblau

(1,5 g/l) gefärbt. Nach dem letzten Färbeschritt wurden die Ausstriche mit Aqua dest. abgespült und anschließend luftgetrocknet. Um sie länger haltbar zu machen wurden sie nach sechs- bis achtstündigem Trocknen kurz in Xylol getaucht und mit Eukitt (Fluka, Buchs, Schweiz) eingedeckelt.

Die Giemsa- und Pappenheimfärbung wurden entsprechend dem Protokoll nach Romeis (1989) ausgeführt.

#### Giemsa

Die luftgetrockneten Ausstriche wurden 90 sec in Methanol-Aceton (1:1) fixiert und anschließend 30 min mit Giemsa-Gebrauchslösung überschichtet. Nach Abkippen der Giemsa-Lösung wurden die Ausstriche mit Aqua dest. pH 7,0 abgespült und luftgetrocknet.

#### Pappenheim

Die unfixierten luftgetrockneten Ausstriche wurden zuerst für 3 min mit May-Grünwaldlösung und nach Abkippen 20 min sofort mit Giemsa-Lösung überschichtet. Anschließend wurde die Färbelösung abgekippt, die Objektträger mit Aqua dest. pH 7,0 abgespült und luftgetrocknet.

### **3.2 Immunhistochemische Färbungen**

Für die Immunhistochemie wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Antikörper verwendet. Nach dem Auftauen in der Aluminiumfolie wurden die Ausstriche für 90 sec in gepuffertem Aceton-Formalin (CD4, CD8, CD61) oder mit Methanol-Aceton (Dotterantikörper, c-kit, CD68) fixiert und dreimal 5 min in PBS pH 7,4 gespült (Mason et al., 1975). Die als Positivkontrollen verwendeten Gewebeschnitte wurden in der absteigenden Alkoholreihe hydriert und ebenfalls dreimal 5 min in PBS pH 7,4 gespült.

Tab. 6: Übersicht über die in der Immunhistologie verwendeten Antikörper

Antikörper zum Nachweis von	Bezeichnung, Klon	Verd.	Sekundär-Ak	Detektion	Verd.
Zellproliferation	Ki-67 (MIB-1) (DakoCytomation GmbH, Hamburg)	1:50	Rabbit anti-Mouse IgG, AP-markiert (DakoCytomation GmbH, Hamburg)	APAAP	1:25
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD4 (Serotec, Düsseldorf)	1:100	Rabbit anti-Mouse IgG, biotinyliert (DakoCytomation GmbH, Hamburg)	ABC	1:300
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD8 (Serotec, Düsseldorf)	1:50	Rabbit anti-Mouse IgG, biotinyliert (DakoCytomation GmbH, Hamburg)	ABC	1:300
Monozyten, Makrophagen	CD68, EBM11 (DakoCytomation GmbH, Hamburg)	1:50	Rabbit anti-Mouse IgG, biotinyliert (DakoCytomation GmbH, Hamburg)	ABC	1:300
HSC	c-kit (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz)	1:100, 1:200	Swine Anti-Rabbit IgG, biotinyliert (DakoCytomation GmbH, Hamburg)	ABC	1:300
			FITC-Goat Anti-Rabbit IgG (Vector Laboratories, Inc., Burlingame)	IF	1:400
HSC	CD34 (aviäre Antikörper)	1:100, 1:200,	Rabbit Anti-Chicken-IgG, biotinyliert (DakoCytomation GmbH, Hamburg)	ABC	1:400
HSC	c-kit (aviäre Antikörper)	1:400, 1:800	FITC-Rabbit Anti-Chicken-IgG (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville)	IF	
Thrombozyten, Megakaryozyten GPIII/a	CD61, Y2/51 (DakoCytomation GmbH, Hamburg)	1:50, 1:100	direkte IF		

### 3.2.1 APAAP-Methode

Für den Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) angewendet.

Zum „Antigen-Retrieval“ wurden die Ausstriche in der Mikrowelle in Target Retrieval Solution pH 6,1 (DakoCytomation GmbH, Hamburg) vorbehandelt. Nach 20-minütigem Abkühlen wurden sie 2 x 5 min in TRIS gespült. Es folgten folgende Inkubationsschritte in der Feuchtkammer:

- Primär-Antikörper Ki-67 1:50, 1 h, RT
- AP-markierter Sekundär-Antikörper (rabbit anti-mouse) 1:25, 30 min, RT
- APAAP Mouse-monoclonal-Komplex 1:50, 30 min, RT
- AP-markierter Sekundär-Antikörper (rabbit anti-mouse) 1:25, 10 min, RT
- APAAP Mouse-monoclonal-Komplex 1:50, 10 min, RT
- Fast Red (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) 20 min

Nach jedem Inkubationsschritt wurden zweimal 5 min in TRIS-Puffer pH 7,4 gespült.

Nach der Inkubation in Fast Red wurde zusätzlich 5 min mit Leitungswasser gespült. Die Ausstriche wurden 30 sec mit Hämalaun (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) gegengefärbt, anschließend 10 min unter Leitungswasser gebläut und in Kaiser's Gelatine (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) eingedeckelt.

#### 3.2.2 ABC-Methode

Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) wurde zum immunhistochemischen Nachweis der Antigene CD4, CD8, CD68 sowie c-kit und CD34 (Dotterantikörper) angewendet.

Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate 10 min in einer Wasserstoffperoxidlösung inkubiert und 2 x 5 min in PBS pH 7,4 gespült.

Anschließend wurden folgende Inkubationsschritte in der Feuchtkammer durchgeführt:

- Primärantikörper, Verdünnungen entsprechend der Tabelle 6, über Nacht im Kühlschrank, 4°C
- biotinylierter Sekundärantikörper, entsprechend der Tabelle 6, 30 min, RT
- Streptavidin-Biotin-Horseradish Peroxidase-Komplex (StreptABComplex/HRP, DakoCytomation GmbH, Hamburg), 30 min, RT
- DAB-Wasserstoffperoxidlösung, 5 min

Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal 5 min in PBS pH 7,4 gespült. Nach der Entwicklung der Farbreaktion mit der DAB-Wasserstoffperoxidlösung folgte 10-minütiges Wässern in fließendem Leitungswasser. Zur Kernfärbung wurden die Ausstriche und Gewebeschnitte 30 sec in Hämalaun (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) gegengefärbt und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte die schrittweise Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Präparate wurden aus dem Xylol mit Eukitt (Fluka, Buchs, Schweiz) eingedeckelt.

Bei Verwendung des Dotterantikörpers c-kit an Hodengewebe wurde vor der Inkubation mit dem Primärantikörper eine Vorbehandlung in der Mikrowelle (3 x 5 min) in Target Retrieval Solution (DakoCytomation GmbH, Hamburg) (1:10 verdünnt in Aqua dest. pH 6,1) durchgeführt.

Zur Antigenmaskierung wurden bei Verwendung des CD68-Antikörpers vor dem Auftragen des Primärantikörpers die Blutausstriche und Gewebeschnitte mit 0,1%iger oder 0,05%iger Protease (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) vorbehandelt, bzw. Blutausstriche ohne Proteaseverdau verwendet.



### 3.2.3 Immunfluoreszenz

Der Nachweis von CD61 erfolgte durch direkte Immunfluoreszenz. Die Präparate wurden nach dem Fixieren bzw. nach der absteigenden Alkoholreihe sofort mit dem FITC-gekoppelten Antikörper inkubiert (1h, RT, in der Feuchtkammer).

Für die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von c-kit (C-19) und den CD34- und c-kit-Dotterantikörpern erfolgten zwei Inkubationsschritte in der Feuchtkammer:

- Primäranantikörper, entsprechend der Tabelle 6, über Nacht Kühlschrank, 4°C
- FITC-markierter Sekundäranantikörper, entsprechend der Tabelle 6, 30 min, RT

Nach den Inkubationsschritten wurde jeweils dreimal 5 min in PBS pH 7,4 gewaschen.

Die Kernfärbung erfolgte jeweils 10 min mit dem DNA-Farbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, 1 µg/µl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) in einer Verdünnung von 1:1000. Anschließend wurde 10 min mit Leitungswasser gespült und die Präparate mit dem wässrigen Mounting-Medium Gel-Mount (Biomedica, Foster City) eingedeckelt.

Die Präparate wurden bis zur Auswertung dunkel und im Kühlschrank aufbewahrt.

Bei allen Verfahren wurden Negativkontrollen durchgeführt, in denen der Primäranantikörper durch ein Aliquot an Antikörper-Diluent (DakoCytomation GmbH, Hamburg) ersetzt wurde. Zur Überprüfung der Reaktivität der einzelnen Antikörper wurden als Positivkontrolle Rinderfeten der SSL 2,5-4,4 cm (Dotterantikörper), bovine fetale Leber (c-kit, CD61, CD68, Dotterantikörper), fetaler und adulter Hoden (c-kit) oder Lymphknoten (CD4, CD8, CD68) verwendet.

Die Auswertung und die Fotodokumentation der lichtmikroskopischen und immunhistochemischen Präparate (ABC- und APAAP-Methode) wurden an einem Leitz Aristoplan Mikroskop (Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar) durchgeführt, das an das Fotosystem Leitz Vario-Orthomat E (Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar) gekoppelt war. Als Filmmaterial diente der Kunstlichtfilm Ektachrome 64T Professional Film (Kodak GmbH, Stuttgart).

Für die Immunfluoreszenz-Präparate wurden die Auswertung und die Fotodokumentation an dem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Leitz Dialux 20 (Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar) bei Wellenlänge 490 nm vorgenommen. Zur Fotografie wurde der Film Kodak Elite 400 (Kodak GmbH, Stuttgart) verwendet.

Einzelne ausgewählte Präparate wurden an dem konfokalen Lasermikroskop Zeiss LSM 510 meta (Zeiss, Jena) ausgewertet und digital dokumentiert.

### 3.3 Glykohistochemische Färbungen

Zum Nachweis der Lektinbindungsstellen im Nabelschnurblut wurden die Lektine entsprechend der unten aufgeführten Tabelle 7 verwendet. Alle Lektine waren direkt FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat) gekoppelt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen).

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Lektine und entsprechenden Hemmzucker

Abkürzung	Lektin	Zuckerspezifität	Herkunft	Hemmung durch
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> Agglutinin	$\beta$ -D-Gal-(1,3)-D-GalNAc	Erdnuss	Galaktose
Con A	<i>Concanavalia ensiformes</i> Agglutinin	$\alpha$ -D-Man > $\alpha$ -D-Glc	Schwertbohne	Mannose
ECA	<i>Erythrina cristagalli</i> Agglutinin	$\alpha$ -D-Gal-(1,4)-GlcNAc	Korallenbaum	Galaktose
SBA	<i>Glycine max</i> Agglutinin	$\alpha$ -D-GalNAc, $\alpha$ -D-Gal	Sojabohne	$\alpha$ -D-GalNAc
GSA I	<i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin I	endständiges $\alpha$ -GalNAc > endständiges $\alpha$ -Gal	Griffonia	Galaktose, N-Acetyl- Glukosamin
LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i> Agglutinin	endständige $\alpha$ -Fuc	Lotus	L-Fukose
WGA	<i>Triticum vulgare</i> Agglutinin	(D-GalNAc) <sub>2</sub> NeuNAc	Weizenkeim	N-Acetyl- Galaktosamin
UEA I	<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin I	$\alpha$ -L-Fuc	Stechginster- samen	$\alpha$ -L-Fukose
VVA	<i>Vicia villosa</i> Agglutinin	D-GalNAc	Wicke	N-Acetyl- Glukosamin

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden die Ausstriche für 90 sec mit Methanol-Aceton (1:1) oder mit Methanol-Aceton-Formaldehyd (38%ig) (19T:19T:2T) oder 5 min mit Formaldehyd-Dampf fixiert und anschließend dreimal 5 min in TRIS-Puffer pH 6,8 gewaschen. Die Ausstriche wurden mit je 100  $\mu$ l eines Lektins (1:30) über Nacht im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Am nächsten Tag wurde 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend mit dem Mounting-Medium Gel-Mount (Biomedica, Foster City) eingedeckelt.

#### 3.3.1 Doppelfärbungen mit FITC- und Rhodamin-markierten Lektinen

Bei der Doppelfärbungen wurden die Ausstriche zuerst mit FITC-markiertem WGA (15  $\mu$ g/ml) und anschließend mit Rhodamin-markiertem Con A (15  $\mu$ g/ml) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame) je 1 h in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Die Kerne wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) in einer Verdünnung von 1:1000 in TRIS-Puffer gegengefärbt. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal 5 min in TRIS-Puffer gespült. Negativkontrollen wurden durchgeführt, indem das FITC- oder Rhodamin-gekoppelte Lektin durch ein Aliquot an Pufferlösung ersetzt wurde.

### 3.3.2 Kompetitive Hemmung

Zur Überprüfung der Spezifität der einzelnen Lektine wurde eine Präabsorption mit Hemmzuckern durchgeführt. Hierzu wurde zu dem Lektin ein Hemmzucker (0,2 M) entsprechend der Tabelle 7 zugegeben. Anschließend wurden die Blutausrichungen wie im oben beschriebenen Protokoll zur Lektinfärbung behandelt, wobei das Lektin durch die Lektin-Hemmzucker-Lösung ersetzt wurde. Die Inkubation erfolgte 1 h in der Feuchtkammer bei Dunkelheit.

Die Auswertung der FITC-gefärbten Präparate erfolgte am Aufricht-Fluoreszenzmikroskop Leitz Dialux 20 (Leitz, Wetzlar) bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm. Zur Fotografie wurde der Film Kodak Elite 400 verwendet.

Die mit FITC, Rhodamin und DAPI dreifach gefärbten Präparate wurden an dem konfokalen Lasermikroskop Zeiss LSM 510 meta (Zeiss, Jena) ausgewertet und digital dokumentiert.

## 4 Elektronenmikroskopie

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Proben erfolgte an dem Transmissionselektronenmikroskop EM Zeiss 902 (Zeiss, Oberkochen). Zur Fotografie wurden Maco ort 25c-Filme (Maco Photo Products, Hamburg) verwendet.

## 5 Herstellung, Isolierung und Charakterisierung von Antikörpern aus dem Dottersack

Im Huhn werden zirkulierende IgG-Moleküle nach enzymatischer Strukturänderung rezeptorabhängig über die Oozytenmembran in die heranreifenden Oozyten übertragen (Kramer & Cho, 1970). Diese Immunglobuline weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Säuger-IgG auf und werden deswegen auch als IgG bezeichnet (Lösch, 1972). Einige Autoren benennen diese Immunglobuline auch als IgY (Immunglobuline aus dem Dotter, engl.: „yolk“) (Leslie & Clem, 1969).

Für die Immunisierung werden junge Legehennen (ca. 40 Wochen) der Rasse LSL White Leghorn bevorzugt (Behn et al., 1996; Schwarzkopf & Thiele, 1996). Die höchsten IgG-Titer werden erzielt, wenn die Hennen in Käfigen gehalten werden und nach einer Erstimmunisierung zweimal im Abstand von 4 Wochen geboostert werden (Erhard et al., 2000a; Erhard et al., 2000b).

Zur verstärkten Anregung der zellulären Immunantwort werden Adjuvantien bei der Immunisierung zugegeben. Zwei wichtige Adjuvantien sind das inkomplette Freund-Adjuvans (FIA) und das Lipopeptid N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysin x 3 HCl (Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> x 3 HCl, PCSL) (Hofmann et al., 1996). FIA ist eine Wasser-in-Öl Emulsion aus Paraffinöl und Mannid-Monooleat-Öl, die im Gegensatz zum kompletten Freund-Adjuvans keine abgetöteten Mykobakterium tuberculosis-Erreger enthält (Freund & McDermott, 1942). Das Freund-Adjuvans kann granulomatöse Entzündungen an der Injektionsstelle hervorrufen, wohingegen PCSL keine entzündlichen Reaktionen induziert (Schmidt et al., 1996; Wanke et al., 1996). Als optimale Konzentrationen an Adjuvantien und Antigen haben sich folgende Mengen erwiesen (Erhard et al., 2000a):

- FIA: 250 µl
- PCSL: 250 µg pro Injektion
- Antigen: 10-100 µg.

Die Injektion kann sowohl subkutan, als auch intramuskulär erfolgen.

Zur Isolierung gibt es eine Vielzahl an verschiedenen Aufreinigungsprotokollen (Fischer et al., 1996). Als besonders effektiv hat sich eine Kombination aus Präzipitation der Lipoproteine mit Dextransulfat (Jesenius et al., 1981) und Fällung der IgY-Moleküle mit Ammoniumsulfat (Wallmann et al., 1990) erwiesen.

#### **5.1 Immunisierung der Legehennen**

Zur Immunisierung der Legehennen wurden Peptide bestehend aus 15 Aminosäuren synthetisiert und an ein Carrierprotein gekoppelt, um die immunogene Wirkung zu erhöhen. Als Carrierprotein wurde Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) mit einem Molekulargewicht von bis zu 3.000 Dalton verwendet.

Die ausgewählten Sequenzen sind in der Tabelle 8 aufgelistet. Die einzelnen Proteinsequenzen wurden entsprechend der Tabelle 8 von A bis F durchnummeriert. Im Folgenden werden die einzelnen Antikörper gemäß des Peptids bezeichnet, gegen das sie gebildet wurden.

Tab. 8: Übersicht über die zur Immunisierung verwendeten Aminosäuresequenzen

Protein	Bezeichnung	Position der Aminosäuren	Aminosäuresequenz
CD34	A	221-235	Lys Gln Ala Glu Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val
	B	231-245	Ala Gln Ser Glu Val Arg Pro Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Thr
	C	241-255	Leu Leu Val Leu Thr Asn Arg Thr Glu Ser Ser Ser Lys Ile Lys
c-kit	D	301-315	Asn Val Thr Thr Thr Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Phe Ile Asn
	E	311-325	Lys Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Met Asn Thr Thr Val Phe
	F	321-335	Asn Thr Thr Val Phe Val Asn Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Val

Pro Sequenz wurden sowohl FIA, als auch PCSL als Adjuvantien verwendet. Pro Antigen-Adjuvans-Kombination wurden 2 Hennen immunisiert. Adjuvantien und Antigen wurden in den folgenden Konzentrationen injiziert:

- PCSL (EMC microcollections GmbH, Tübingen): 250 µl/Injektion, Konzentration: 1 mg/ml
- FIA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen): 250 µl/Injektion
- Antigen: 100 µl/Injektion, Konzentration 1 mg/ml

Insgesamt wurden 24 Legehennen immunisiert. Die Injektion erfolgte mit 1,2 x 40 mm Einmalkanülen (B. Braun, Melsungen) seitlich der Carina sternii tief in den M. pectoralis. Nach der Erstimmunisierung (Tag 0) erfolgten zwei Boosterungen (6. und 10. Woche) nach demselben Schema.

Vor der Erstimmunisierung wurde pro Huhn mindestens ein Ei zur Negativkontrolle gesammelt. Entsprechend der Kinetik der Dotterantikörper wurden ab dem zehnten Tag nach der zweiten Boosterung die Eier gesammelt und sofort weiterverarbeitet. Die weiteren Sammlungen erfolgten in der dritten, der vierten und der fünften Woche nach der letzten Boosterung.

Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Dotter vom Eiklar getrennt, gewogen, im Verhältnis 1:2 (Gewicht) mit TBS pH 7,3 versetzt und bei -20°C eingefroren.

## 5.2 Fällung der Antikörper aus dem Eidotter

Zur Fällung der IgY-Fraktion aus dem Dotter wurde das Dotter-TBS-Gemisch aufgetaut und mit TBS weiter auf eine Endverdünnung von 1:10 verdünnt und für 30 min gerührt.

Anschließend wurden die Dotter 15 min bei 4°C zentrifugiert (5422 x g) und der entstandene gelblich trübe Überstand mit der 0,4-fachen Menge an 10%iger Dextransulfat-Lösung versetzt und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe der einfachen Menge an 1M Kalziumchlorid-Lösung bezogen auf das Ausgangsdottergewicht wurde wiederum 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde bei 5422 x g für 15 min bei

4°C abzentrifugiert und verworfen. Der klare Überstand wurde über einem Faltenfilter filtriert, in Dialyseschläuche (Durchmesser 28,6, Porengröße: 12000-14000 Da, Medicell International Ltd, London) gefüllt und über Nacht im Kühlschrank in 5 l TBS-Puffer pro 3 Dotter dialysiert.

Am nächsten Tag wurde der Schlauchinhalt durchmischt, in ein Becherglas entleert und das Gewicht des Schlauchinhaltes bestimmt. Dieser wurde mit der 0,26-fachen Menge an Ammoniumsulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) pro Gramm Dotterüberstand versetzt, 30 min bei Raumtemperatur bis zum Lösen verrührt und anschließend 15 min bei 4°C zentrifugiert (5422 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in maximal 2,5 ml TBS gelöst, in Dialyseschläuche abgefüllt (Durchmesser 15,9 mm, Porengröße 12000-14000 Da, Medicell International Ltd, London) und über Nacht im Kühlschrank in 5 l TBS-Puffer pro 6 Dotter dialysiert.

Am 3. und 4. Tag wurde der Puffer jeweils gewechselt, wobei statt TBS-Puffer Dialysepuffer verwendet wurde. Nach einem weiteren Tag wurde der Schlauchinhalt im Dialyseschlauch gemischt und in Falcontubes entleert.

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgt am Photometer durch Messung der Extinktion in einer Quarzküvette bei 280 nm. Die Nullwerteneinstellung erfolgte mit Dialysepuffer. Die Proben wurden vor der Bestimmung 1:10 mit Dialysepuffer verdünnt. Die Berechnung der IgG-Konzentration erfolgte an hand folgender Gleichung:

$$E \times 10 / 1,4 = \text{IgG in mg/ml}$$

E: Extinktionswert

10: Verdünnungsfaktor aus 1:10

1,4: Extinktionskoeffizient

### 5.3 ELISA und Western Blot

Sowohl für den ELISA, als auch für den Western Blot wurden 1g Leber in einem Kalium-EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit dem Homogenisator (Ultra Turaxx T 25, Janke und Kunker JKA Labortechnik) zerkleinert. Die zerkleinerten Proben wurden in 1 ml Bicarbonatpuffer pH 9,6 gelöst und über einem Faltenfilter (Marchery und Nagel GmbH & Co KG) filtriert. Diese Leber-Bicarbonatpuffer-Lösung wurde 1:10 verdünnt und diente als Ausgangsmaterial für die ELISA-Tests und Western Blots.

### 5.3.1 ELISA

Von der Leber-Bicarbonatpuffer-Lösung wurde je 100 µl in die Kavitäten einer 96-Loch-ELISA-Platte (NUNC® Immunoplate, MaxiSorp Surface) pipettiert. Zur Anheftung der vorhandenen Proteine ruhte die Platte über Nacht in einer feuchten Kammer. Als Negativkontrolle wurde anstelle des Leberhomogenats PBS verwendet. Am nächsten Tag wurden nach Abkippen des Probenmaterials die freien Bindungsstellen in den Kavitäten mit je 150 µl 3%igem Casein-PBS geblockt (1h, Taumler). Nach Abkippen, dreimaligem Waschen mit ELISA-Spülflüssigkeit und Ausschlagen der Platte wurden in einer Verdünnungsreihe je 100 µl der 6 hergestellten Antikörper pipettiert. Die Ausgangskonzentration der Antikörper betrug 1:500. Sie wurden 1:2 mit PBS-Puffer pH 7,3 weiter verdünnt. Anschließend wurde eine Stunde in der feuchten Kammer auf dem Taumler inkubiert. Nach dem Waschvorgang mit viermaligem Spülen mit ELISA-Spülflüssigkeit und Ausschlagen wurde der HRP-markierte anti-chicken IgG F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper (Rockland Inc., Gilbertsville) auf die Platte gegeben und wiederum für eine Stunde auf dem Taumler inkubiert. Der Sekundäantikörper wurde mit 1%igem Casein-PBS in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Anschließend wurde ein Waschdurchgang mit fünfmaligem Spülen mit ELISA-Spülflüssigkeit und Ausschlagen durchgeführt. Zur Farbentwicklung wurde in jede Kavität eine frisch angesetzte Wasserstoffperoxidpuffer-TMB-Lösung pipettiert. Die Reaktion wurde nach 20 min durch Zugabe von 100 µl 1M Schwefelsäure pro Kavität gestoppt.

Im Mikrotiterplatten-Messgerät (SLT-ATC, SLT-Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim) wurde die Extinktion der einzelnen Kavitäten bei Wellenlänge 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Ridawin (r-biopharm, Darmstadt). Die Kavitäten mit schwarzen Niederschlägen wurden nicht in die Auswertung einbezogen. In einem weiteren Versuch wurde in der 96-Loch-ELISA-Platte eine Verdünnungsreihe des Leberhomogenats angefertigt. Dabei wurde von der Ausgangsverdünnung 1:10 ausgegangen und 1:2 mit Bicarbonat-Puffer pH 9,6 weiter verdünnt. Die weiteren Arbeitsschritte entsprachen dem oben beschriebenen ELISA-Protokoll. Die 6 Antikörper wurden jetzt allerdings in einer festen Konzentration von 1:4000 verwendet. Hierdurch war es möglich Titer der einzelnen Antikörper zu bestimmen. Zur Berechnung des in der Probe nachweisbaren Antigentiters, wurden diejenigen Verdünnungsstufen herangezogen, deren Extinktion im Bereich von 1,0 lag. Der Titer wurde folgendermaßen definiert:

$$\text{Extinktion} \times \text{reziproke Verdünnung} = \text{Titer}$$

Negativkontrollen wurden durchgeführt, indem das Leberhomogenat durch Bicarbonat-Puffer pH 9,6 ersetzt wurde.

#### 5.3.2 Western Blot

##### SDS-Gelelektrophorese

In einer Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:64 wurde die Leber-Bicarbonatpuffer-Lösung mit dem entsprechenden Volumen an Bicarbonat-Puffer pH 9,6 versetzt. Zu 20 µl des Probengemisches wurden 10 µl SDS-Puffer und 1,5 µl Brom-Methyl-Blau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) gegeben. Um eine optimale Bindung von SDS an das Protein zu erreichen, wurden die Proben für 5 min bei 95°C im Wasserbad erhitzt.

Es wurden Western Blots auf zwei verschiedenen Gelen mit unterschiedlichen Auftrennungsbereichen durchgeführt. In der Elektrophoresekammer PhastSystem Separation and Control Unit (Amersham Biosciences Europa GmbH, Freiburg) wurde das Gel PhastGel Gradient 10-15 mit PhastGel Pufferstreifen (Amersham Biosciences Europa GmbH, Freiburg) verwendet. Des Weiteren wurde eine Elektrophorese in der Elektrophoresekammer Multiphor II (Amersham Biosciences Europa GmbH, Freiburg) auf einem ExcelGel homogenous 7,5 sowie mit ExcelGel SDS Pufferstreifen (Amersham Biosciences Europa GmbH, Freiburg) durchgeführt.

In beiden Elektrophoresekammern wurde die Kühlplatte auf 15°C temperiert. Vor der Positionierung des Gels wurde zur besseren Wärmleitung Kerosen auf die Kühlplatte pipettiert. Das jeweilige Gel wurde anschließend mit der Trägerfolie nach unten entsprechen der Laufrichtung blasenfrei auf die benetzte Platte gelegt und der Anoden- sowie Kathoden-Pufferstreifen auf die korrespondierenden Seiten des Gels gesetzt. In die Kavitäten des Gels wurden 0,5 µl (PhastGel) bzw. 10 µl (ExcelGel) der Probe pipettiert. Als Marker für das Molekulargewicht wurden LMW-SDS-Marker (Amersham Biosciences Europa GmbH, Freiburg) verwendet.

Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 40 mA bei 600 V und 5 W im PhastSystem und mit einer Stromstärke von 25 mA bei 600 V und 5 W in der Multiphor-Elektrophoresekammer gestartet. Das Gel lief bis zum Erreichen des oberen Randes 60 min (PhastSystem) bzw. 80 min (Multiphor).

##### Coomassie-Färbung

Nach Entnahme des Gels aus der Elektrophoresekammer wurde es in die Coomassie-Färbelösung eingelegt, bis die Eichbanden deutlich sichtbar wurden. Anschließend wurde die



Färbelösung gegen Entfärbelösung ausgetauscht. Das Gel wurde solange in der Entfärbelösung belassen bis der Hintergrund klar und die Banden deutlich erkennbar waren.

#### Western Blot

Zum Blotten der Proteine im Semi-dry-Elektroblotter Multiphor NovaBlot (Amersham Biosciences Europa GmbH, Freiburg) wurden folgende Schichten zwischen die Elektroden gelegt:

- Kathode
- 9 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier (Electrode Paper NovaBlot, Amersham Biosciences Europa GmbH, Freiburg)
- SDS-Gel
- in Aqua dest. getränkte PVDF-Membran
- 3 Lagen in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier
- 6 Lagen in Anodenpuffer I getränktes Filterpapier
- Anode

Alle Komponenten wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten.

Die hydrophobe PVDF-Membran (Immobilon<sup>TM</sup>-P, Millipore Corporation, Billerica) wurde durch kurzes Tränken in Methanol aktiviert und mit Aqua dest. befeuchtet. Das Gel wurde vorsichtig von der Trägerfolie gelöst und blasenfrei auf die vorbereitete Membran gelegt. Das Blotten erfolgte bei einer Stromstärke von 0,7 mA/cm<sup>2</sup> Gel. Nach dem Blotten wurde die Membran mit Poinceau-Rot (Poinceau S Solution, Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) gefärbt und anschließend in 5 %iger Essigsäure fixiert und luftgetrocknet.

Zur Aktivierung wurde die Membran erneut kurz in Methanol getränkt und 10 sec in Aqua dest. gespült. Anschließend wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur mit 1%igem Casein-TBS blockiert und in ELISA-Puffer gespült. Die Inkubation mit den aviären Antikörpern (1:400, 1:200 und 1:100 in 1%iger Casein-TBS-Lösung) erfolgte 60 min lang bei Raumtemperatur. Nach einem 20-minütigen Waschschrift in ELISA-Puffer folgte der Inkubationsschritt mit dem anti-Huhn-IgG-AP (1:500 in 1%iger Casein-TBS-Lösung, 60 min) (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville). Die Farbreaktion wurde mit dem Substrat NBT/BCIP-Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), nach 1-2-minütiger Inkubation entwickelt und durch Spülen in Aqua dest. gestoppt.

Die Dokumentation der Banden auf der Membran erfolgte im Foto-System Kodak Image Station 2000R (biostep, Jahnsdorf).

## **IV Ergebnisse**

### **1 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen**

Die einzelnen Blutzellen aus dem Nabelschnurblut zeigten abhängig vom Gestationsstadium keine morphologischen Veränderungen. Nur die Anzahl der einzelnen Zellpopulationen änderte sich mit zunehmender Trächtigkeit beachtlich.

#### **1.1 Morphologie der Blutzellen aus dem Nabelschnurblut**

##### **1.1.1 Erythrozyten**

Die reifen Erythrozyten sind rund und blass-rosa, wobei die zentrale Aufhellung oft fehlt. In den fetalen Proben zeigen sich sowohl starke Anisozytose als auch Polychromasie. Ebenso weisen die Erythrozyten gelegentlich eine feine basophile Tüpfelung (Abb. 4) auf.

Unter den Vorstufen der Erythrozyten sind die orthochromatischen Erythroblasten die vorherrschende Zellpopulation (Abb. 2 und 3). Sie besitzen einen sehr dunklen kompakten Kern mit einem Zytoplasmasaum, der oft nur undeutlich vorhanden ist. Im Stadium der Kernexpulsion hängt das Zytoplasma sackartig am Kern. Dem entsprechend treten in den Ausstrichen immer wieder auch ausgeschleuste „nackte“ pyknotische Zellkerne auf.

Wesentlich seltener kommen polychromatische und basophile Erythroblasten vor. Bei den polychromatischen Erythroblasten (Abb. 3) tritt ein deutlicher gräulich-rosa Zytoplasmasaum auf, der Zellkern zeigt eine kompakte dunkelviolette Struktur. Der Kern der basophilen Erythroblasten hingegen ist größer und weist eine heterogene Chromatinverteilung mit heller und dunkler violetter Bereichen auf. Das Zytoplasma stellt sich hier lila bis bläulich dar (Abb. 4). Proerythroblasten treten äußerst selten auf. Sie fallen durch ihr stark basophiles Zytoplasma und ihre Größe auf. Der Zellkern besitzt eine lockere Struktur mit deutlichen Nukleoli, wobei das Zytoplasma um den Zellkern oft aufgehellert erscheint.

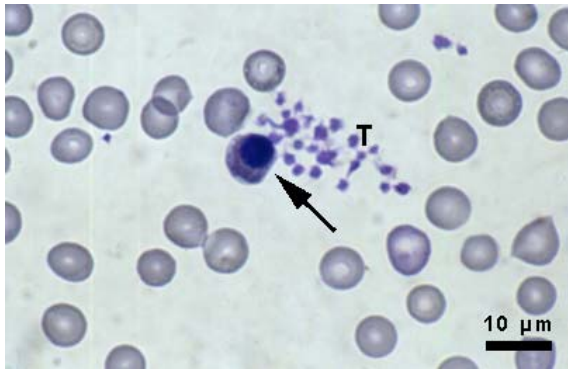


Abb. 2: Orthochromatischer Erythroblast (→) mit marginalisiertem Kern, Erythrozyten und Thrombozyten. SSL 13 cm.

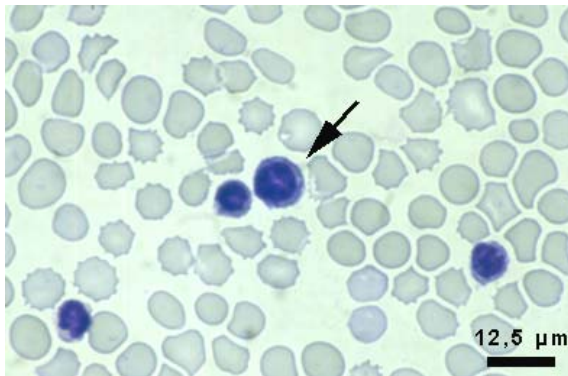


Abb. 3: Ein polychromatischer (→) und drei orthochromatische Erythroblasten. SSL 21 cm.

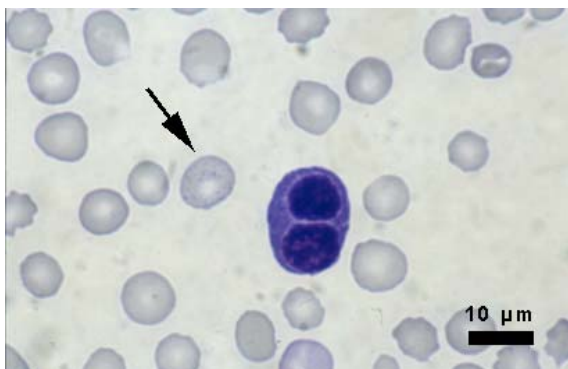


Abb. 4: Ein sich teilender basophiler Erythroblast. Reifer Erythrozyt mit basophiler Tüpfelung (→). SSL 20,5 cm.

### 1.1.2 Granulozyten

Alle Stadien der neutrophilen und eosinophilen Granulozytenreifung wurden in den Proben gefunden. Hingegen konnten in keiner der Proben basophile Granulozyten nachgewiesen werden.

Die erste charakterisierbare Zelle der granulozytären Reihe, der Myeloblast lässt sich morphologisch noch keiner Granulozytenart zuordnen. Diese große runde basophile Zelle besitzt einen hellvioletten lockeren Kern mit Nukleoli.

#### 1.1.2.1 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten besitzen einen typischen zwei- bis vierfach segmentierten dunkelvioletten Kern (Abb. 9). Die stabkernigen Granulozyten (Abb. 5) weisen einen

hufeisenförmigen, die Metamyelozyten (Abb. 6) einen eher bohnenförmigen Kern auf. Die durchscheinenden Granula füllen das gesamte Zytoplasma aller drei Zellarten aus. Im Stadium der Myelozyten (Abb.7) färbt sich das Zytoplasma bläulich, wobei einzelne dezente neutrophile Granula zu erkennen sind. Der Kern besitzt eine nierenförmige Gestalt, in dessen Einbuchtung manchmal eine aufgehellte Zone ohne Granula zu sehen ist (Golgi-Feld). Der Kern stellt sich bei Promyelozyten rund dar, wobei das Chromatin netzartig aufgelockert erscheint (Abb. 8). Im Kern sind ein bis drei runde Nukleoli zu sehen (Nukleolenringe). Das Zytoplasma ist bläulich und ganz vereinzelt sind neutrophile Granula zu erkennen.

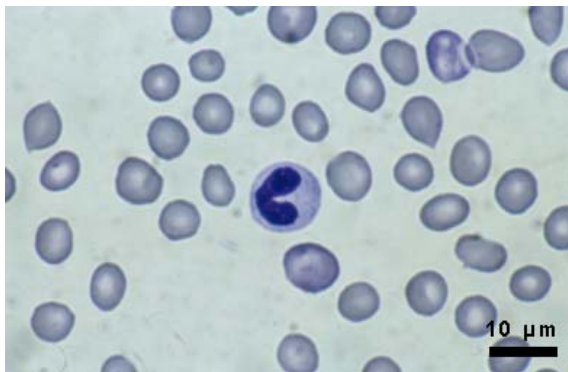


Abb. 5: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt. SSL 31 cm.

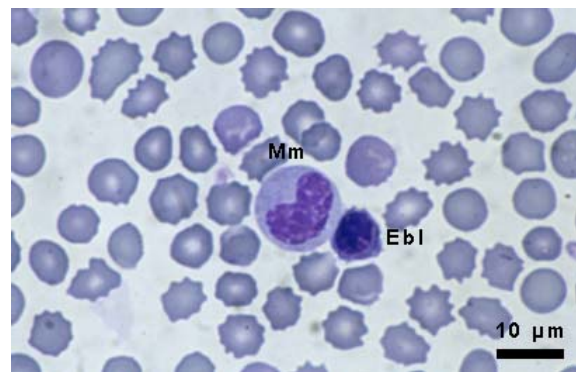


Abb. 6: Neutrophiler Metamyelozyt (Mm) und ein orthochromatischer Erythroblast. SSL 33 cm.

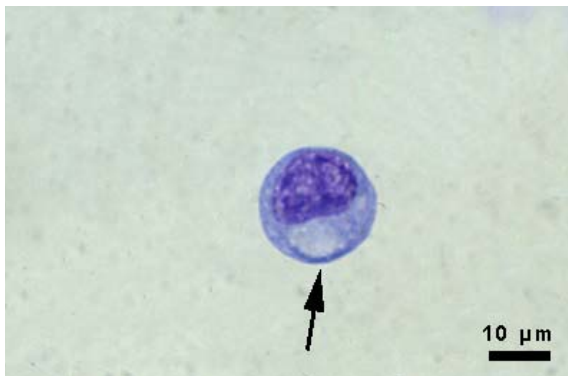


Abb. 7: Neutrophiler Myelozyt mit deutlicher Hofbildung im Bereich der leichten Kerneinbuchtung. Lysispuffer. SSL 42 cm.

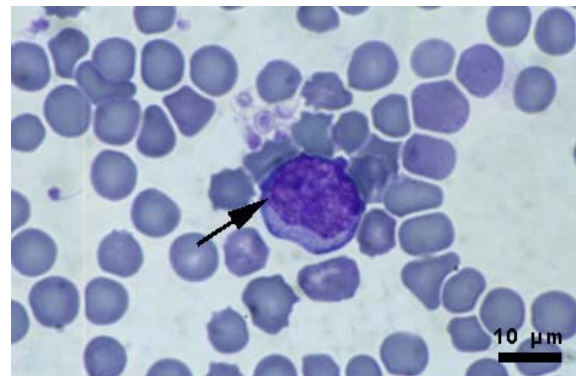


Abb. 8: Neutrophiler Promyelozyt mit Nukleoli, angedeutet als Ringe. SSL 21 cm.

### 1.1.2.2 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten zeichnen sich durch ihre rötlichen Granula aus, die in den reifen Zellen z.T. sogar den Kern überdecken (Abb. 9). Dieser ist weniger stark segmentiert als bei neutrophilen Granulozyten, so dass meist nur zwei Kernsegmente auftreten, die stark kondensiert sind. Die Stadien der Metamyelozyten (Abb. 10) und der Myelozyten (Abb. 11)

besitzen ebenfalls deutlich erkennbare eosinophile Granula, nur füllen diese nicht die gesamte Zelle aus, sondern liegen vereinzelt im Zytoplasma. Der Kern besitzt eine bohnenförmige bis rund Gestalt mit locker angeordnetem Chromatin.

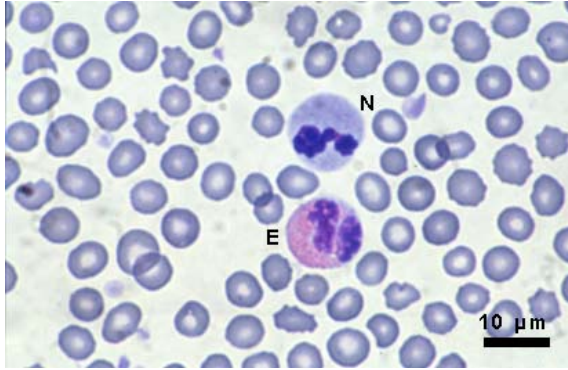


Abb. 9: Reifer eosinophiler (E) und neutrophiler Granulozyt (N). Neugeborenes Tier.

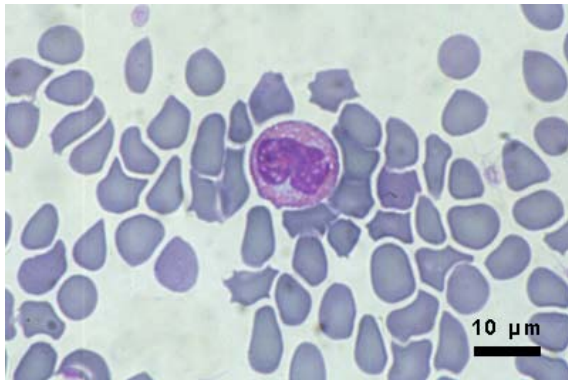


Abb. 10: Eosinophiler Metamyelozyt mit locker angeordneten eosinophile Granula. SSL 21 cm.

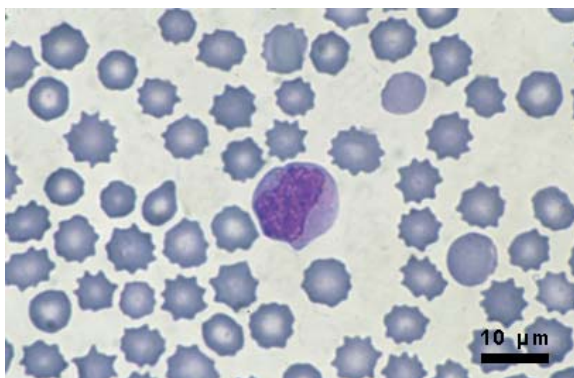


Abb. 11: Vereinzelte eosinophile Granula in einem eosinophilen Myelozyten. SSL 33 cm.

### 1.1.2.3 *Basophile Granulozyten*

Morphologisch konnten keine Zellen beobachtet werden, die in ihrem Zytoplasma blaue, basophile Granula aufwiesen.

### 1.1.3 Lymphozyten

Die Lymphozyten besitzen einen runden Zellkern, der ein grobscholliges violettes Chromatin aufweist. Der hellblaue Zytoplasmasaum stellt sich unterschiedlich weit dar. Anhand der



Weite des Zytoplasmasaums werden die Lymphozyten in verschiedene Reifungsstadien unterteilt. Die unreifen Lymphozyten besitzen einen weiteren Zytoplasmasaum als die reifen.

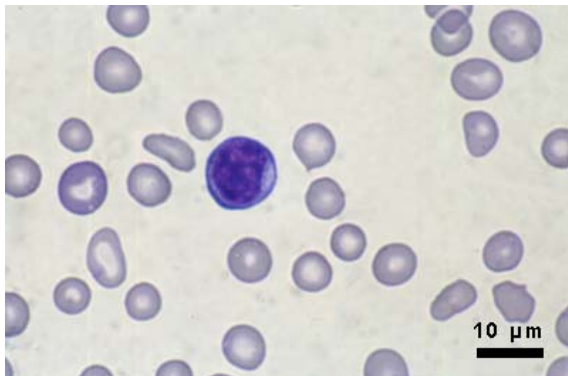


Abb. 12: Großer Lymphozyt mit weitem Zytoplasmasaum. SSL 31 cm.

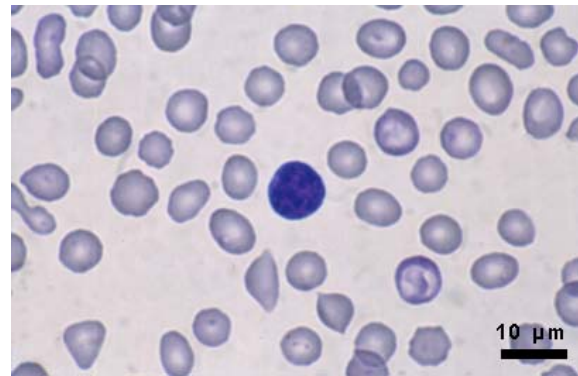


Abb. 13: Kleiner Lymphozyt. SSL 31 cm.

### 1.1.4 Monozyten

Der Kern der Monozyten besitzt eine nierenförmige bis ovale Form. Das Chromatin erscheint feinkörnig. Das Zytoplasma färbt sich hellblau bis grau. Im Zytoplasma sind in manchen Monozyten kleine, leer erscheinende Vakuolen sichtbar (Abb. 14).

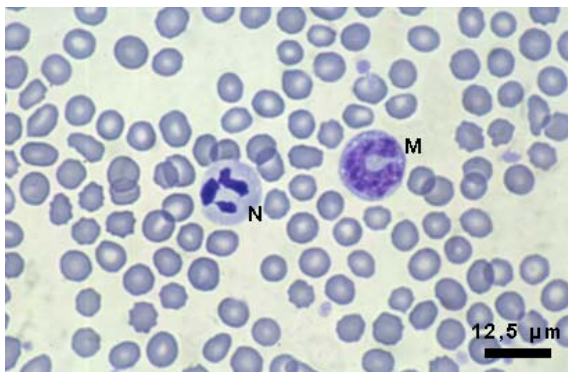


Abb. 14: Monozyt (M) mit charakteristischem bohnenförmigen Kern, zusätzlich ein segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (N). Neugeborenes Tier.

### 1.1.5 Thrombozyten

Thrombozyten sind in allen Proben zu erkennen, wobei in den Ausstrichen der kleinen SSL nur sehr wenige Thrombozyten vorkommen.

Die Thrombozyten stellen sich als kleine polygonale bis ellipsoide Zellen dar (Abb. 2 und 15), die sich bläulich granulär anfärben. Oft lagern sie sich in kleinen Gruppen zusammen. Unabhängig von der SSL treten in einigen Proben Thrombozyten auf, die mit 5-7 µm wesentlich größer als die „normalen“ 1-2 µm großen Plättchen sind und in Größe und Form

an Erythrozyten erinnern (Abb. 15 und 16). In den Ausstrichen aus dem Lysispuffer kommt es oft zur Bildung kleiner Blutkoagula, in denen die Thrombozyten stark verklumpt sind und auch andere Zellen mit eingeschlossen sind.

Megakaryozyten konnten in keinem der Ausstrichpräparate gefunden werden.

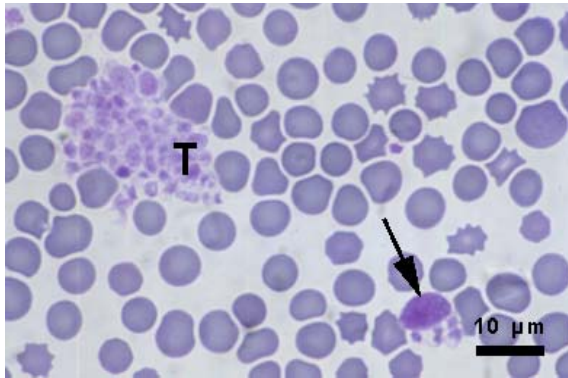


Abb. 15: Thrombozyten angeordnet in Gruppen und ein einzelner „Riesenthrombozyt“. SSL 21 cm.

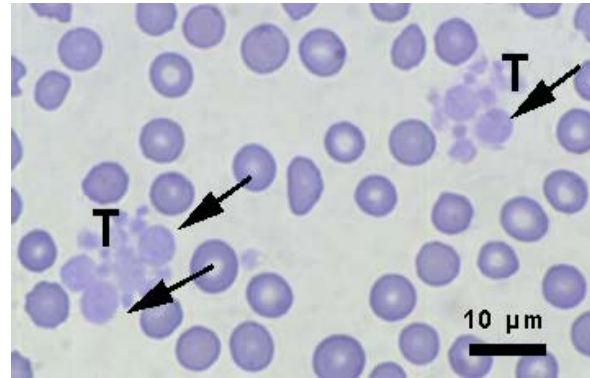


Abb. 16: Normal große Thrombozyten (T) und „Riesenthrombozyten“ (→). Neugeborenes Tier.

#### 1.1.6 Nicht klassifizierbare Zellen

Neben den beschriebenen Zellarten treten besonders in den Leukozyten aufgereinigten Proben (Ficoll<sup>®</sup> und Lysispuffer) unreife Blutzellen auf, deren Zelldurchmesser bis zu 20 µm misst und die sich durch ein stark basophiles Zytoplasma und einen großen runden Zellkern mit Nukleoli auszeichnen (Abb. 17). Das Chromatin dieser Zellen lagert sich sehr locker, so dass der Zellkern sehr hell erscheint. Diese Zellen können auf Grund ihrer primitiven Morphologie nicht eindeutig einer Blutzelllinie zugeordnet werden. Auf Grund ihres lymphoiden primitiven Aussehens können diese Zellen morphologisch Stammzellen zugeordnet werden.

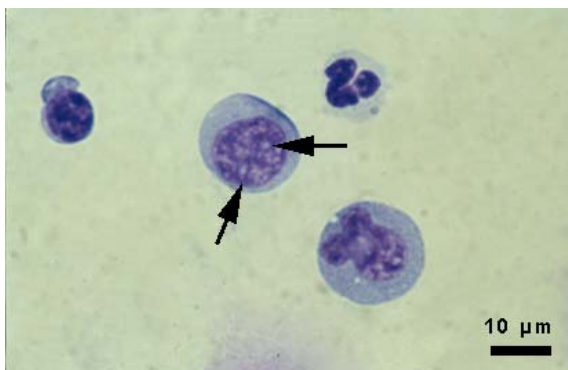


Abb. 17: Nicht klassifizierbare Blutzelle mit zwei Nukleoli (→) und locker angeordnetem Chromatin. Lysispuffer. SSL 53 cm.

### 1.1.7 Sonstige Zellen im Nabelschnurblut

#### 1.1.7.1 Vakuolisierte Zellen

In den Proben der SSL 28,5 cm (Abb. 18) und 31 cm (Abb. 19) kommen Zellen vor, die durch ein stark blasiges Zytoplasma charakterisiert sind. Der Zellkern dieser Zellen ist rund und violett. Im Zytoplasma treten viele unterschiedlich große Vakuolen auf, die nach außen hin alle membranbegrenzt sind. Aufgrund der Morphologie können diese Zellen als phagozytisch aktive Zellen dem MPS-System zugeordnet werden.

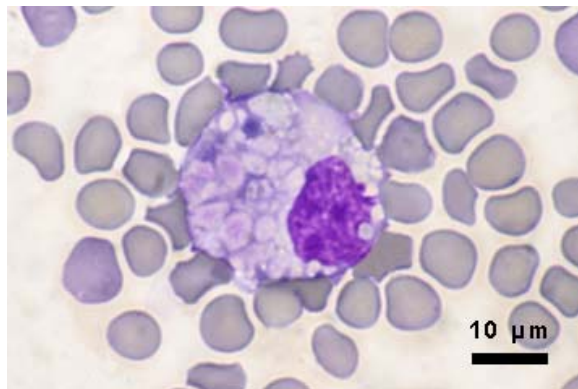


Abb. 18: Stark vakuolisierte Zelle mit basophilem Inhalt in den größeren Vakuolen. SSL 28,5 cm

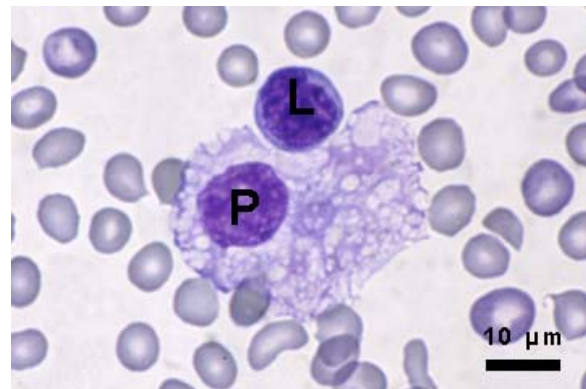


Abb. 19: Zelle (P) mit stark vakuolisiertem Zytoplasma. Die Vakuolen sind alle durch Membranen begrenzt. Großer Lymphozyt (L). SSL 31 cm

#### 1.1.7.2 Längliche Zellen

Als weiterer Zelltyp treten längliche Zellen mit einem großen ovalen Zellkern und bläulichem Zytoplasma auf. Sie kommen immer in Gruppen vor und ordnen sich bandartig an, so dass sie sich mit ihren Zellenden berühren (Abb. 20). Bei diesen nur in zwei Proben auftretenden Zellen könnte es sich um epitheliale Zellen handeln, die auf Grund der Probennahmetechnik in das Nabelschnurblut gelangten.



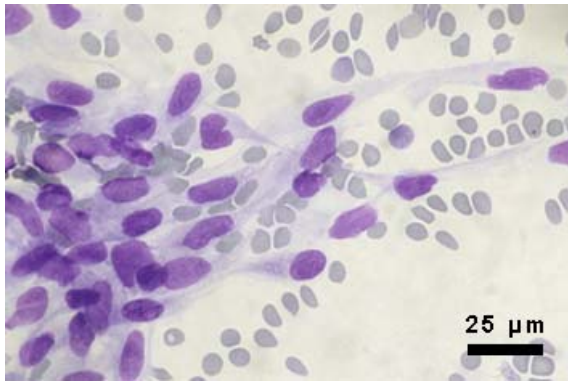


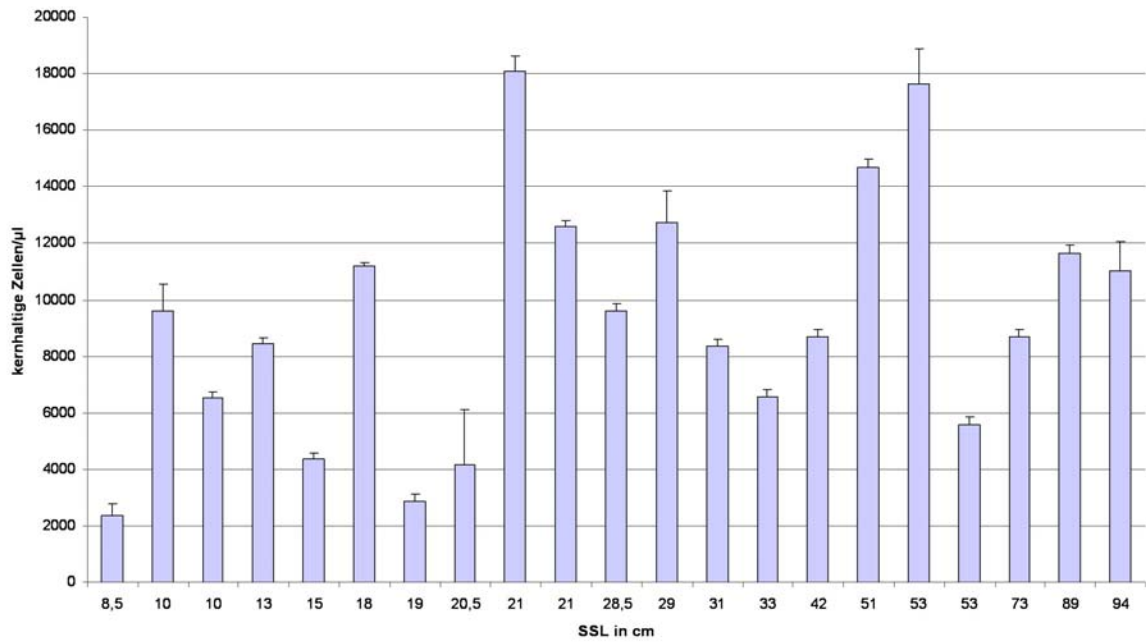
Abb. 20: Gruppe von länglichen, evtl. epithelialen Zellen im Blutausstrich. Die einzelnen Zellen sind bandartig miteinander verbunden. SSL 31 cm.

## 1.2 Kinetik der Blutzellen im Nabelschnurblut

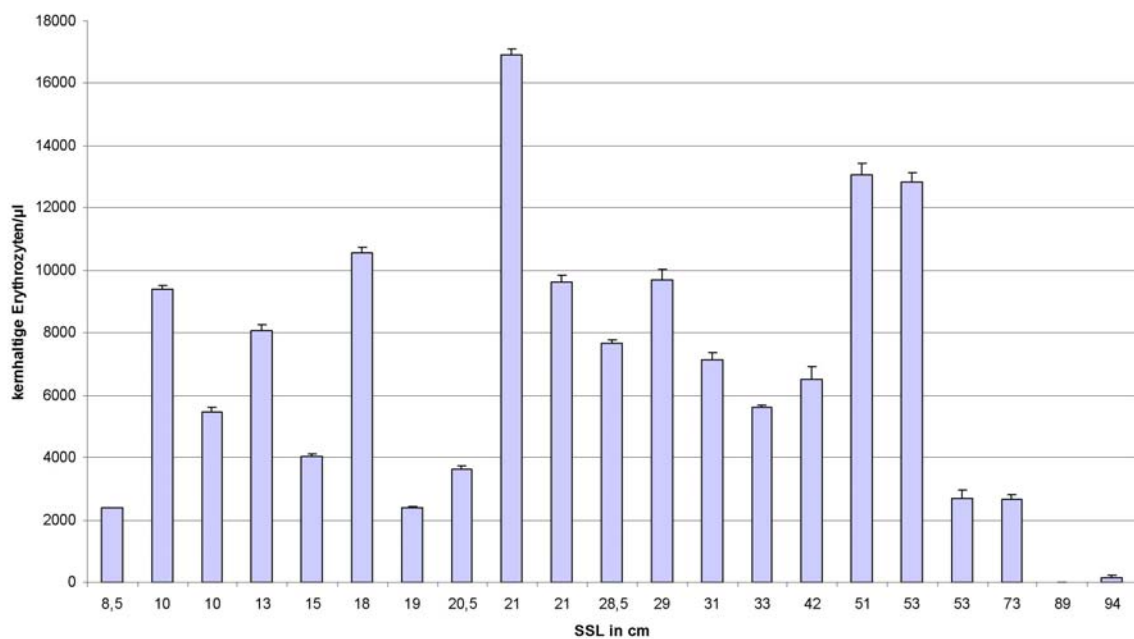
Der Gehalt an kernhaltigen Zellen im Nabelschnurblut zeigt im Laufe der Gravidität keine eindeutige Tendenz (Diagr. 1). Allgemein gilt jedoch, dass die Leukozyten im Laufe der Trächtigkeit zunehmen, wobei die kernhaltigen Erythrozyten abnehmen.

Bei den kleinsten untersuchten SSL von 8,5 und 10 cm treten fast ausschließlich kernlose bzw. kernhaltige Erythrozyten und Plättchen auf. Die kernhaltigen Erythrozyten-Vorstufen nehmen dann während der Gravidität ab. Dabei zeigte der Verlauf der kernhaltigen Erythrozyten zwei Maxima zwischen 20 und 30 cm SSL und bei ungefähr 50 cm SSL. In den Nabelschnurblutproben der geburtsreifen Kälber sowie in denen der neugeborenen Kälber waren keine oder nur äußerst wenige (1-2 pro 600 gezählter Zellen) kernhaltige Erythrozyten zu beobachten (Diagr. 2). Unter 600 gezählten kernhaltigen Zellen befanden sich bei SSL 8,5 cm keine Leukozyten. Die Leukozytenzahlen steigen dann von  $244 \pm 120$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  Blut bei SSL 10 cm auf  $10886 \pm 94/\mu\text{l}$  bei SSL 94 cm (Diagr. 3). Hierbei nimmt der Gehalt an reifen Granulozyten im Laufe der Gestation zu. In den kleinsten SSL bis 13 cm treten keine reifen Granulozyten oder deren Vorläufer auf. Die Anzahl der Granulozyten-Vorläufer steigt erst ab 30 cm SSL an, wobei der Anstieg keinen ab 50 cm stark variabel ist (Diagr. 4).

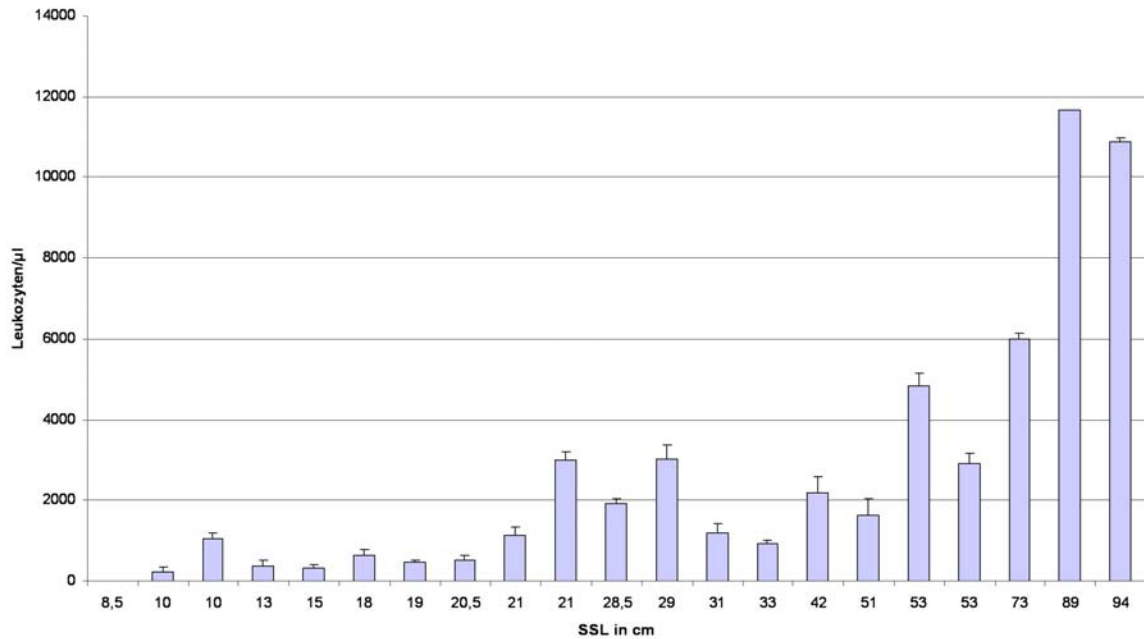
Eine Zusammenfassung der Kinetik der einzelnen Blutzellen geben die Diagramme 1 bis 4.



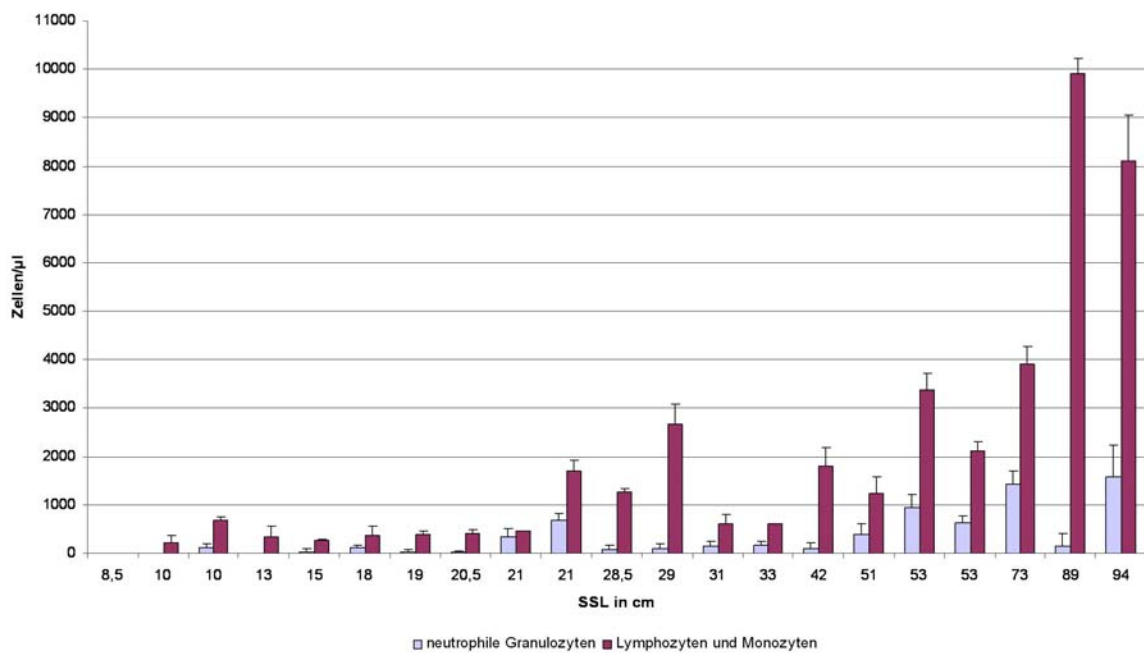
Diagr. 1: Veränderungen in der Anzahl der kernhaltigen Zellen pro µl Nabelschnurblut im Laufe der Trächtigkeit. SSL 8,5 cm bis SSL 94 cm.



Diagr. 2: Veränderungen in der Anzahl der kernhaltigen Erythrozyten pro µl Nabelschnurblut im Laufe der Trächtigkeit. SSL 8,5 cm bis SSL 94 cm.



Diagr. 3: Veränderungen in der Anzahl der Leukozyten pro µl Nabelschnurblut im Laufe der Trächtigkeit. SSL 8,5 cm bis 94 cm.



Diagr. 4: Veränderungen in der Anzahl der reifen Granulozyten und Lymphozyten/Monozyten pro µl Nabelschnurblut im Laufe der Trächtigkeit. SSL 8,5 cm bis 94 cm.

Im Nabelschnurblut der neugeborenen Kälber treten nur noch vereinzelt Vorläuferzellen auf. Hauptsächlich sind die reifen Stadien der Blutzellen vorhanden. Allerdings weisen die Werte von Tier zu Tier starke Unterschiede, die nicht auf die Schwere der Geburt zurückgeführt werden können.

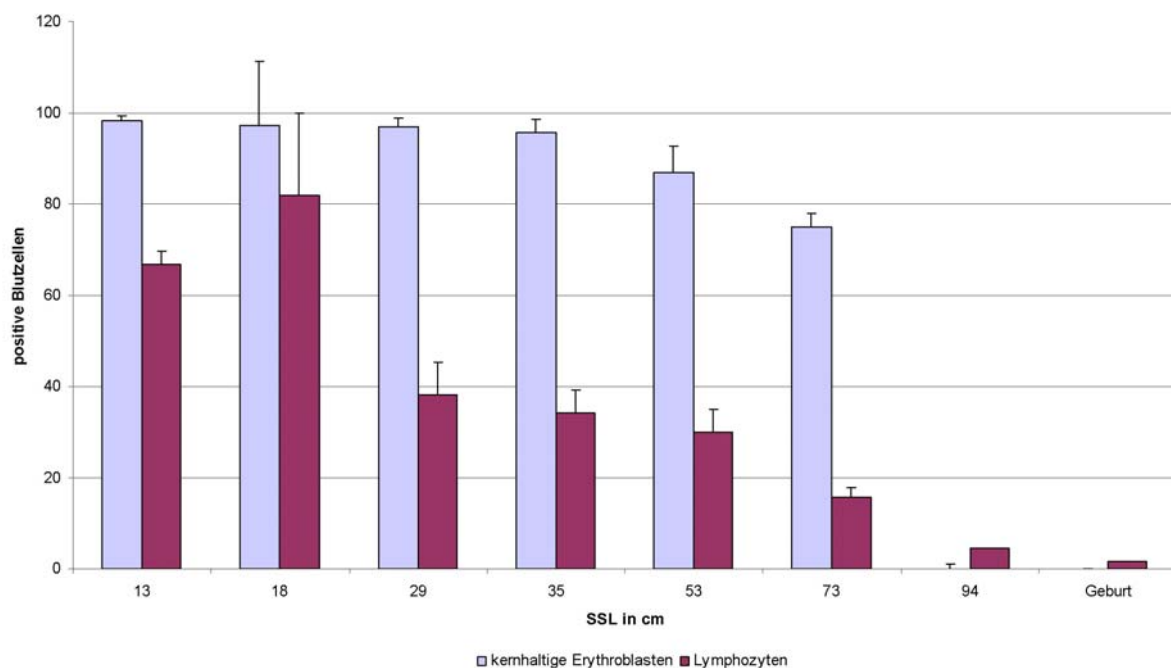
## 2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

### 2.1 Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67

Der immunhistochemische Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 mit dem MIB-1-Antikörper zeigt in den positiven Zellen eine streng nukleäre Reaktion. Im Laufe der Trächtigkeit ändert sich die Zahl an positiven Zellen (Diagr. 5).

Bei SSL 13 cm reagieren alle kernhaltigen Erythroblasten sowie die Mehrheit der lymphoiden Zellen positiv. Auftretende myeloide Zellen waren negativ oder besitzen selten eine schwache Positivität. Die Mehrzahl der Erythrozyten-Vorläufer (Abb. 21 und 22) bleibt bis zur Geburt (SSL 93 cm) positiv. Die Anzahl der mitotisch aktiven Lymphozyten (Abb. 22 und 23) nimmt hingegen mit zunehmender Trächtigkeit ab.

Die Negativkontrollen zeigten keine Immunreaktion.



Diagr. 5: Prozentualer Anteil der Ki-67-positiven Lymphozyten und Erythroblasten im Verlauf der Trächtigkeit (SSL 13 bis Geburt).

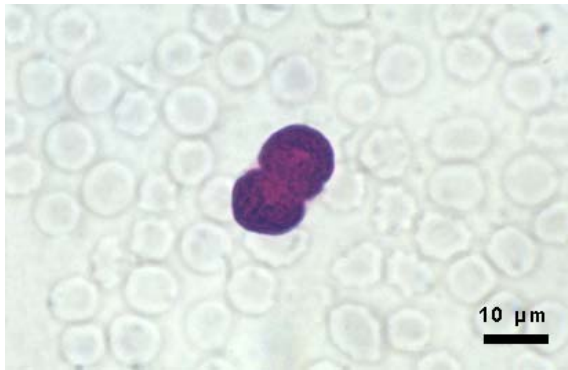


Abb. 21: Positive Reaktion des Proliferationsmarkers Ki-67 in sich teilenden Erythroblasten. SSL 42 cm.

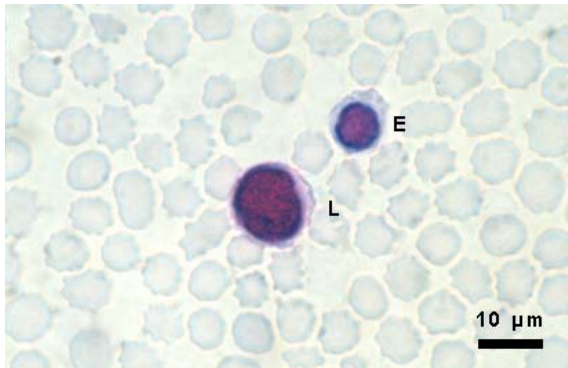


Abb. 22: Positive Reaktion des Proliferationsmarkers Ki-67 in einem Lymphozyten (L) und Erythroblasten (E). SSL 53 cm.

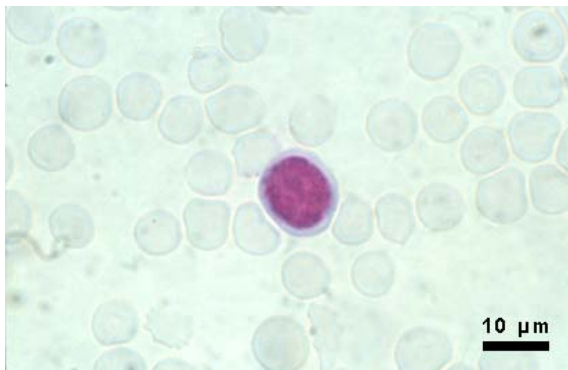


Abb. 23: Positive Reaktion des Proliferationsmarkers Ki-67 in einem großen Lymphozyten. SSL 18 cm.

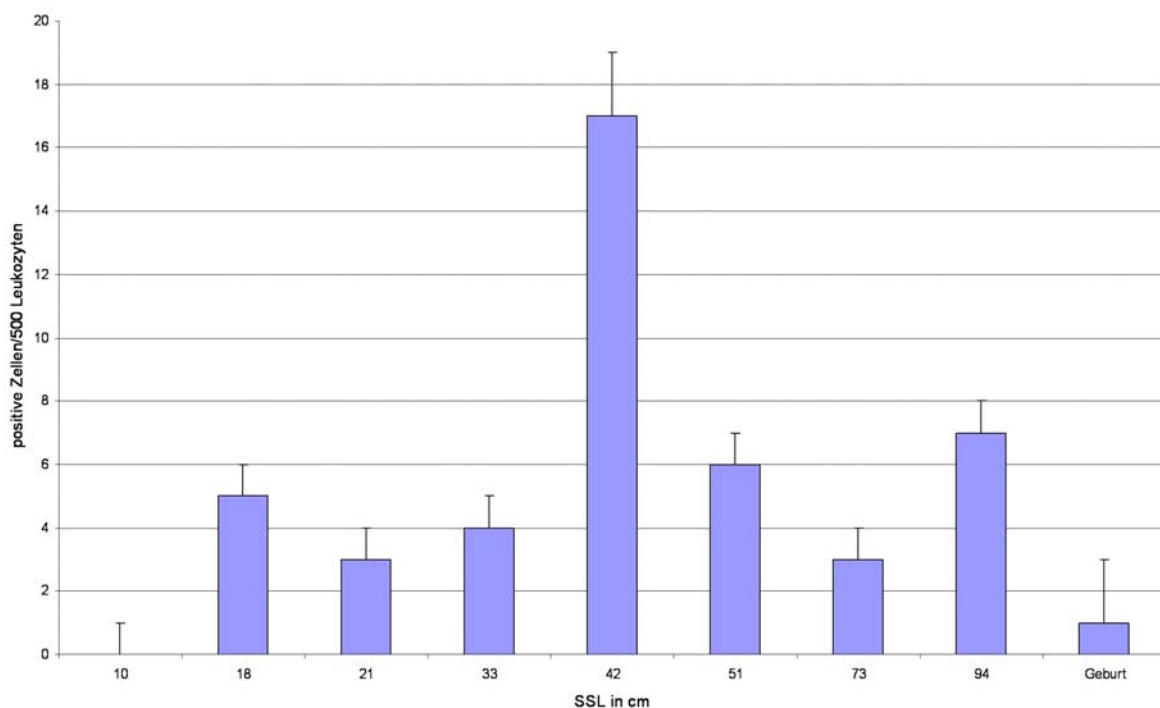
## 2.2 Immunhistochemischer Nachweis von CD68

Zur immunhistochemischen Untersuchung von Monozyten und Makrophagen im Nabelschnurblut des Rindes wurde der human-spezifische monoklonale CD68-Antikörper EBM-11 verwendet. Zur Antikörperdemaskierung wurden die Gewebeschnitte und die Blutausrüche mit 1%iger Protease angedaut. Bei dieser Protease-Konzentration kam es allerdings zur Zerstörung der Blutzellen im Ausstrich. Im Folgenden wurde mit 0,05%iger Protease vorbehandelt. Die Morphologie der Blutzellen war bei dieser Konzentration gut erhalten und die Stärke der Immunreaktion in den Gewebeschnitten wurde durch diese niedrigere Protease-Konzentration nicht beeinträchtigt. Ohne Protease-Vorbehandlung konnten nur noch eine schwache Reaktion in den Blutausrüchen und keine Reaktion mehr in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden.

In den Blutausstrichen reagierte der CD68 Antikörper stark mit mononukleären Zellen, die den Monozyten zugeordnet werden konnten. Die Farbreaktion fiel so stark aus, dass in vielen Zellen der Hämalaun-gegengefärbte Kern nicht mehr sichtbar war. Das Reaktionsmuster variierte je nach Zellart von einigen feinen Granula im Zytoplasma bis hin zu grob granulären Strukturen, die die gesamte Zelle mit einbezogen (Abb. 24 und 25). In der Probe der SSL 18 cm waren stark vakuolisierte MPS-Zelle vorhanden, deren Zytoplasma sich stark positiv bei Verwendung des CD68-Antikörpers färbte (Abb. 26).

Während der Gravidität veränderte sich der Gehalt an CD68<sup>+</sup> Zellen. In der kleinsten untersuchten SSL von 10 cm treten noch keine positiven Zellen auf. Ein Maximum an CD68<sup>+</sup> Zellen besteht bei 42 cm SSL. Der Gehalt fällt dann wieder bis zur Geburt ab. Der Verlauf ist in Diagramm 6 dargestellt.

In den Bouin-fixierten Paraffinschnitten der fetalen Rinderleber konnten trotz Vorbehandlung mit Protease in verschiedenen Verdünnungen (0,1%ig, 0,05%ig, ohne Protease) keine CD68<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden, obwohl im bovinen Lymphknoten, der als Positivkontrolle eingesetzt wurde, mit beiden Protease-Konzentrationen eine starke, spezifische Reaktion zu beobachten war. Die Negativkontrollen zeigten keine Immunfärbung.



Diagr. 6: Verlauf der CD68<sup>+</sup> Zellen während der Gravidität (SSL 10 cm bis Geburt).

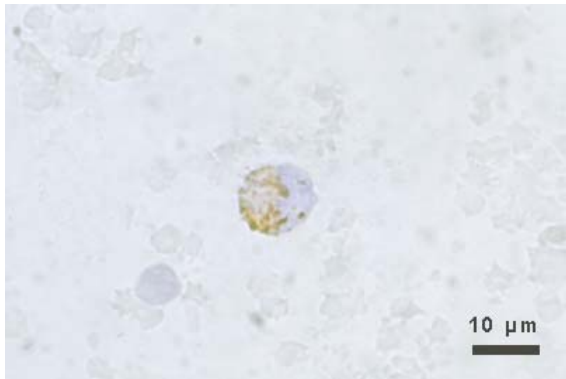


Abb. 24: CD68-positiver Monozyt. SSL 94 cm.

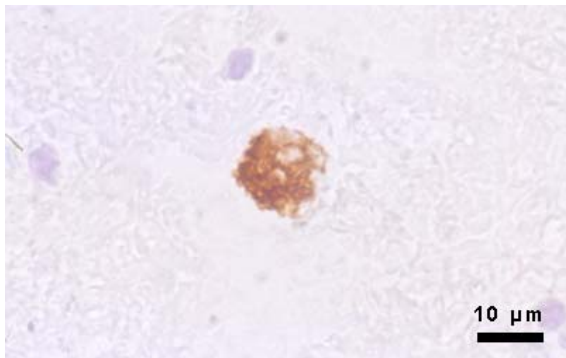


Abb. 25: Stark positiver Monozyt. Die Reaktion überdeckt den Kern. SSL 18 cm.

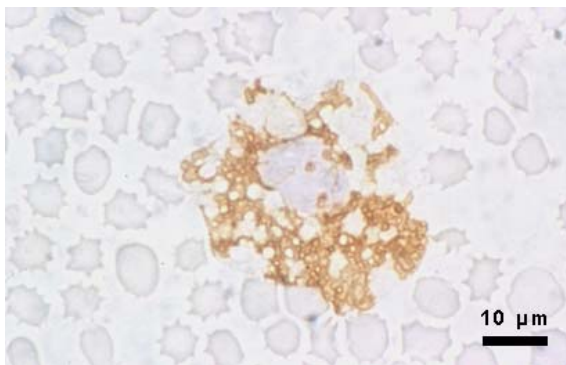


Abb. 26: CD68-positive MPS-Zelle mit stark vakuolisiertem Zytoplasma. SSL 18 cm.

### 2.3 Immunhistochemischer Nachweis von c-kit (C-19)

Zusätzlich zu den selber produzierten Dotterantikörpern gegen das bovine c-kit wurden immunhistochemische Untersuchungen mit dem polyklonalen anti-humanen c-kit-Antikörper C-19 durchgeführt, der an das C-terminale Ende des c-kit-Proteins bindet.

In den Blutausstrichen konnte eine zytoplasmatische Bindung dieses Antikörpers bei Lymphozyten und kernhaltigen Erythroblasten nachgewiesen werden. Die positiven lymphoiden Zellen wiesen stark variable Größen auf (Abb. 27). In den Thrombozyten kam es zu einem granulären Reaktionsmuster.

Bei Verwendung des humanen c-kit-Antikörpers an Gewebeschnitten der bovinen fetalen Leber konnte sowohl bei einer Verdünnung von 1:100, als auch von 1:200 keine Bindung an hämatopoietischen Zellen nachgewiesen werden. Die Reaktion in den Spinalganglien und dem Rückenmark fiel ebenfalls bei beiden Verdünnungen schwach aus. Im fetalen Hoden

(SSL 3,5, 13 und 36 cm) reagierte der Antikörper mit den sich entwickelnden Leydig-Zellen, wobei sich nur eine schwache, aber eindeutige Färbung dieser Zellen zeigte. Die zentral in den Hodentubuli gelegenen, primordialen Keimzellen verhielten sich negativ.

Die verwendeten Negativkontrollen zeigten keine Immunreaktion.

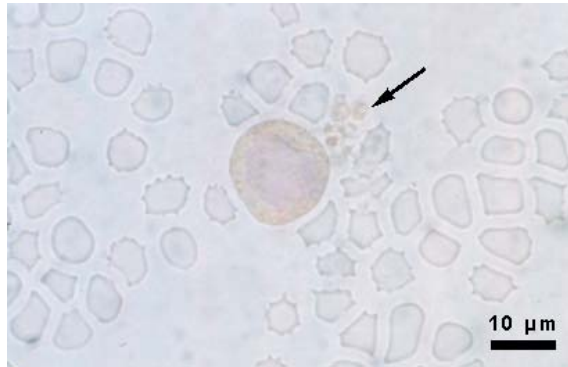


Abb. 27: Schwach c-kit-positive lymphoide Zelle.  
Positive Thrombozyten (→). SSL 18 cm.

### **3 Ergebnisse aus der Isolierung und Charakterisierung der polyklonalen anti-bovinen c-kit- und CD34-Antikörpern aus dem Eidotter**

#### **3.1 Gewinnung der Antikörper aus dem Dotter**

Die Immunisierung der Hühner mit den Antigen-PCSL- und Antigen-FIA-Lösungen zog keine adspektatorisch erkennbaren Beeinträchtigungen des Wohlbefindens oder der Gesundheit der Tiere nach sich. Auch bei Betrachtung der Brustmuskulatur in der Sektion waren keine entzündlichen Reaktionen oder Abszesse sichtbar. Die Fällung der Immunglobuline erfolgt durch Ammoniumsulfat-Dextran-Präzipitation und erbrachte IgG-Präparationen unterschiedlicher Konzentrationen. Die IgG-Konzentration in den Dottern vor der Immunisierung lag immer unter denen nach der letzten Boosterung. Zur weiteren Verarbeitung wurden Dotter verwendet, die in der 4. Woche nach der letzten Immunisierung der Legehennen gesammelt wurden, da in diesen Proben der IgG-Gehalt erfahrungsgemäß hoch ist. Der photometrisch bestimmte Gehalt an Immunglobulinen in den aufgereinigten polyklonalen Antikörperlösungen aus dem Dotter sowie die Werte vor der Immunisierung sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Die Charakterisierung der gewonnenen Antikörper erfolgte in Enzymimmunoassays.



Tab. 9: Extinktionswerte und IgG-Konzentrationen der aufgereinigten Dotter-Antikörper

Adjuvans	Proben		Extinktion	Konzentration in mg IgG/ml	Extinktion	Konzentration in mg IgG/ml
	Antigen	Dotter-Probe				
PCSL	CD34	1	1,59	11,36		
		2	1,91	13,64		
		3	0,49	3,5		
	c-kit	4	1,23	8,79		
		5	1,49	10,64		
		6	1,58	11,29	1,32	9,45
FIA	CD34	A	1,72	12,29		
		B	1,51	10,79	0,82	5,86
		C	1,73	12,36		
	c-kit	D	1,53	10,93	1,273	9,09
		E	1,28	9,14		
		F	1,87	13,36		

### 3.2 Charakterisierung der polyklonalen Dotterantikörper CD34 und c-kit im ELISA und Western Blot

Zur Spezifizierung der beiden Antikörper wurden ELISA-Tests und Western Blots durchgeführt. Beide Antikörper wurden in einem indirekten ELISA untersucht, in dem die Proteine aus der fetalen Leber (SSL 20 cm) an eine 96-Loch-ELISA-Platte gebunden wurden. Die Bindung der Antikörper wurde durch Verwendung von HRP-markiertem anti-chicken Antikörper mit TMB sichtbar gemacht und über Extinktionsmessung quantifiziert. In Vorversuchen wurde eine optimale Verdünnung der Antikörper bestimmt. Ab einer Verdünnungsstufe von 1:4000 konnten auswertbare Ergebnisse erzielt werden.

#### 3.2.1 Ergebnisse aus ELISA und Western Blot für CD34

Im ELISA konnte für die drei hergestellten anti-bovinen CD34 Antikörper bei keiner der untersuchten Verdünnungen ein Titer bestimmt werden. Bei Verwendung der Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 blieben die Extinktionswerte auf einem kontinuierlichen Niveau von ca. 1 bei Antikörper B und bei ca. 2 für Antikörper C. Bei weiterer Verdünnung des Antikörpers auf 1:4000 bewegten sich die Extinktionswerte für den Antikörper B zwischen 0,6 und 0,2, für den Antikörper C zwischen 0,8 und 0,3. Da bei keiner der eingesetzten Antikörperverdünnung eine Abschwächung des Extinktionssignals entsprechend der Leberhomogenat-Verdünnungsreihe zu beobachten war, kann von einer unspezifischen Reaktion dieser Antikörper gegenüber dem eingesetzten Probenmaterial ausgegangen werden. Die Negativkontrollen zeigten keine Bindung der Antikörper.

Im Western Blot konnte für keine der eingesetzten CD34-Antikörperpräparationen eine spezifische Reaktion nachgewiesen werden, obwohl nach dem Blotten in der Poinceau-Färbung Banden sichtbar waren.

### 3.2.2 Ergebnisse aus ELISA und Western Blot für c-kit

Die anti-bovinen c-kit Antikörper erbrachten in der Verdünnung 1:4000 kontinuierlich sinkende Extinktionswerte, so dass für die einzelnen Antikörper Titer bestimmt werden konnten. Die Titer für die drei verschiedenen Antikörper sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10: Titer für die anti-bovinen c-kit Antikörper D, E und F

Antikörper	Titer
c-kit D	1:3850
c-kit E	1:1144
c-kit F	1:1446

Alle drei Antikörperpräparationen reagierten spezifisch mit entsprechenden Proteinen aus dem Leberhomogenat. Da die Antikörperpräparation D den höchsten Titer zeigt, besitzt dieser Antikörper folglich die höchste Sensitivität.

Die Negativkontrollen zeigten bei allen drei c-kit-Antikörpern keine Reaktion.

Von den drei c-kit-Antikörperpräparationen wurde der Antikörper D im Western Blot eingesetzt. Auf dem ExcelGel-Gel im Multiphor II-System mit einem Auftrennungsbereich bis 180 kDa konnte eine breite Bande im Bereich zwischen 15 und 30 kDa festgestellt werden. Bei Verwendung des PhastGel-Gels konnte diese Bande genauer detektiert werden. Hierbei zeigte sich dann eine Bindung des Antikörpers D an Proteine mit den Molekulargewichten 15 kDa, 19 kDa und 35 kDa (Abb. 28).

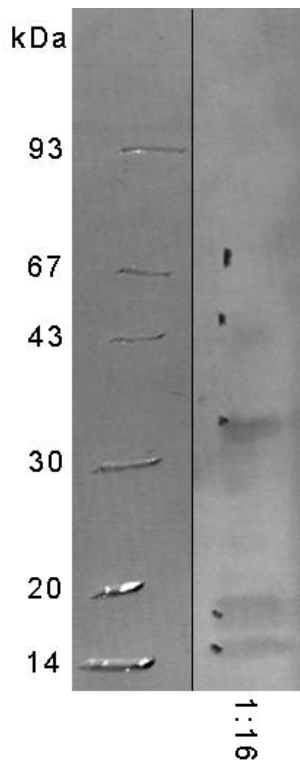


Abb. 28: Western Blot. c-kit D, Leberhomogenat 1:16 verdünnt, Antikörper 1:200 verdünnt. Eichproteine 14-93 kDa. Banden sichtbar bei ca. 15 kDa, 19 kDa und 35 kDa.

### 3.3 Immunhistochemischer Nachweis von CD34 und c-kit unter Verwendung der Dotterantikörpern

Die sechs Antikörper aus der FIA-Gruppe wurden in der Immunhistologie und Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Blutausstriche wurden für die Immunhistologie und die Immunfluoreszenz in Methanol-Aceton fixiert. Die Gewebeschnitte wurden entweder in Bouin-Lösung oder Methanol-Eisessig fixiert. In einem ersten Schritt wurde die Immunhistologie ohne Vorbehandlung der Blutausstriche und Gewebeschnitte durchgeführt. Die Proben aus dem Hoden wurden im Folgenden mit der Mikrowelle vorbehandelt. Entsprechend der Gewebespezifität der beiden Antikörper wurden für CD34 Blutausstriche und Gewebeschnitte der fetalen Leber und für c-kit Blutausstriche, ganze Feten und fetaler und adulter Hoden verwendet. In Tabelle 11 sind die verschiedenen Gewebe aufgelistet, die in der Immunhistologie verwendet worden sind.

Zur Austestung der optimalen Antikörperkonzentration wurden in einem Vorversuch verschiedene Antikörperverdünnungen von 1:50 bis 1:800 verwendet. Hierbei konnte je nach verwendetem Antikörper eine optimale Konzentration von 1:200 bis 1:800 ermittelt werden (detaillierte Angaben siehe Tabelle 12 und 13).

Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Gewebe zur immunhistochemischen Charakterisierung der polyklonalen Dotterantikörper CD34 und c-kit

Gewebe	SSL in cm
Fetus	2,5 und 4,4
fetale Leber	2,5 und 4,4
Hoden	3,3, 13 und adult
Blutausstriche	10, 18, 21, 33, 42, 51, 73, 93 und Geburt

### 3.3.1 Immunhistochemischer Nachweis von CD34

In der fetalen Leber und in den Blutausstrichen konnte eine spezifische Reaktion der CD34 Antikörper beobachtet werden. In den Gewebeschnitten der fetalen Leber der SSL 2,5 und 4,4 cm reagierten alle drei CD34 Antikörper mit kernhaltigen Blutzellen sowohl im Leberparenchym, als auch in den Sinusoiden (Abb. 29). Die positiven Zellen zeigten eine mäßige Reaktion in Zytoplasma. Sie besitzen eine ovale Zellform und einen runden, zentral gelegenen Zellkern. Zusätzlich trat eine Bindung an kernlose Erythrozyten auf. Auch die Blutzellen in den Gefäßen der Bauchwand des Fetus der SSL 2,5 cm reagierten mit den verwendeten Antikörpern (Abb. 30), wobei sich ebenfalls kernhaltige Blutzellen und Erythrozyten anfärbten. Eine leichte Immunfärbung war in den Hepatozyten sowie in den Skelettmuskelzellen und Nervenfasern nachweisbar.

In den Blutausstrichen konnte unabhängig von der SSL eine starke Bindung der Antikörper an Thrombozyten sowie an die Granula der neutrophilen Granulozyten (Abb.31) und deren Vorläufer nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu dem Reaktionsmuster in der fetalen Leber waren die Erythrozyten im Blutausstrich negativ. Die stärkste Reaktion der oben beschriebenen Strukturen erfolgte bei Verwendung des Antikörpers CD34 B.

Die Leerproben für die CD34-Antikörper, die vor der ersten Immunisierung der Legehennen gewonnen wurden, zeigten beim Einsatz in der Immunhistologie eine schwache, in allen Gewebearten homogen auftretende unspezifische Färbung. In den Negativkontrollen (Feten der SSL 2,5 cm und Blutausstriche) war keine Immunreaktion zu beobachten.

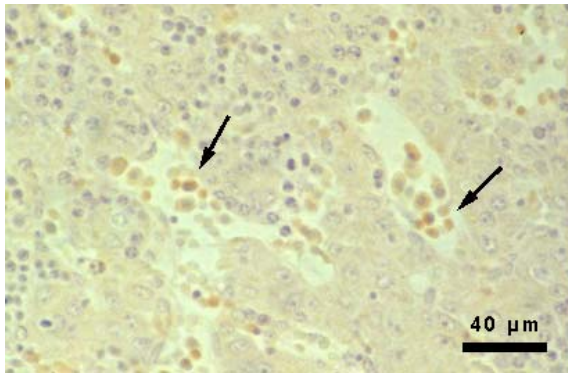


Abb. 29: Positive Blutzellen (Pfeil) in der Leber eines Fetus. SSL 2,5 cm. CD34 B, Verd. 1:800.

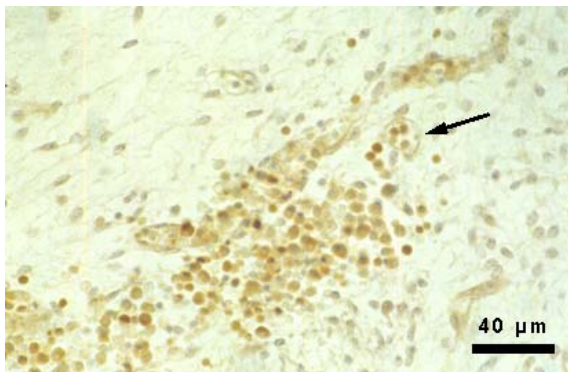


Abb. 30: Positive Blutzellen (Pfeil) in einem Gefäß der Bauchwand. SSL 2,5 cm, CD34 C, Verd. 1:400.

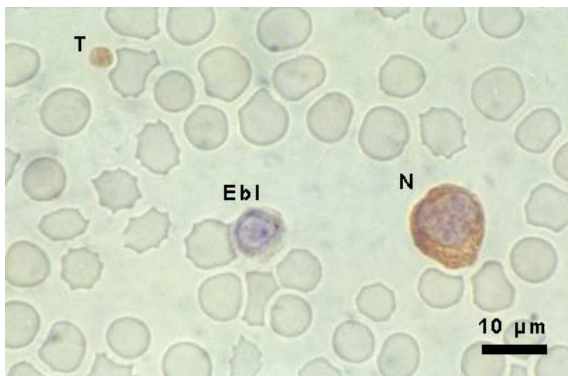


Abb. 31: CD34-positiver neutrophiler Granulozyt (N), CD34-positiver Thrombozyt (T) und ein negativer Erythroblast (Ebl). SSL 10 cm. CD34 A, Verd. 1:200.

Tab. 12: Verteilung von immunreaktivem CD34 im fetalen bovinen Gewebe, Ergebnisse der ABC-Methode

Antikörper	Verd.	Fetale Leber , SSL 2,5 und 4,4 cm	Nabelblut
CD34 A	1:100	n. u.	n. u.
	1:200	Kernhaltige Blutzellen ++ Erythrozyten +++ Endothel + Hepatozyten+/- Muskelzellen +/-	Neutrophile Granulozyten + Granulozyten-Vorläufer + Thrombozyten +++
	1:400	Kernhaltige Blutzellen ++ Erythrozyten +++	n. u.
	1:800	n. u.	n. u.
CD34 B	1:100	n. u.	n. u.
	1:200	Kernhaltige Blutzellen ++ Erythrozyten +++ Hepatozyten+/- Muskelzellen +/- Nervenfaser +/-	Neutrophile Granulozyten + Granulozyten-VL + Thrombozyten +++
	1:400	Kernhaltige Blutzellen ++ Erythrozyten +++	Neutrophile Granulozyten + Granulozyten-Vorläufer + Thrombozyten +++
	1:800	–	n. u.
CD34 C	1:100	unspezif.	n. u.
	1:200	Kernhaltige Blutzellen ++ Erythrozyten +++ Endothel + Hepatozyten+/- Muskelzellen +/- Nervenfaser +/-	n. a.
	1:400	Kernhaltige Blutzellen ++ Erythrozyten +++	n. a.
	1:800	–	n. u.

–: negativ, +: schwach positiv, ++: mittelgradig positiv, +++: stark positiv, n.u. nicht untersucht, n.a. nicht auswertbar, unspezif. unspezifisch, neg. negativ.

### 3.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von c-kit

Alle drei Antikörper gegen das bovine c-kit reagierten spezifisch mit verschiedenen Strukturen in Feten. Im Fetus der SSL 4,4 cm banden die c-kit Antikörper an die Zilien des Bronchialepithels (Abb. 32), an die Ependymzellen des Rückenmarkskanals und an Nervenzellkörper im Rückenmark und in den Spinalganglien (Abb. 33). Des Weiteren trat eine positive Reaktion im Zytoplasma der Osteoblasten auf (Abb. 34). Herzmuskulatur und Skelettmuskulatur färbten sich sehr schwach an. In der Leber des 2,5 cm großen Fetus und in den peripheren Gefäßen reagierten sowohl kernhaltige Blutzellen als auch Erythrozyten mit den drei verwendeten c-kit Antikörpern (Abb. 35). In den Blutaussstrichen zeigten die Antikörper wiederum unabhängig von der Gestation eine deutliche Immunreaktion mit dem Zytoplasma der Lymphozyten und lymphoiden Zellen (Abb. 36). Außerdem reagierte das Zytoplasma der kernhaltigen Erythrozytenvorstufen und der neutrophilen Granulozyten

schwach sowie die Thrombozyten stark positiv. Am stärksten fiel die Reaktion bei Verwendung des Antikörpers D aus.

Im fetalen und adulten Hoden konnte, trotz Vorbehandlung in der Mikrowelle und Verdau mit 0,05%iger Protease keine Reaktion der Antikörper beobachtet werden.

Die Negativkontrollen sowie die Leerproben der Dotterantikörper für c-kit zeigten keine bzw. eine stark abgeschwächte Immunfärbung.

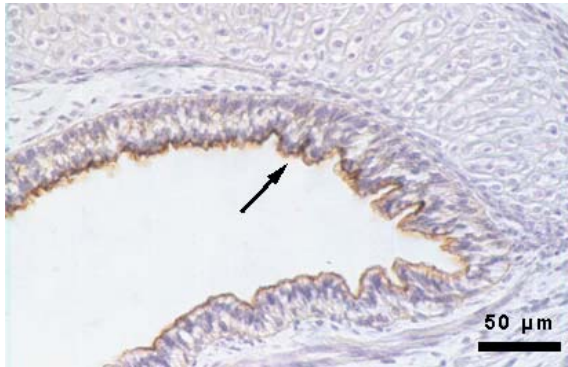


Abb. 32: Positive Reaktion der Oberfläche des Bronchialepithels (→). SSL 4,4 cm, c-kit D, Verd. 1:200.

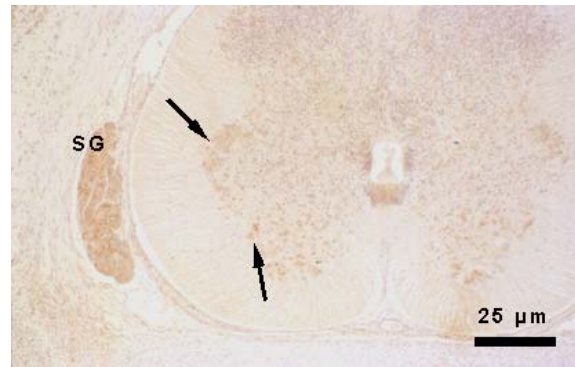


Abb. 33: Verteilung der c-kit-positiven Zellen in den Spinalganglien (SG) und im Rückenmark (→). SSL. 4,4 cm, c-kit F, Verd. 1:800.

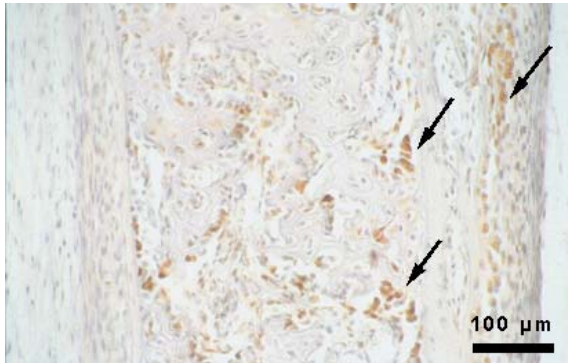


Abb. 34: Positive Reaktion der Osteoblasten (→) in den neu entstehenden Knochen. SSL 4,4 cm, c-kit D, Verd. 1:200.

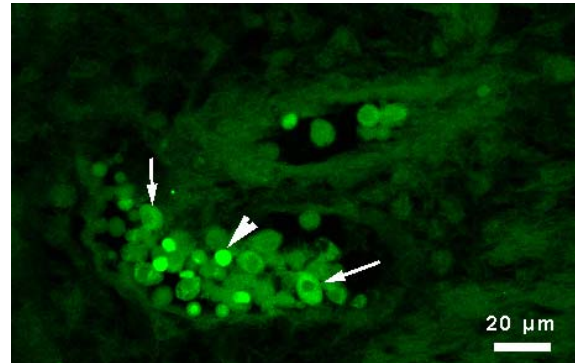


Abb. 35: Ein kleines Gefäß in der Bauchwand mit kernhaltigen (→) und kernlosen, (▶) positiven Blutzellen. SSL 2,5 cm, c-kit D, Verd. 1:800.

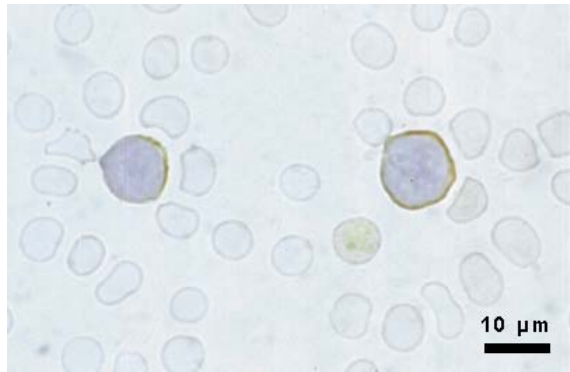


Abb. 36: Zwei lymphoide Zellen mit deutlich positivem Zytoplasma. SSL 51 cm. c-kit D, Verd. 1:200.

Tab. 13: Verteilung von immunreaktivem c-kit im fetalen bovinen Gewebe, Ergebnisse der ABC-Methode

Antikörper	Verd.	Fetus, SSL 2,5 und 4,4 cm	Fetale Leber SSL 2,5 und 4,4 cm	Fet. und ad. Hoden	Nabelblut
c-kit D	1:100	unspezif.	n. u.	unspezif.	n. u.
	1:200	Epithel der Bronchien +++ Ependym ++ Neuronen des RM ++ Spinalganglien ++ ZP der Osteoblasten +++ Muskelzellen +/-	Kernhaltige Blutzellen ++ Erythrozyten +++ Hepatozyten +	unspezif.	Lymphozyten ++ Neutro. Granulozyten + Thrombozyten +++
	1:400	Epithel der Bronchien ++	n. u.	unspezif.	n. u.
	1:800	–	n. u.	unspezif.	n. u.
c-kit E	1:100	unspezif.	n. u.	unspezif.	n. u.
	1:200	Epithel der Bronchien ++ Neuronen des RM ++ Spinalganglien ++ Muskelzellen +/-	Kernhaltige Blutzellen ++ Erythrozyten +++ Hepatozyten +	unspezif.	Lymphozyten ++ Neutro. Granulozyten + Thrombozyten +++
	1:400	Epithel der Bronchien ++ Neuronen des RM + Spinalganglien +	n. u.	unspezif.	n. u.
	1:800	–	n. u.	unspezif.	n. u.
c-kit F	1:100	unspezif.	n. u.	unspezif.	n. u.
	1:200	unspezif.	n. u.	unspezif.	n. u.
	1:400	Epithel der Bronchien + Neuronen des RM + Spinalganglien +++ ZP der Osteoblasten +++ Muskelzellen +/-	Kernhaltige Blutzellen ++ Erythrozyten +++ Hepatozyten +	unspezif.	Lymphozyten ++ Neutro. Granulozyten + Thrombozyten +++
	1:800	Epithel der Bronchien + Neuronen des RM ++ Spinalganglien +++ ZP der Osteoblasten ++	n. u.	unspezif.	n. u.

–: negativ, +: schwach positiv, ++: mittelgradig positiv, +++: stark positiv, n.u. nicht untersucht, n.a. nicht auswertbar, unspezif. unspezifisch, neg. negativ, ZP: Zytoplasma.



## 4 Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Die besten Ergebnisse in der Elektronenmikroskopie wurden mit der Fixierung in Karnovsky-Lösung erzielt. Hierbei erwies es sich als vorteilhaft, das Pellet nach einstündiger Fixation von dem noch nicht fixierten Restblut zu trennen, da zu diesem Zeitpunkt nur ein minimaler Saum an Erythrozyten anhaftete und das Zellpellet fast ausschließlich aus Leukozyten und Thrombozyten bestand.

Die Morphologie der Blutzellen war in allen Proben gut erhalten. In zwei Proben des Nabelschnurblutes neugeborener Kälber wiesen allerdings viele Zellen apoptotische Veränderungen auf, die möglicherweise auf den langen Zeitraum bis zur Verarbeitung zurück zu führen (ca. 24 h) sind.

Im Semidünnschnitt wurden die Proben auf ihren Leukozytengehalt hin untersucht. Die Leukozyten waren in allen Proben in einem mehr oder minder breiten Band angeordnet, dem sich nach oben die Thrombozytenschicht und nach unten hin der Erythrozytensaum anschlossen. Kernhaltige Erythrozyten, die in großer Anzahl in fetalen Blutproben vorhanden waren, verteilten sich im Leukozytensaum (Abb. 37).

Auf Grund der geringen Größe konnten bei Feten unter 10 cm SSL kaum ausreichende Blutmengen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung gewonnen werden. Daher wurde bei einem Fetus mit der SSL 3,4 cm die kleineren Gefäße der Wharton-Sulze im Nabelstrang untersucht, die eine Vielzahl an Blutzellen aufwiesen.

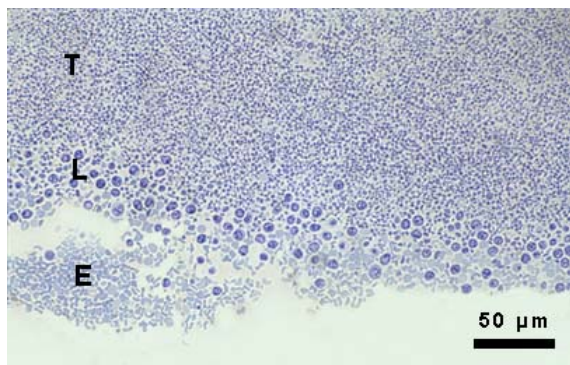


Abb. 37: Semidünnschnitt einer Karnovsky-fixierten Probe aus dem Nabelschnurblut. Schichtung in Thrombozyten (T), Leukozyten (L) und Erythrozyten (E). Neugeborenes Tier.

### 4.1 Erythrozyten

In der Probe der SSL 3,4 cm aus den Gefäßen der Wharton-Sulze sind neben vereinzelt Thrombozyten fast ausschließlich Vorstufen der Erythrozyten vorhanden.

Die Erythroblasten weisen eine vielgestaltige Form und einen runden Zellkern auf. Neben den kernhaltigen Erythroblasten kommen auch kernlose Erythrozyten vor (Abb. 38).

In den Proben aus dem Nabelschnurblut der SSL 29 cm bis 53 cm treten ebenfalls zahlreiche kernhaltige Erythrozyten-Vorstufen auf, die dort allerdings rund sind.

Der Kern der verschiedenen Zellen ist entsprechend dem Reifungsstadium unterschiedlich stark kondensiert. Die wenig stark kondensierten Zellkerne besitzen ein feinkörniges Chromatin und meist einen undeutlich sichtbaren Nukleolus. Bei Kondensation kommt es beginnend in der Peripherie zunehmend zur Verklumpung des Chromatins, zusätzlich nimmt die Größe des Kerns ab.

In der Probe der SSL 3,4 cm konnten Proerythroblasten beobachtet werden, die einen relativ großen Zellkern mit feinkörnigem Euchromatin und Nukleoli besitzen. An der Kernmembran kommen deutliche Kernporen vor (Abb. 39).

Die basophilen Erythroblasten (Abb. 40) zeigen eine periphere Kondensation des Chromatins. Der hohe Ribosomengehalt im Zytoplasma dieser Zellen ist auffallend. Außerdem treten rundliche Mitochondrien vom Cristae-Typ sowie vereinzelt rER mit kleinen, manchmal länglichen Vesikeln auf. Ein Golgi-Apparat ist gelegentlich zu beobachten, in dessen Umgebung sich bisweilen auch Zentriolen befinden. Im Zytoplasma sind zudem einzelne kleine Vakuolen sichtbar. In den Proben der SSL 3,4 cm befinden sich im Zytoplasma zusätzlich Anhäufungen von elektronendichten, granulären oder homogenen Strukturen. In den folgenden Stadien der polychromatischen und orthochromatischen Erythroblasten kommt es zur weiteren Kondensation des Kerns und zur Abnahme des Ribosomen- und des Organellengehalts. Diese beiden Zellarten besitzen runde Mitochondrien und meist nur noch vereinzelt rER. Das Zytoplasma enthält außerdem kleine Vesikel und Anhäufungen von stark elektronendichtem granulären Material, das entweder ohne Membrangrenzung frei im Zytoplasma liegt oder sich vereinzelt auch in Granula befindet.

Der Zellkern wird im Stadium der orthochromatischen Erythroblasten pyknotisch. Er wird an den Rand der Zelle verlagert und aus der Zelle ausgeschleust (Abb. 41). Anfangs bleibt er noch über Zytoplasmabrücken mit der Zelle verbunden (Abb. 42). Der ausgeschleuste „nackte“ Kern wird von einem sehr schmalen Band von Zytoplasma umgeben (Abb. 43). Diese Kerne werden von Zellen des MPS (Mononukleäres Phagozytose System) phagozytiert (siehe unten).

Im Zytoplasma der Retikulozyten treten nur noch wenige Organellen, wie Mitochondrien und rER auf. Die Mitochondrien sind oft sehr klein und kompakt, wobei die Cristae kaum noch erkennbar sind. Immer wieder kann die Exozytose von membran- oder vesikel-ähnlichen Strukturen beobachtet werden. In diesen Zellen sind auch Pinozytosevesikel und „pits“ an der Oberfläche vorhanden (Abb. 44).

In den typisch geformten bikonkaven Erythrozyten sind keine Organellen mehr vorhanden. Sowohl im Nabelschnurblut von Feten, als auch von neugeborenen Kälbern treten in den Erythrozyten Anhäufungen von elektronendichtem granulären Material auf, das nicht membranumgrenzt ist. Im Nabelschnurblut neugeborener Kälbern kommen Erythrozyten vor, die einzelne große elektronendurchlässige Vakuolen aufweisen, die sich teilweise an der Zelloberfläche nach außen öffnen (Abb. 45).

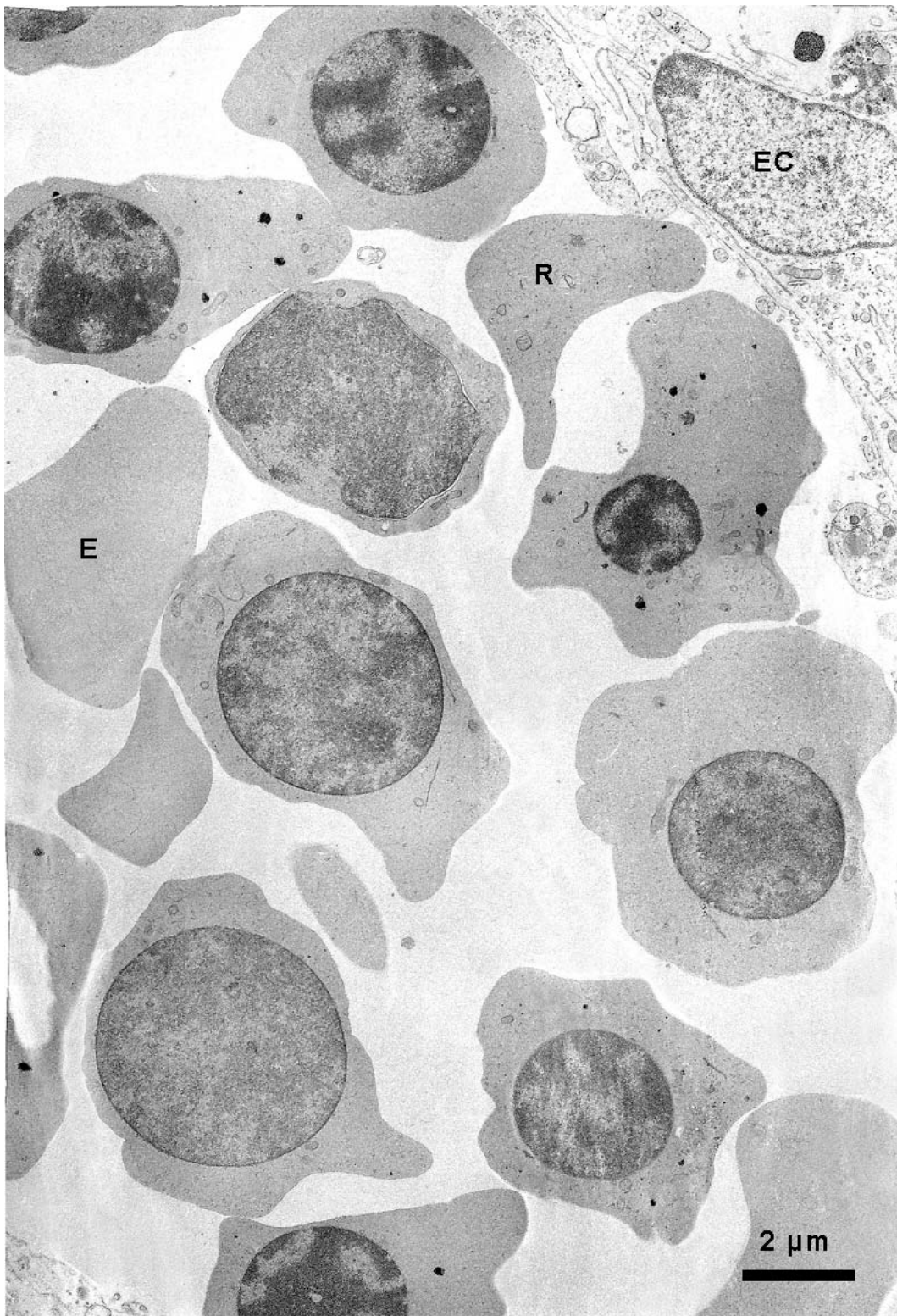


Abb. 38: Ausschnitt aus einem Gefäß aus der Wharton Sulze mit einer Endothelzelle (EC). Im Gefäß befinden sich reife Erythrozyten (E), Retikulozyten (R) sowie verschiedene kernhaltige Vorläuferstadien der Erythrozyten. SSL 3,4 cm.

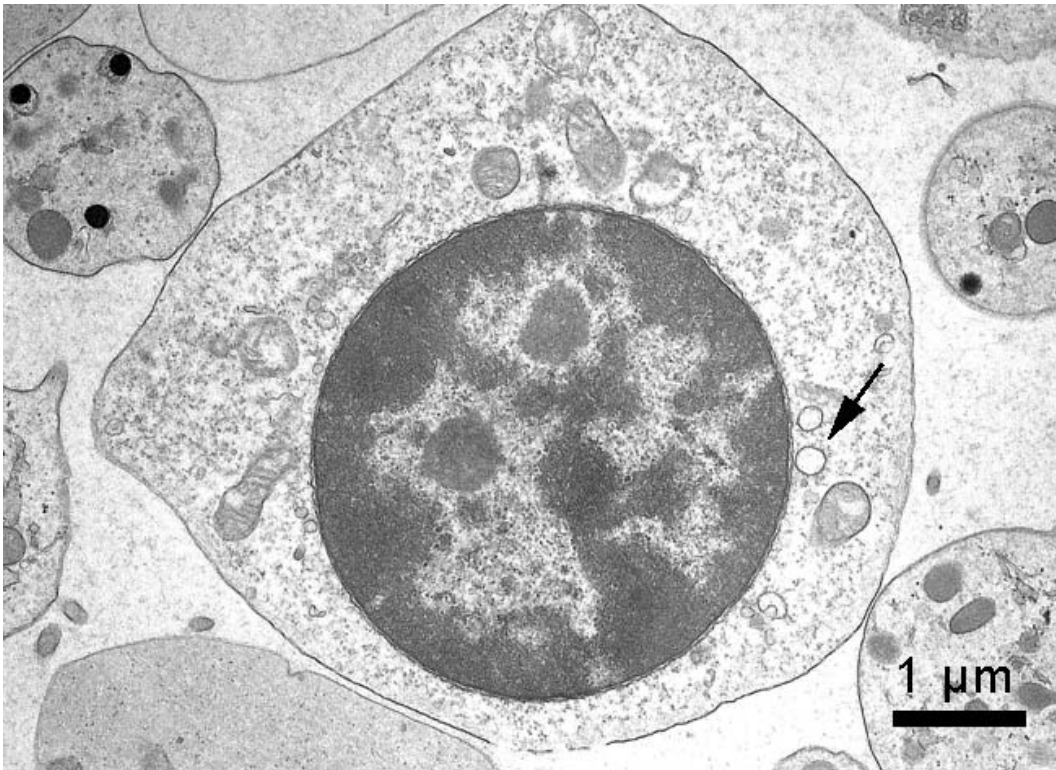


Abb. 39: Basophiler Erythroblast mit ribosomenreichem Zytoplasma und kleinen elektronendurchlässigen Vakuolen (→) im Zytoplasma. SSL 29 cm.

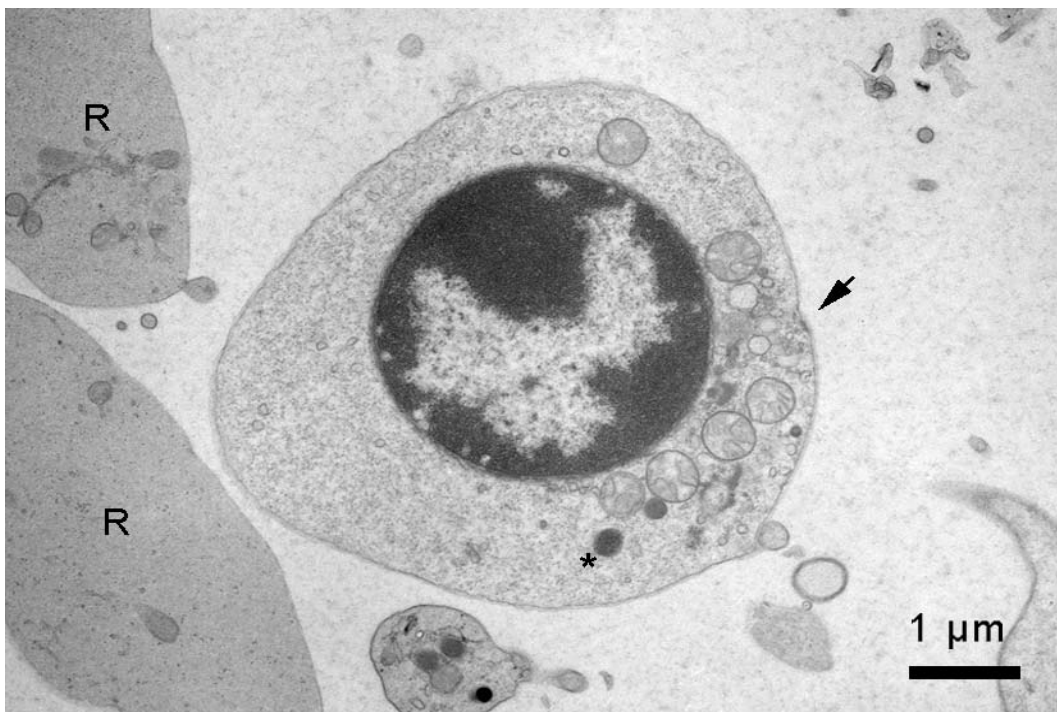


Abb. 40: Polychromatischer Erythroblast. Im Zytoplasma befinden sich Pinozytose-Vesikeln (→) und ferritinhaltige Granula (\*). Kondensation des Kerns von der Peripherie aus. SSL 42 cm.

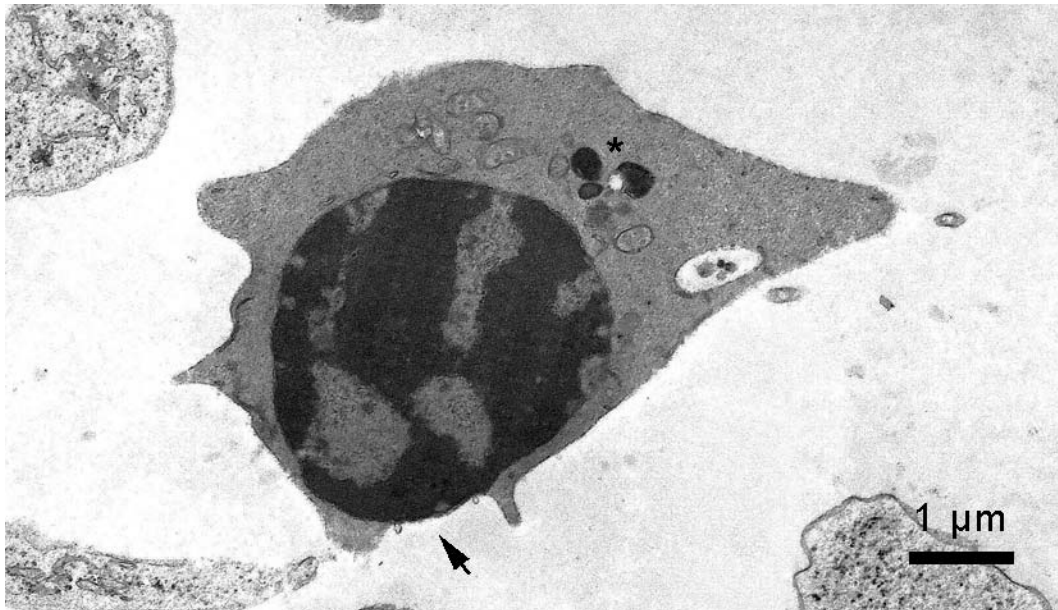


Abb. 41: Orthochromatischer Erythroblast mit marginalisiertem pyknotischen Zellkern und beginnender Kernexpulsion (→), zunehmende Elektronendicht des Zytoplasma durch Hämoglobineinlagerung, ferritinhaltige Granula (\*) und kleine undeutliche Mitochondrien. SSL 53 cm.

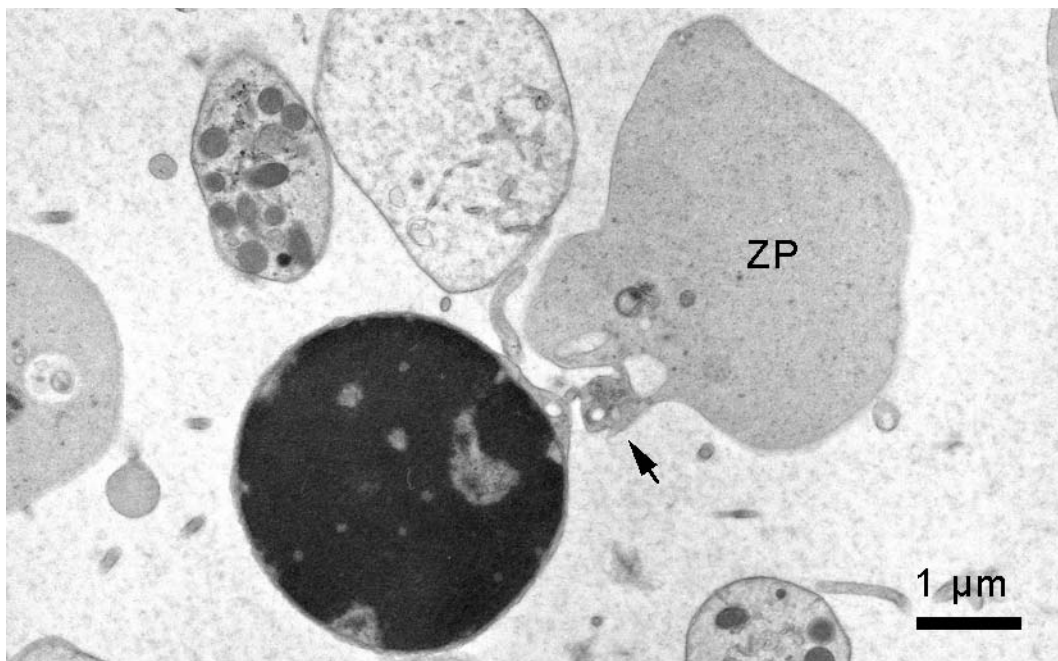


Abb. 42: Kernexpulsion in einem orthochromatischen Erythroblasten, noch bestehende Zytoplasmabrücke (→) zwischen dem pyknotischen Zellkern und dem Zytoplasma (ZP). SSL 42 cm.



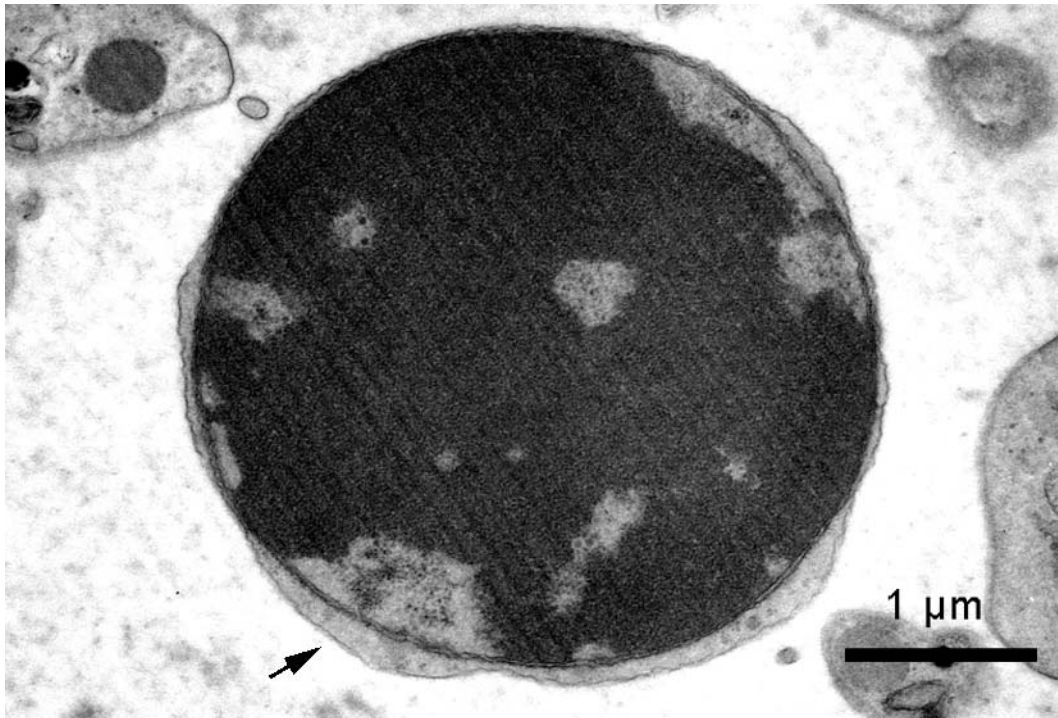


Abb. 43: Ausgeschleuster „nackter“ pyknotischer Zellkern eines Erythroblasten, das Zytoplasma bildet einen Saum um den Kern (→). SSL 42 cm.

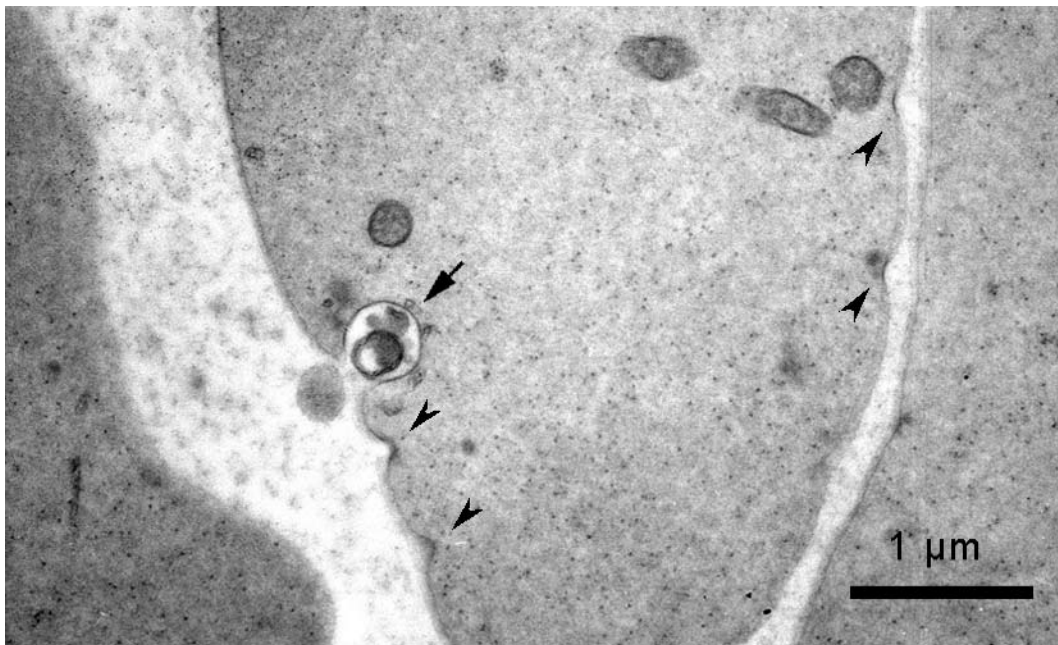


Abb. 44: Retikulozyt mit Mitochondrienresten. Exozytose von Organellenresten (→) und „pits“ (▶) an der Zelloberfläche. SSL 42 cm.

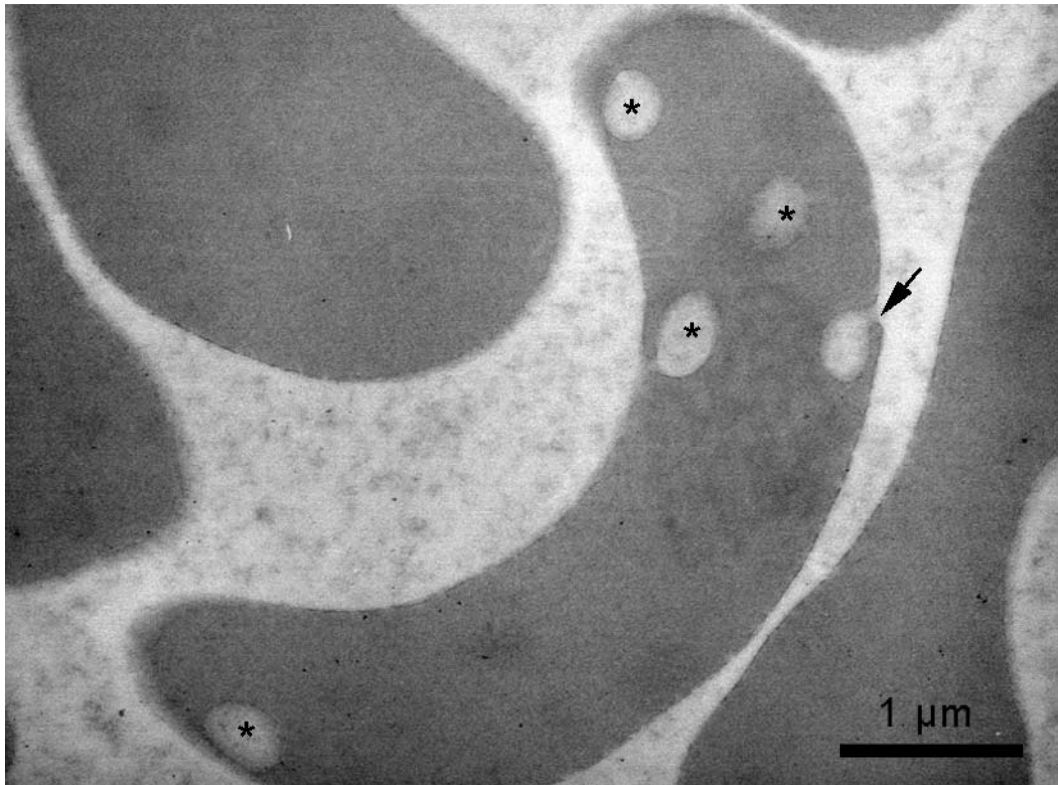


Abb. 45: Reifer Erythrozyt mit intrazytoplasmatischen Vakuolen (\*), eine davon besitzt eine Öffnung an der Oberfläche (→). Neugeborenes Tier.

## 4.2 Granulozyten

### 4.2.1 Neutrophile Granulozyten

Die Zellen der Granulopoiese wurden mit Ausnahme der SSL 3,4 cm in allen Proben gefunden. Die meisten Zellen der Granulozytenreihe sind rund, wobei speziell bei den reifen Granulozyten auch längliche Formen auftreten können. Ultrastrukturell konnten keine Zellen den Myeloblasten und nur wenige Zellen den Promyelozyten (Abb. 46) zugeordnet werden. Promyelozyten besitzen hin und wieder kleine dünne Zytoplasmaausläufer. Der Zellkern besitzt eine rund, manchmal auch bohnenförmige Form und zeichnet sich durch seinen hohen Gehalt an Euchromatin aus. Im Zytoplasma befinden sich längliche Anschnitte des rauen endoplasmatischen Retikulums, kleine rundliche Mitochondrien vom Cristae-Typ sowie einige kleine runde bis längliche elektronendichte Granula, die den azurophilen Granula entsprechen. Der rundliche leicht gebogene Kern der Myelozyten ist stark euchromatisch, allerdings lagert sich peripher unter der Kernmembran aggregiertes Heterochromatin an. In Myelozyten ist ein deutlicher Golgi-Apparat sichtbar, in dessen Umgebung sich einige unterschiedlich große und elektronendichte runde Granula anordnen. Im restlichen



Zytoplasma sind kaum Granula vorhanden. Zusätzlich treten ovale Mitochondrien, längliches rER und einige Ribosomen auf (Abb. 47 und 48).

Bei den weiter entwickelten Stadien der Metamyelozyten und stabkernigen Granulozyten (Abb. 49) besitzt der Kern eine U-Form. Das Heterochromatin befindet sich unter der Kernmembran und ordnet sich kondensiert in kleinen Blöcken im Nukleoplasma an. Im Zytoplasma kommen charakteristische Granula vor. Morphologisch sind kleinere elektronendichtere Granula von etwas größeren und helleren Granula zu unterscheiden. Alle Granula sind membranbegrenzt und länglich bis rund. Eine genauere Einteilung der Granula anhand der Morphologie war nicht möglich. Vereinzelt kommen kleine Mitochondrien und rER im Zytoplasma vor. Viele Zellen besitzen einen kleinen Golgi-Apparat, in dessen Nachbarschaft sich selten auch Zentriolen befinden.

Die reifen neutrophilen Granulozyten (Abb. 50 bis 52) sind runde oder längliche Zellen mit unterschiedlich langen Zytoplasmaausläufern, die manchmal brückenartige Bögen formen. Der Kern besteht je nach Segmentierungsgrad aus zwei bis vier Kernsegmenten. In reifen neutrophilen Granulozyten ist der Kern stark heterochromatisch. Die Granula entsprechen denen der stabkernigen Granulozyten. Daneben treten Vakuolen auf, die die gleiche Größe wie die Granula besitzen, dabei aber einen elektronendurchlässigen Inhalt aufweisen.

Im Zytoplasma sind vereinzelte Glykogen-Partikel zu finden, die sich auch in kleinen Gruppen zusammenlagern können (Abb. 51). Zu einer Anhäufung von Glykogen kommt es an membranartigen Strukturen, die meist vom Kern ausgehen (Abb. 52).

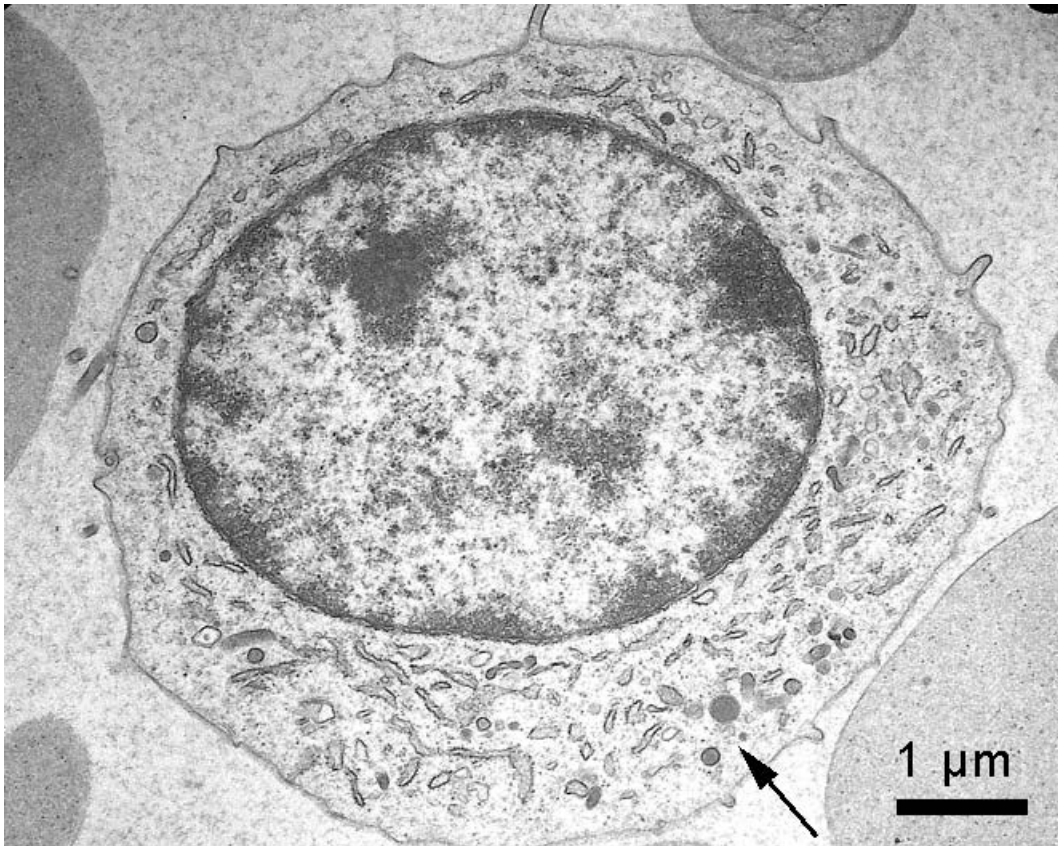


Abb. 46: Promyelozyt mit euchromatischem Kern, im Zytoplasma befindet sich längliches rER und kleine elektronendichte Granula (→). SSL 42 cm.

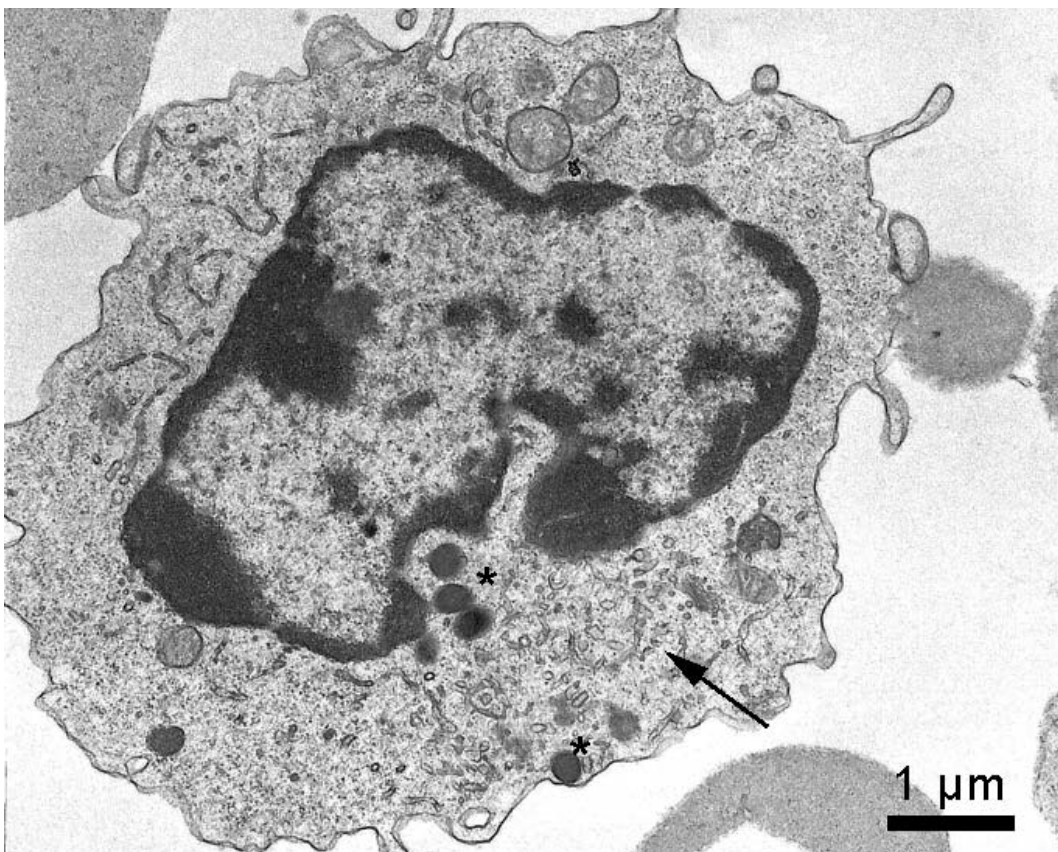


Abb. 47: Neutrophiler Myelozyt mit Primärgranula (\*) um den Golgi-Apparat (→). SSL 53 cm.

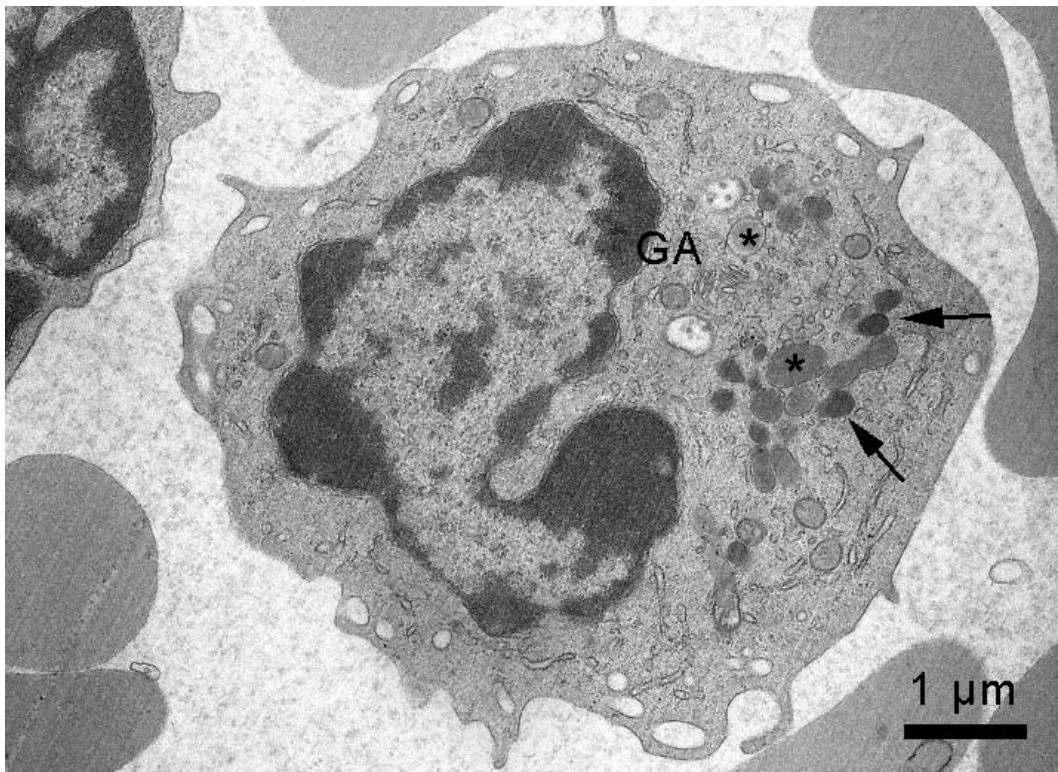


Abb. 48: Neutrophiler Myelozyt mit Granulabildung im Bereich des Golgi-Apparates (GA). Hellere (\*) und dunklere (→) Granula sind zu erkennen. Neugeborenes Tier.

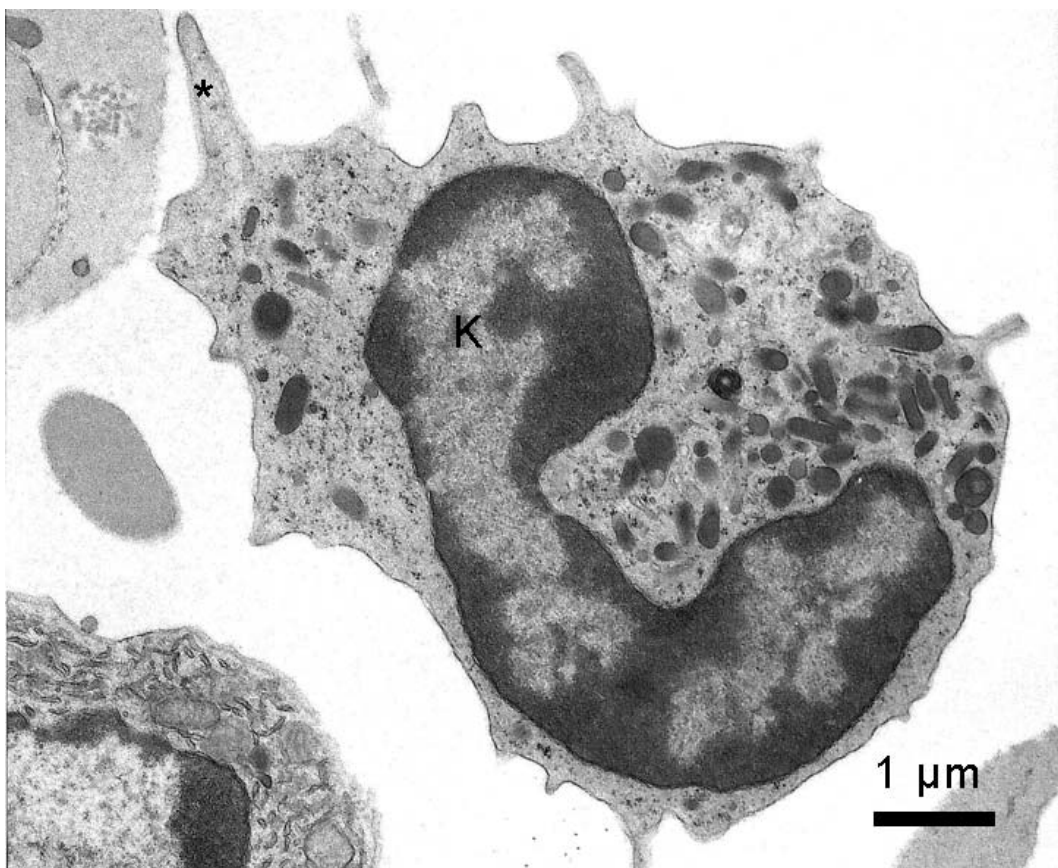


Abb. 49: Länglich geformter stabkerniger neutrophiler Granulozyt, mit typisch, U-förmigen Kern. An der Zelloberfläche sind einige Zytoplasmaausläufer (\*) ausgebildet. SSL 53 cm

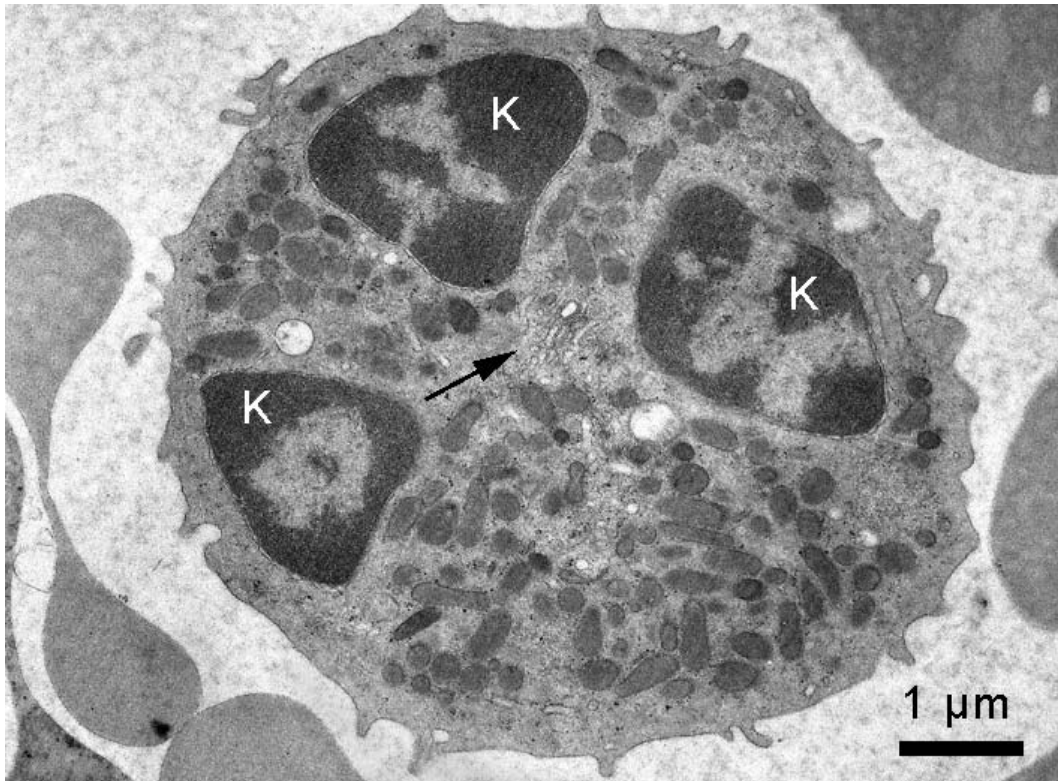


Abb. 50: Neutrophiler Granulozyt mit 3 Kernsegmenten (K). Im Zentrum ist ein deutlicher Golgi-Apparat (→) sichtbar. Das gesamte Zytoplasma ist mit Granula ausgefüllt. Neugeborenes Tier.

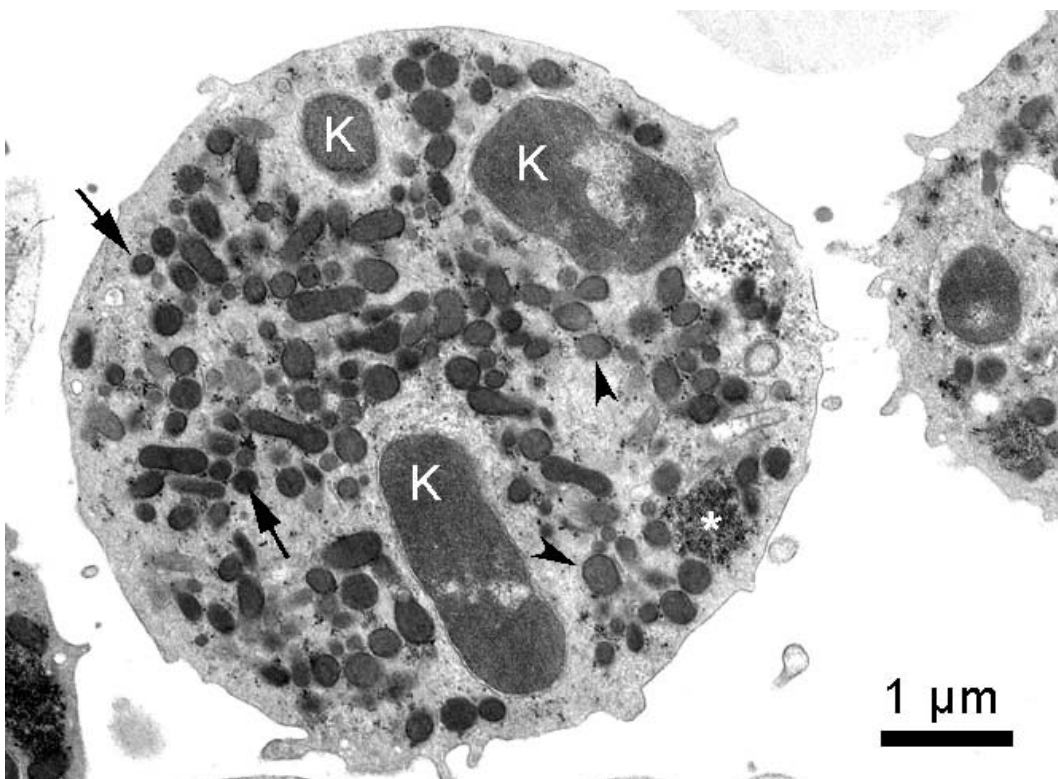


Abb. 51: Neutrophiler Granulozyt mit drei Kernsegmenten (K) im Anschnitt. Im Zytoplasma befinden sich elektronendichte Granula (→) und etwas hellere größere Granula (▶), Glykogen liegt einzeln oder angehäuft (\*) im Zytoplasma. Neugeborenes Tier.

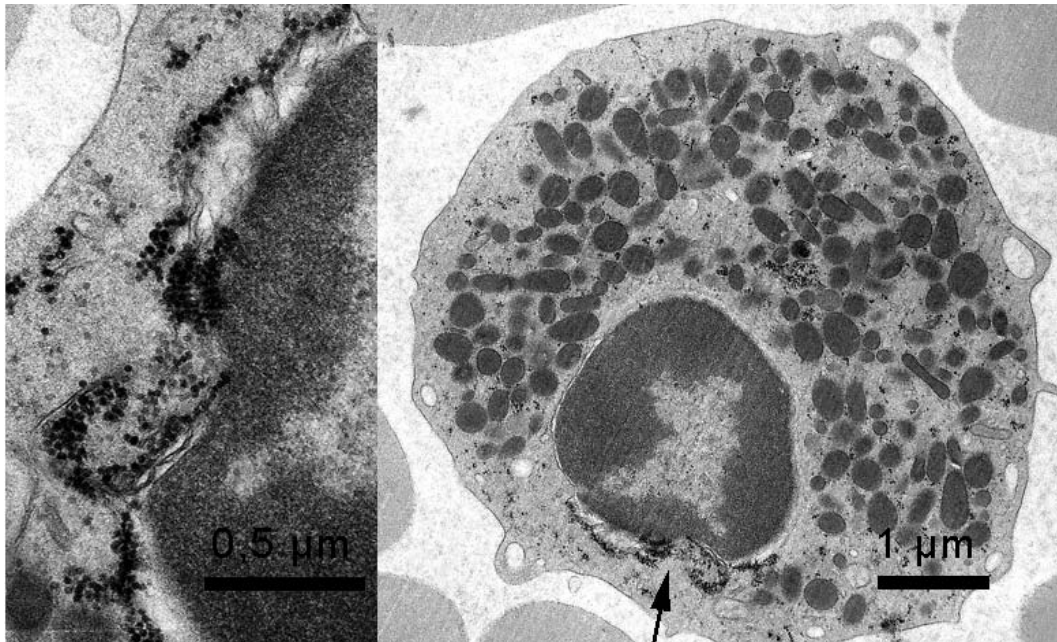


Abb. 52: Neutrophiler Granulozyt mit Ansammlung von Glykogen an Membranen, die vom Kern ausgehen. Neugeborenes Tier.

#### 4.2.2 Eosinophile Granulozyten

Reife eosinophile Granulozyten kamen nur selten in den elektronenmikroskopischen Proben vor. Die eosinophilen Granulozyten ähneln in ihrem Aufbau den neutrophilen Granulozyten. Pro Zelle sind ein oder zwei runde Kernanschnitte vorhanden. Der Kern besteht überwiegend aus Heterochromatin, das sich von der Kernmembran ausgehend blockartig anordnet. Anhand der Granula können eosinophile von neutrophilen Granulozyten differenziert werden. Die eosinophilen Granula sind dabei deutlich größer (0,6-0,8 µm) als die neutrophilen (0,2-0,5 µm) und stellen sich immer rund dar. Zudem weisen sie keinen homogenen Inhalt auf. Die Granula besitzen zum Teil einen hellen Hof, der als Halo bezeichnet wird. Außerdem treten konzentrisch geschichtete elektronendichte (Abb. 53) sowie ungleichmäßig elektronendichte Granula auf (Abb. 54).

Im Zytoplasma sind wenige runde Mitochondrien vom Cristae-Typ, vereinzelt, kurzes rER, selten ein kleiner Golgi-Apparat und verstreut liegende Glykogenpartikel vorhanden.

Vorläufer der eosinophilen Granulozyten konnten in keiner der Proben gefunden werden.



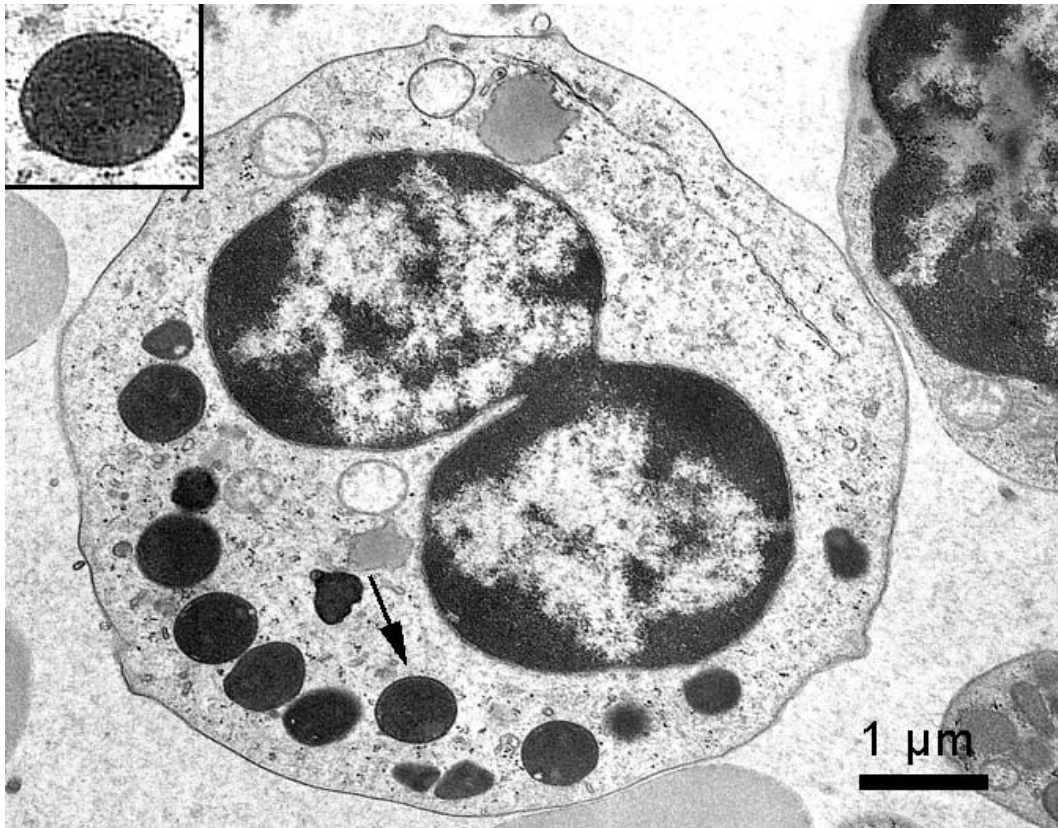


Abb. 53: Eosinophiler Granulozyt mit einem gelappten Kern. In der Vergrößerung ist die konzentrische Schichtung eines der Granula (→) zu erkennen. SSL 89 cm.

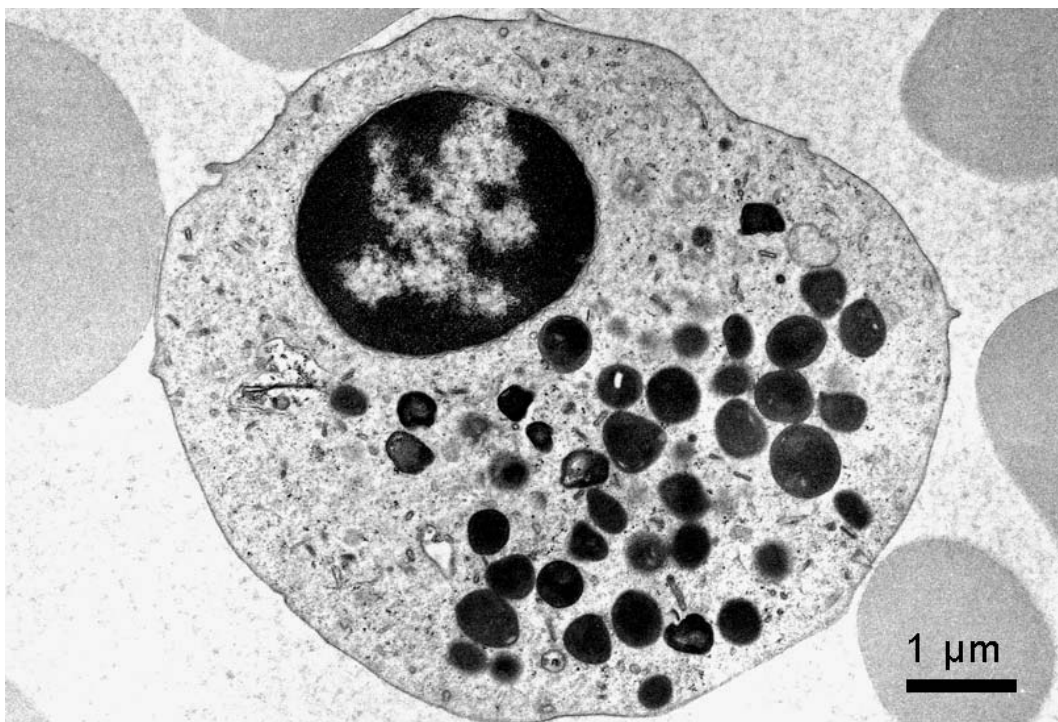


Abb. 54: Eosinophiler Granulozyt mit einer Vielzahl an verschiedenartigen Granula. SSL 89 cm.

#### 4.2.3 Basophile Granulozyten

Morphologisch konnten in keiner der Nabelschnurblutproben basophile Granulozyten oder deren Vorläufer nachgewiesen werden.

### 4.3 Lymphozyten

Lymphozyten waren mit Ausnahme der SSL 3,4 cm in allen Proben nachweisbar.

Grundsätzlich haben Lymphozyten in allen Proben eine runde Zellform, können jedoch verschieden lange Zytoplasmaausläufer besitzen. Der Kern ist ebenfalls meist rund, weist aber in manchen Zellen eine unterschiedlich tiefe Einziehung auf. Das Chromatin kondensiert entlang der Kernmembran und ordnet sich in den peripheren Kernbereichen als Heterochromatin an, wohingegen im Zentrum hauptsächlich Euchromatin vorkommt. In manchen Zellen ist im Zellkern ein Nukleolus sichtbar (Abb. 55). Diese Zellen werden von manchen Autoren als Lymphoblasten eingeordnet. Die Mitochondrien sind meist rund und vom Cristae-Typ, jedoch treten auch längliche Formen auf. Ein Golgi-Apparat ist manchmal nachweisbar. Zusätzlich existieren kleine runde dunkle Vakuolen, die sich um den Golgi-Apparat anordnen. Vereinzelt tritt glattes und raues ER auf.

Auffallend bei den Proben des Nabelschnurblutes aus neugeborenen Kälbern sind Membranstrukturen, die nur vereinzelt, meist aber mit der Kernmembran assoziiert auftreten. Diese Membranen ordnen sich entweder in Stapeln (Abb. 56) an oder stellen sich konzentrisch geschichtet als myelinartige Strukturen dar (Abb. 57).

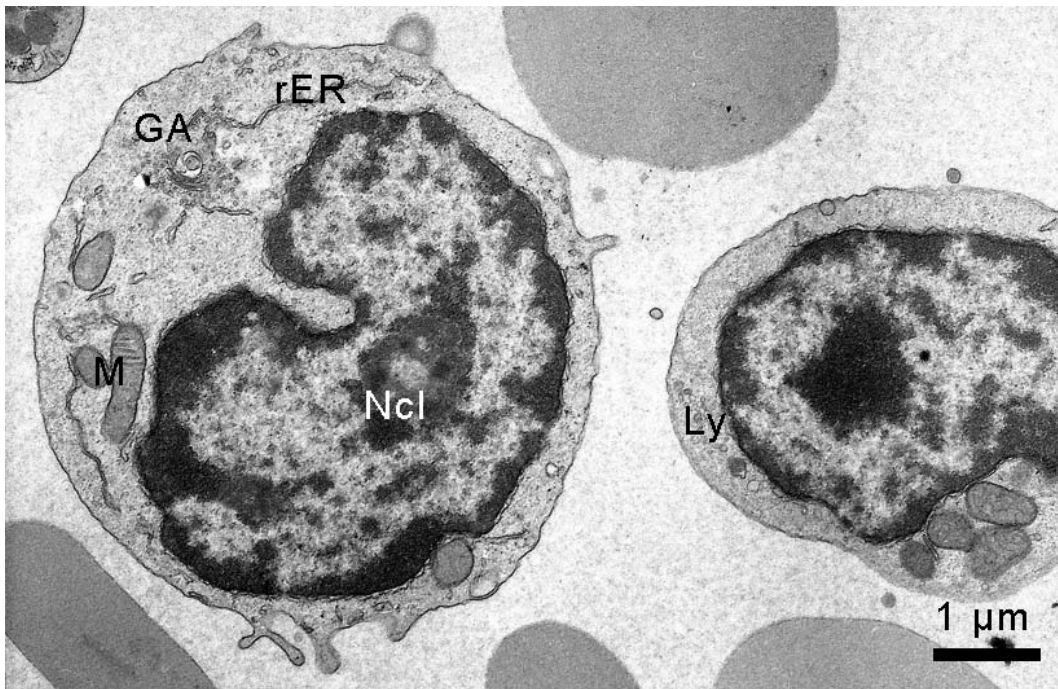


Abb. 55: Zwei Lymphozyten. Im Kern des linken Lymphozyten ist ein Nucleolus vorhanden. Im Zytoplasma treten Mitochondrien (M), einige rER-Zisternen (rER) und ein deutlicher Golgi-Apparat (GA) auf. Im rechten befinden sich einige kleine Lysosome. Neugeborenes Tier.

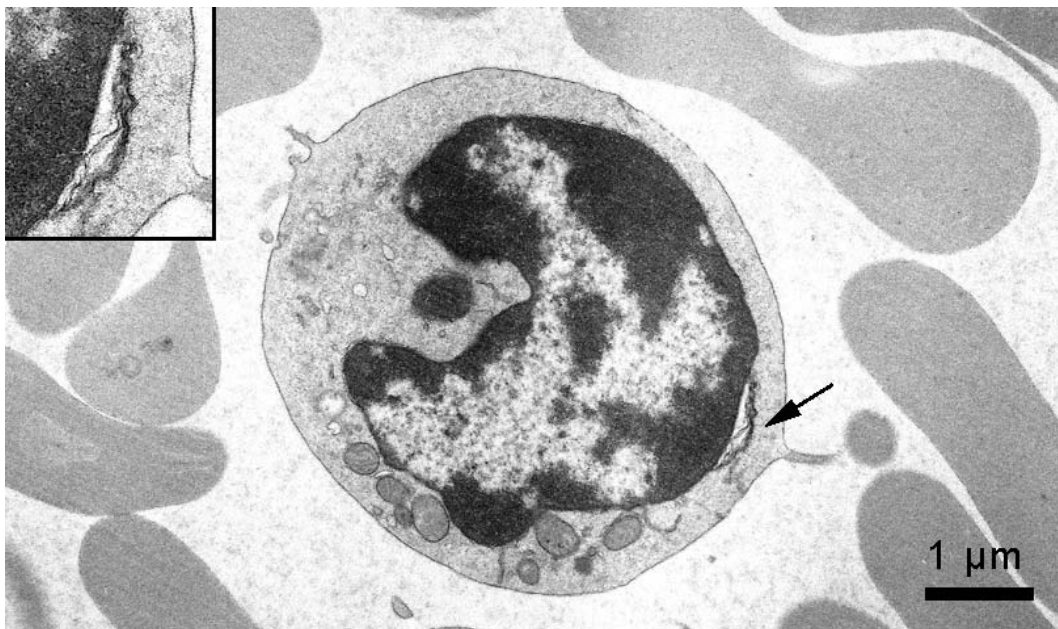


Abb. 56: Lymphozyt mit Membranstrukturen, die mit der Kernmembran assoziiert sind (→). Ausschnitt gibt eine Vergrößerung dieser Strukturen wider. Neugeborenes Tier.



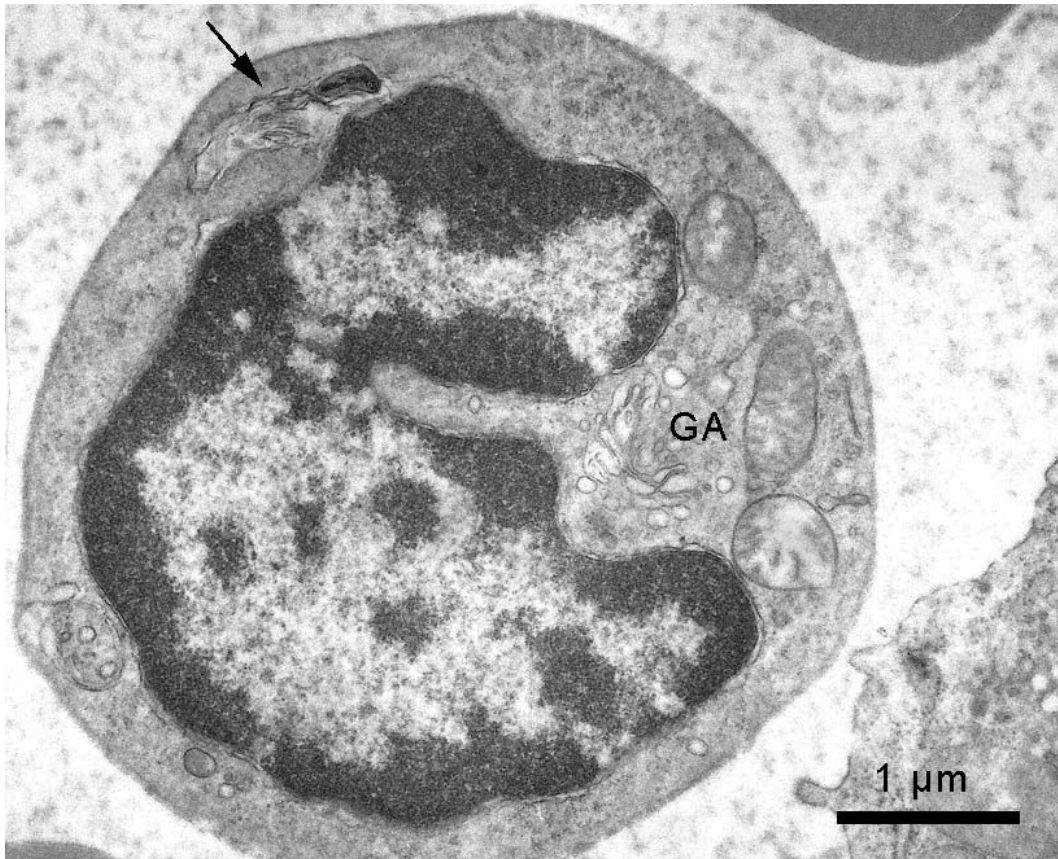


Abb. 57: Lymphozyten mit konzentrisch geschichteten Membranen, die mit der Kernmembran in Verbindung stehen. Deutlicher Golgi-Apparat (GA) und einige Mitochondrien im Zytoplasma. Neugeborenes Tier.

#### 4.4 Monozyten

In den Proben treten in unterschiedlicher Häufigkeit Blutzellen mit sehr viel endoplasmatischem Retikulum auf, die der Morphologie von Monozyten entsprechen. Diese runden Zellen weisen an ihrer Oberfläche häufig kleine kurze Zytoplasmaausläufer auf. Der Zellkern ist länglich, bohnen- bis U-förmig, wobei sich das Heterochromatin meist auf die Bereiche um die Kernmembran beschränkt. In einigen Zellen sind ein bis zwei Nukleoli vorhanden, die manchmal marginal an der Kernmembran liegen. Das Zytoplasma dieser Zellen ist sehr organellenreich. Auffallend ist der hohe Gehalt an kurzen Zisternen des rER, die unterschiedlich stark mit Ribosomen besetzt ist. Nahezu das gesamte Zytoplasma ist von diesem ER ausgefüllt (Abb. 58). Die Mitochondrien sind rund bis ovoid und besitzen zahlreiche Cristae. Regelmäßig ist ein Golgi-Feld vorhanden, das immer im Bereich der Kerneinbuchtung, bzw. zwischen den beiden Kernsegmenten liegt. In der Umgebung dieses unterschiedlich gut ausgebildeten Golgi-Apparates befinden sich zahlreiche Vesikeln und oft

auch Zentriolen (Abb. 59). Des Weiteren treten kleine runde elektronendichte Granula und vereinzelt kleine Lysosomen auf.

Ebenso wie bei den Lymphozyten kommen auch hier mit der Kernmembran assoziierte Membranstrukturen vor (Abb. 58). Neben der Lokalisation an der Kernmembran existieren konzentrische Membranstrukturen auch frei im Zytoplasma. Im Zellkern treten manchmal Vakuolen auf (Abb. 60).

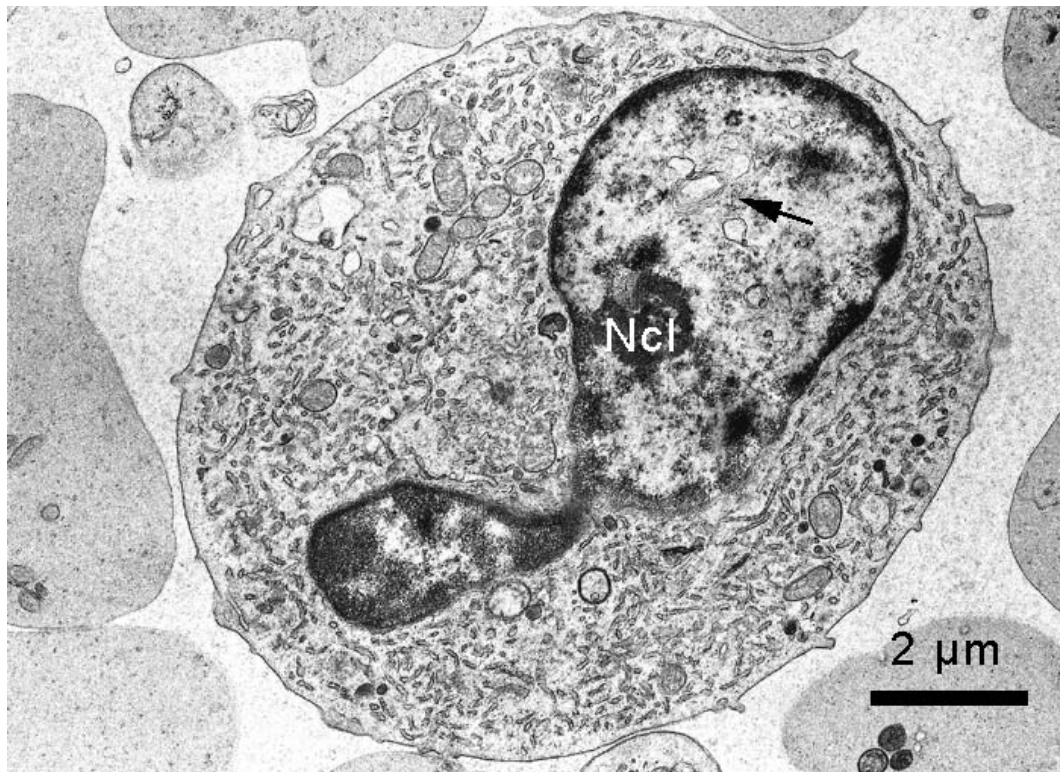


Abb. 58: Monozyt mit viel endoplasmatischem Retikulum und einzelnen elektronendichten Granula im Zytoplasma. Im Kern sind ein marginalisierter Nucleolus (Ncl) und Vakuolen (→) erkennbar. SSL 42 cm.

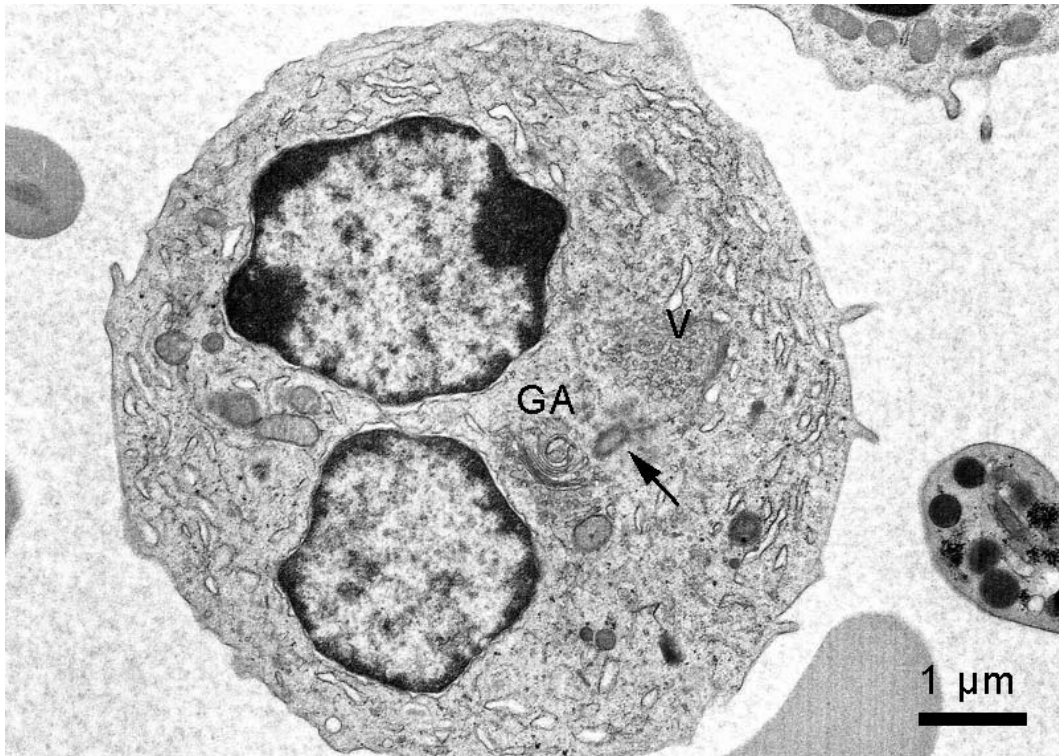


Abb. 59: Monozyt mit deutlich ausgebildetem Golgi-Apparat, kleinen Vesikeln und Zentriolen. Neugeborenes Tier.

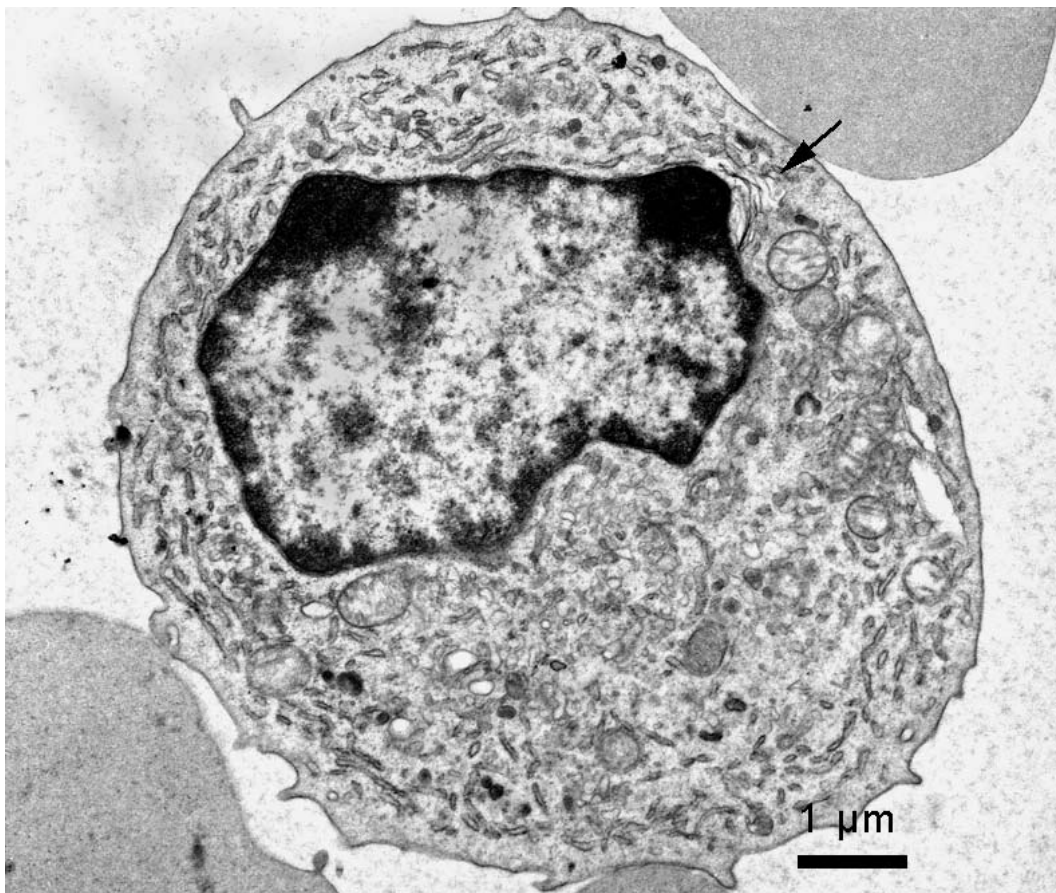


Abb. 60: Monozyt mit Membranstrukturen (→) am Kern. Im Zytoplasma sind deutliche elektronendichte Granula vorhanden. SSL 42 cm.

### 4.5 Thrombozyten

In allen untersuchten Proben von Nabelschnurblut der Feten und neugeborenen Kälber waren erwartungsgemäß reife Thrombozyten vorhanden.

Megakaryozyten hingegen wurden nur in einer Probe (SSL 42 cm) beobachtet.

Die Megakaryozyten (Abb. 61) sind vielgestaltig und weisen pseudopodienartige Fortsätze auf, in deren Umgebung sich sehr viele diskoidale bis runde Thrombozyten befinden.

Obwohl Megakaryozyten mehrere Zellkerne besitzen, tritt in den elektronenmikroskopischen Schnitten immer nur ein pleomorpher Kern auf, in dem einzelne Kernsegmente über schmale Zytoplasmabrücken verbunden sind. Das Chromatin ist im Bereich der Kernmembran kondensiert, im restlichen Kern aber locker angeordnet. Es sind keine Nukleoli sichtbar.

Im Zytoplasma befinden sich zahlreiche homogene elektronendichte  $\alpha$ -Granula sowie vereinzelte elektronendurchlässige  $\delta$ -Granula („dense bodies“) mit ihrem typischen stark elektronendichten exzentrisch gelagerten Körperchen. Die Granula kommen prinzipiell überall im Zytoplasma vor, dennoch ist eine Anhäufung direkt unter der Zellmembran zu beobachten. Des Weiteren sind kleine Vesikel des ER und des DTS vorhanden.

Die reifen Thrombozyten sind von runder bis diskoidaler Form und besitzen manchmal lange Zytoplasmaausläufer, die Filamente aufweisen können. Im Zytoplasma sind wie in den Megakaryozyten zwei verschiedene membranbegrenzte Granulaarten vorhanden. Zum einen treten runde, manchmal längliche  $\alpha$ -Granula mit homogenem elektronendichten Inhalt auf, zum anderen sind auch die charakteristischen „dense bodies“ mit ihrem exzentrisch gelagerten stark elektronendichten runden Körperchen vorhanden.

Zusätzlich konnten in den Thrombozyten des Nabelschnurblutes der neugeborenen Kälber längliche membranbegrenzte Strukturen beobachtet werden, die eine deutlich erkennbare Querstreifung aufwiesen. Sie entsprechen in ihrer Dichte den elektronendichten homogenen Granula. Derartige Strukturen konnten bei den Feten nicht beobachtet werden. Im Zytoplasma treten kleine runde teilweise dunkle Mitochondrien auf, die in allen Trächtigkeitsstadien oft nur vereinzelte Cristae besitzen. Längliches glattes ER (sER) ist nur spärlich vorhanden.

Peripher im Zytoplasma unter der Zellmembran sind abschnittsweise Züge aus zirkulär angeordneten Filamentbündeln vorhanden (Abb. 62). Im Bereich dieser Filamente befinden sich keine Organellen. Allen Thrombozyten enthalten variable Mengen an Glykogen. Die meisten Zellen weisen einzelne, im Zytoplasma verteilte Glykogenpartikel auf. Größere Mengen an Glykogen ordnen sich in Gruppen frei im Zytoplasma an oder sind mit dem sER, dem DTS oder mit Filamenten assoziiert (Abb. 63).

Neben diesem weit verbreiteten Typ von Thrombozyten treten noch weitere Plättchen-Formen auf. Bei der SSL 53 cm konnten gehäuft „Riesenthrombozyten“ (Abb. 64) beobachtet werden, die ca. drei bis vier Mal größer sind als die vorher beschriebenen Formen. Die Zelloberfläche weist unterschiedlich viele Pseudopodien-ähnliche Fortsätze auf, die frei von Organellen oder Granula sind. Hinsichtlich der auftretenden Granula, der Mitochondrien und dem sER und des DTS entsprechen sie den oben beschriebenen Thrombozyten. Filamente sind nicht vorhanden, dafür ist ein kleiner Golgi-Apparat mit zahlreichen Vesikeln sichtbar.

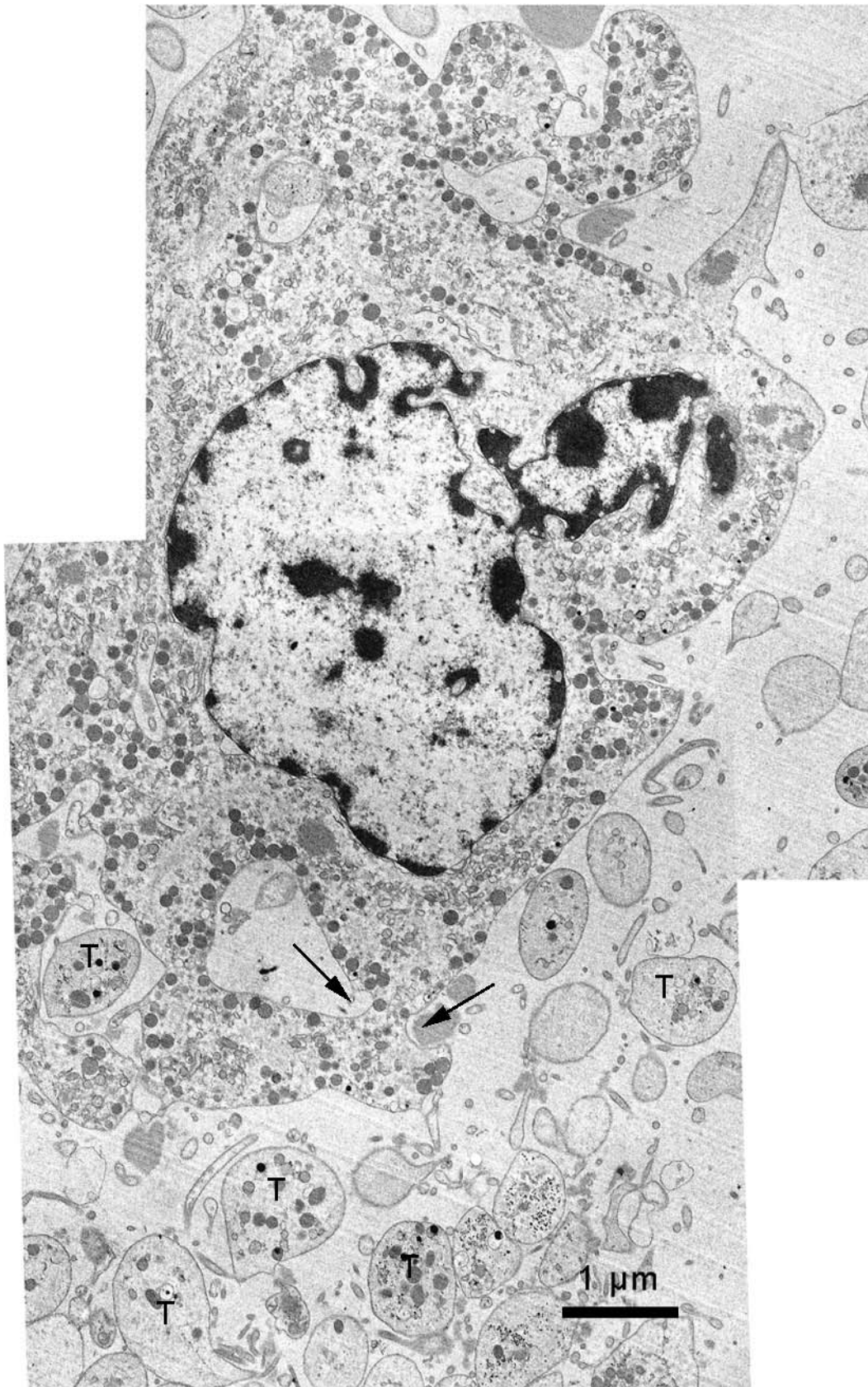


Abb. 61: Megakaryozyt mit stark lobuliertem Zellkern und peripher gelegene, durch Abschnürung (→) von Zytoplasma neu gebildete Thrombozyten (T). SSL 42 cm.



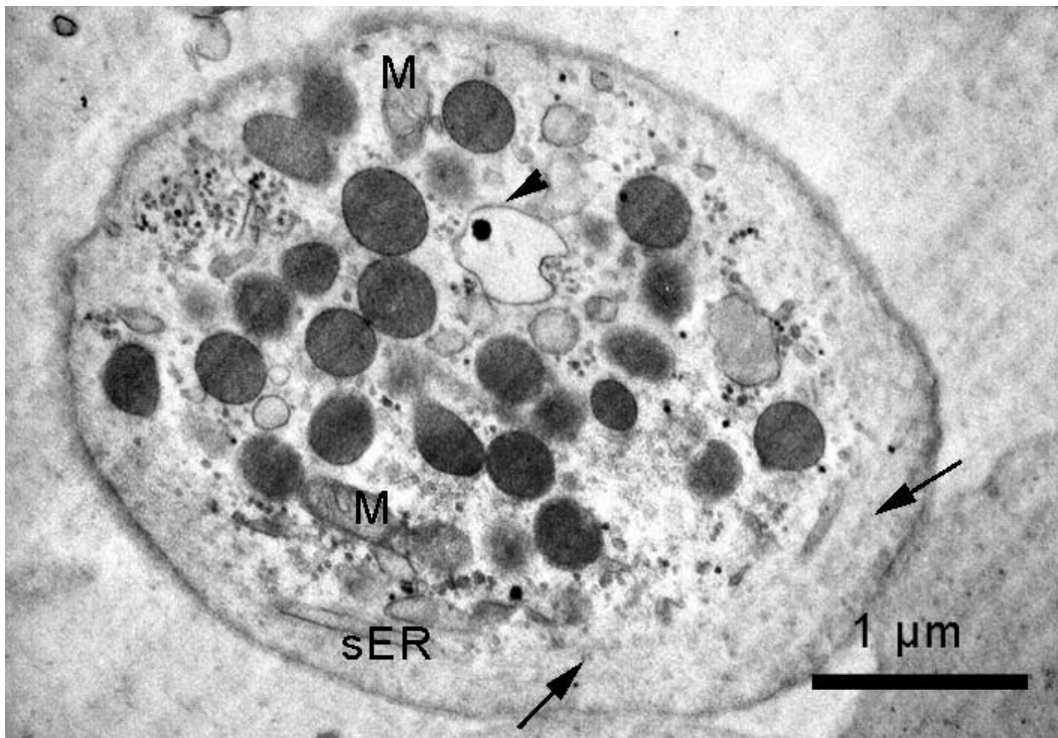


Abb. 62: Thrombozyt mit kleinen dunklen Mitochondrien (M), sER, Glykogen,  $\alpha$ -Granula und einem „dense body“ (►). Periphere Filamente (→) sind sichtbar. SSL 42 cm.

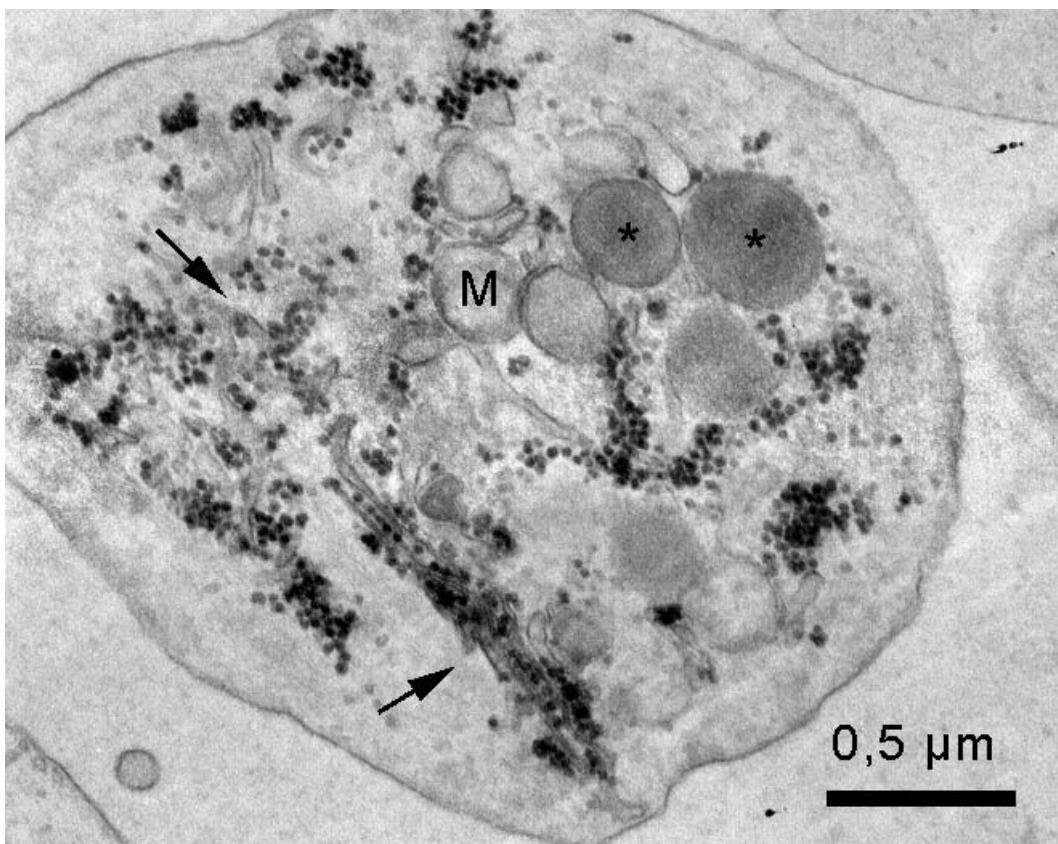


Abb. 63: Thrombozyt mit Glykogen, das an einigen Stellen mit dem DTS (→) assoziiert ist.  $\alpha$ -Granula (\*) und Mitochondrien (M) sind deutlich erkennbar. SSL 42 cm.

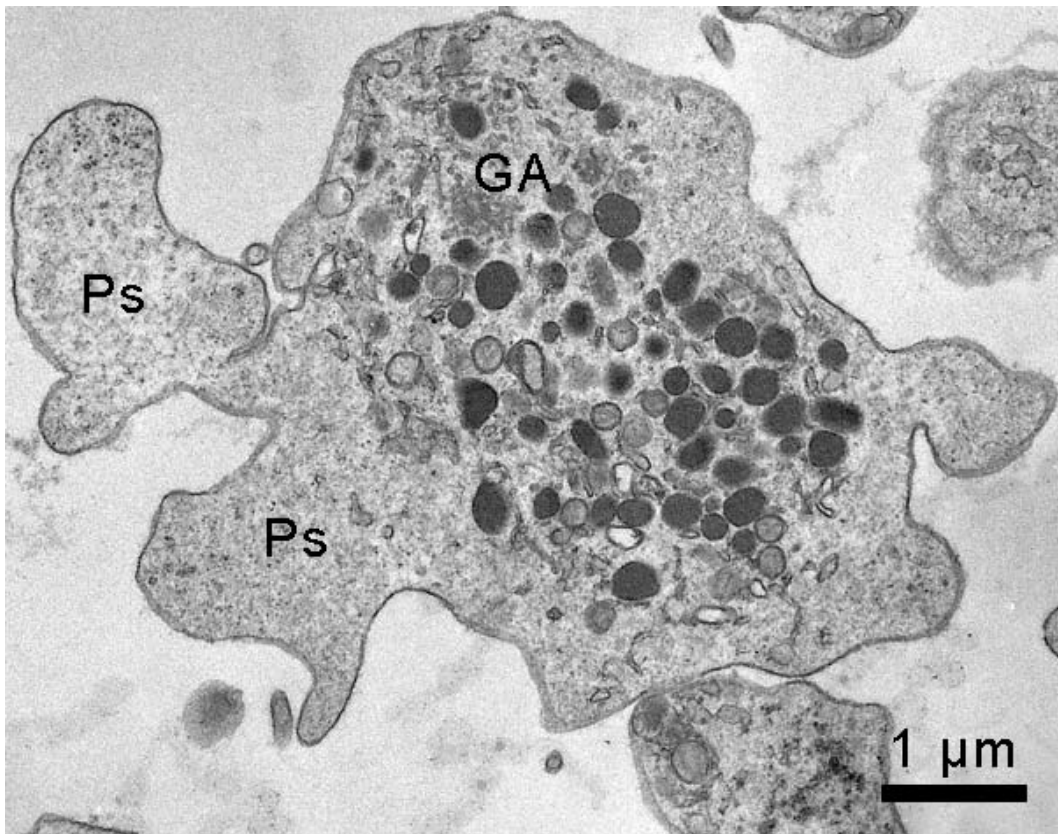


Abb. 64: „Riesenthrombozyt“ mit organellenfreien Zytoplasmaausläufern (Ps). Golgi-Apparat (GA),  $\alpha$ -Granula und Vakuolen im Zentrum der Zelle. SSL 53 cm

#### 4.6 Nicht klassifizierbare stammzell-ähnliche Zellen

Die undifferenzierten Zellen weisen ein sehr hohes Kern-Plasma-Verhältnis auf. Der Kern ist stark euchromatisch und besitzt nur unter der Kernmembran und um die Nukleoli einen schmalen Saum aus Heterochromatin. Meist sind zwei Nukleoli angeschnitten. Das Zytoplasma ist eher organellenarm, besitzt aber zahlreiche Ribosomen. Es treten runde bis längliche Mitochondrien, wenige Stränge von länglichem rER und kleine elektronendichte Vakuolen auf. Ein Golgi-Apparat ist selten vorhanden (Abb. 65 und 66). Die Morphologie dieser Zellen entspricht dem in der Literatur beschriebenen Aussehen von HSC.



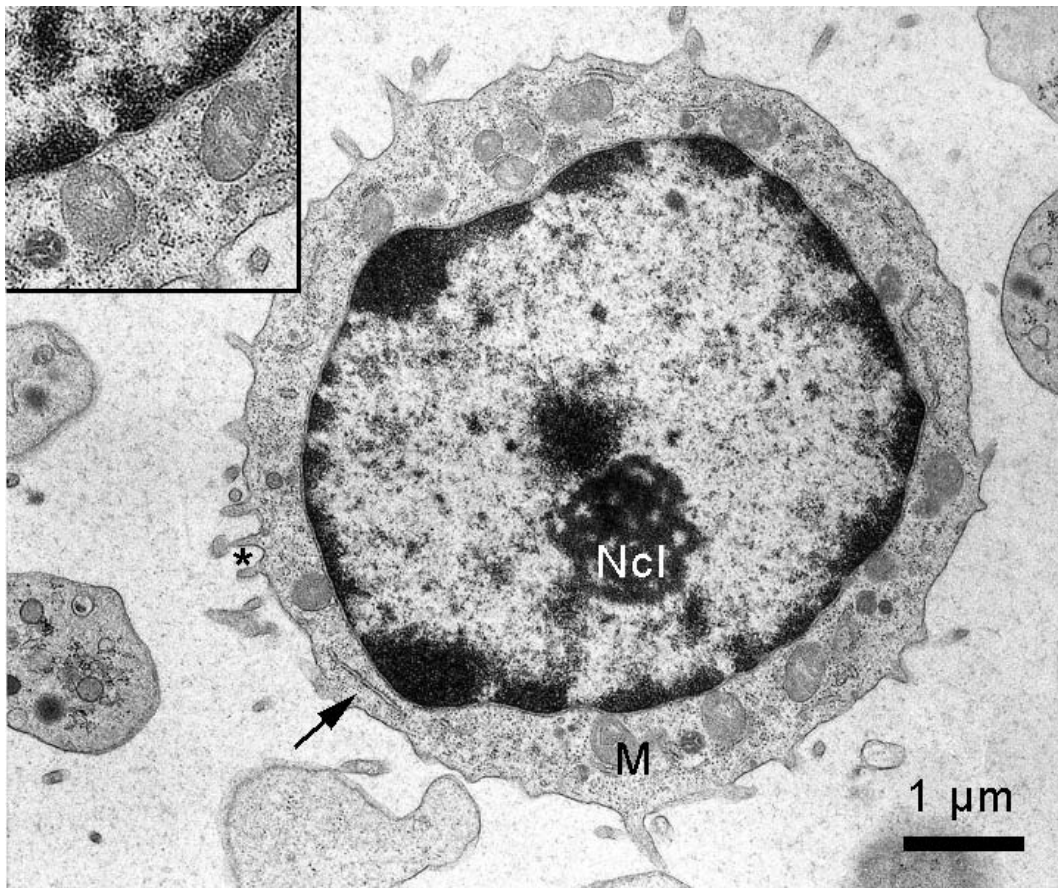


Abb. 65: Primitive Blutzelle mit hohem Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Der euchromatische Kern besitzt einen großen Nucleolus (Ncl). Im schmalen Zytoplasmasaum befinden sich runde Mitochondrien (M), wenig raues ER (→) und zahlreiche Ribosomen. Einige kleine Zytoplasmafortsätze (\*) sind vorhanden. SSL 42 cm.

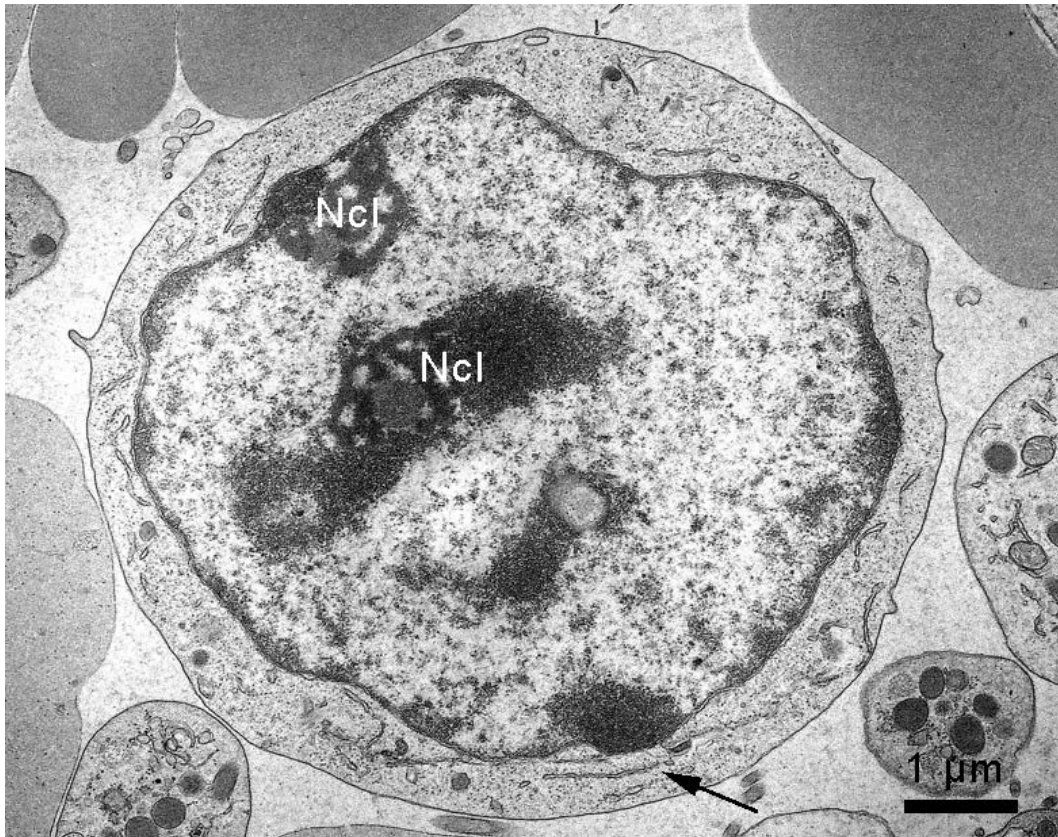


Abb. 66: Unreife Blutzelle. Der euchromatinreiche Kern weist zwei deutlich sichtbare Nukleoli auf. Im Zytoplasma treten außer einigen Zisternen des endoplasmatischen Retikulums und vieler Ribosomen keine weiteren Organellen auf. SSL 42 cm.

#### 4.7 Phagozytierende Zellen

In zwei Proben (SSL 29 cm und 42 cm) waren phagozytierende Zellen zu beobachten. Diese besitzen an ihrer Oberfläche unterschiedlich ausgeprägte dünne Zytoplasmafortsätze, die teilweise die zu phagozytierende Zellen umfließen. Der bohnen- bis U-förmig Kern besitzt große, heterochromatische Bereiche. Im Zytoplasma fallen Lysosomen von uneinheitlicher Größe auf, die verschiedenartigen Inhalt aufweisen. In einigen sind Thrombozyten oder Reste von Zellkernen sichtbar (Abb. 67). Des Weiteren kommen konzentrisch geschichtete Membranstrukturen (Abb. 68) und homogene Strukturen unterschiedlicher Dichte und Größe in Lysosomen vor (Abb. 69). Neben den Lysosomen ist eine Vielzahl an kleinen, länglichen, elektronendurchlässigen Vakuolen zu beobachten. Zudem enthält das Zytoplasma runde Mitochondrien, kleine Vesikeln und rER. Vereinzelt ist ein kleiner Golgi-Apparat vorhanden.

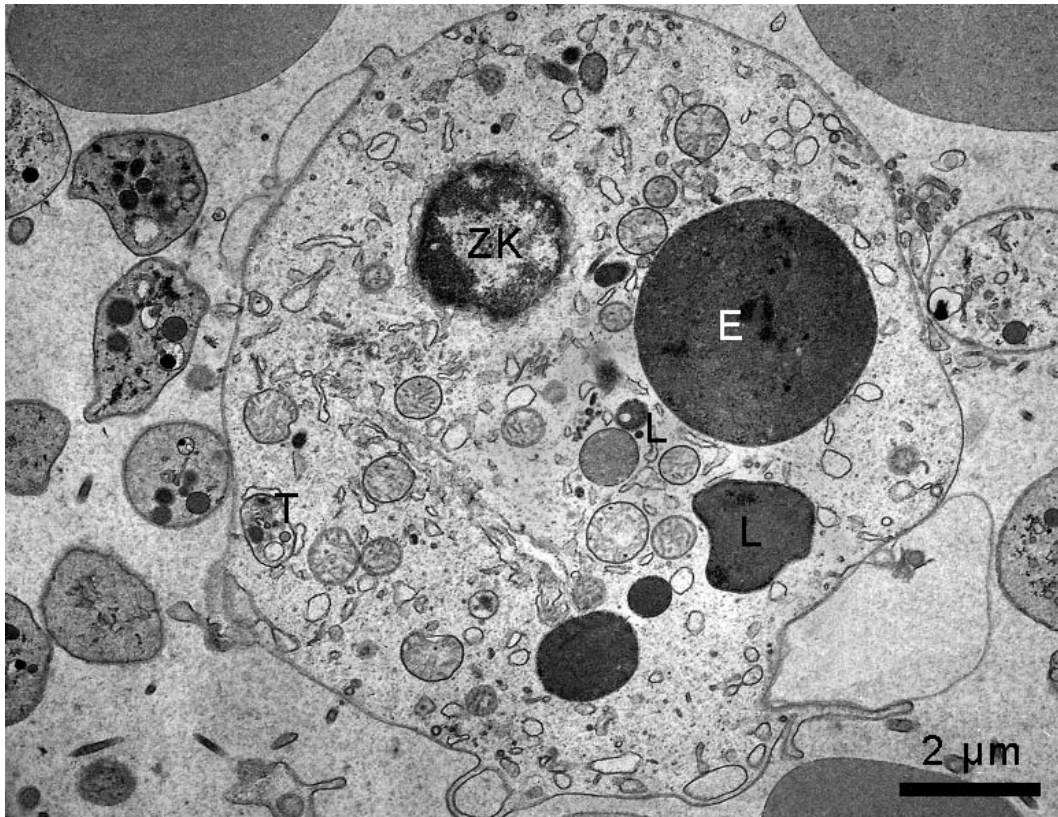


Abb. 67: Phagozytierende Zellen mit Lysosomen (L), einem pyknotischen Zellkern eines Erythrozyten (E) und einem phagozytierten Thrombozyten (T). Peripherer Anschnitt des Zellkerns (ZK). SSL 42 cm.

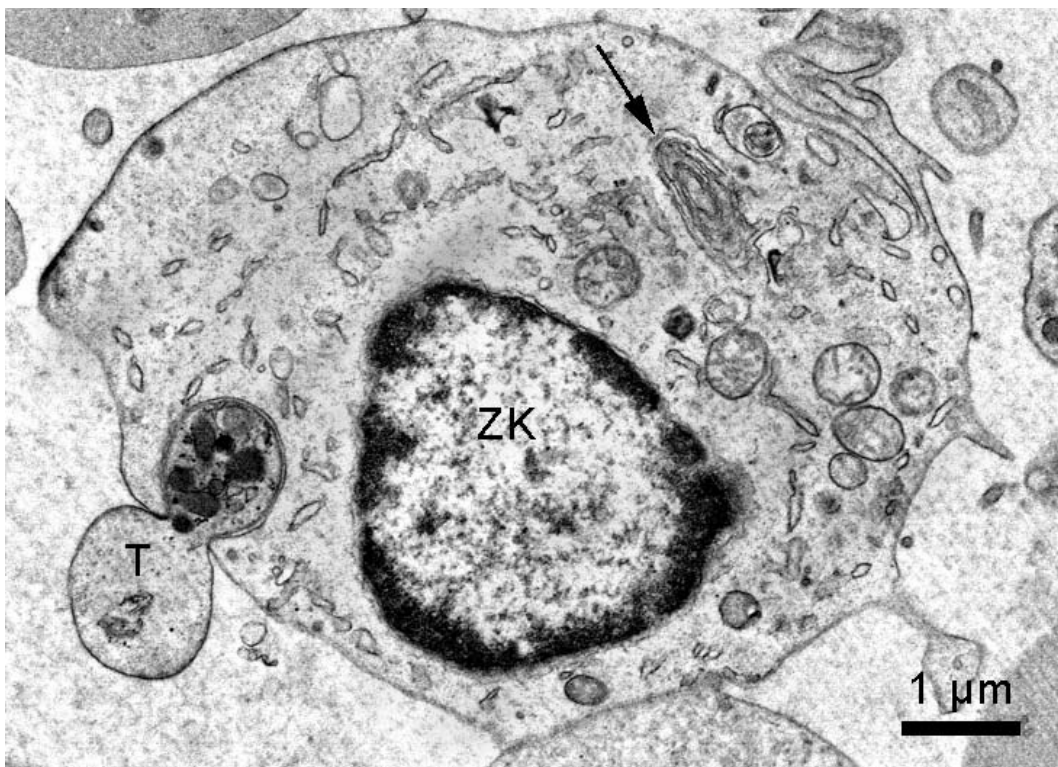


Abb. 68: Phagozytose eines Thrombozyten (T). Im Zytoplasma der Zelle sind neben dem Zellkern (ZK) konzentrisch geschichtete Membranstrukturen (→) erkennbar. SSL 42 cm.

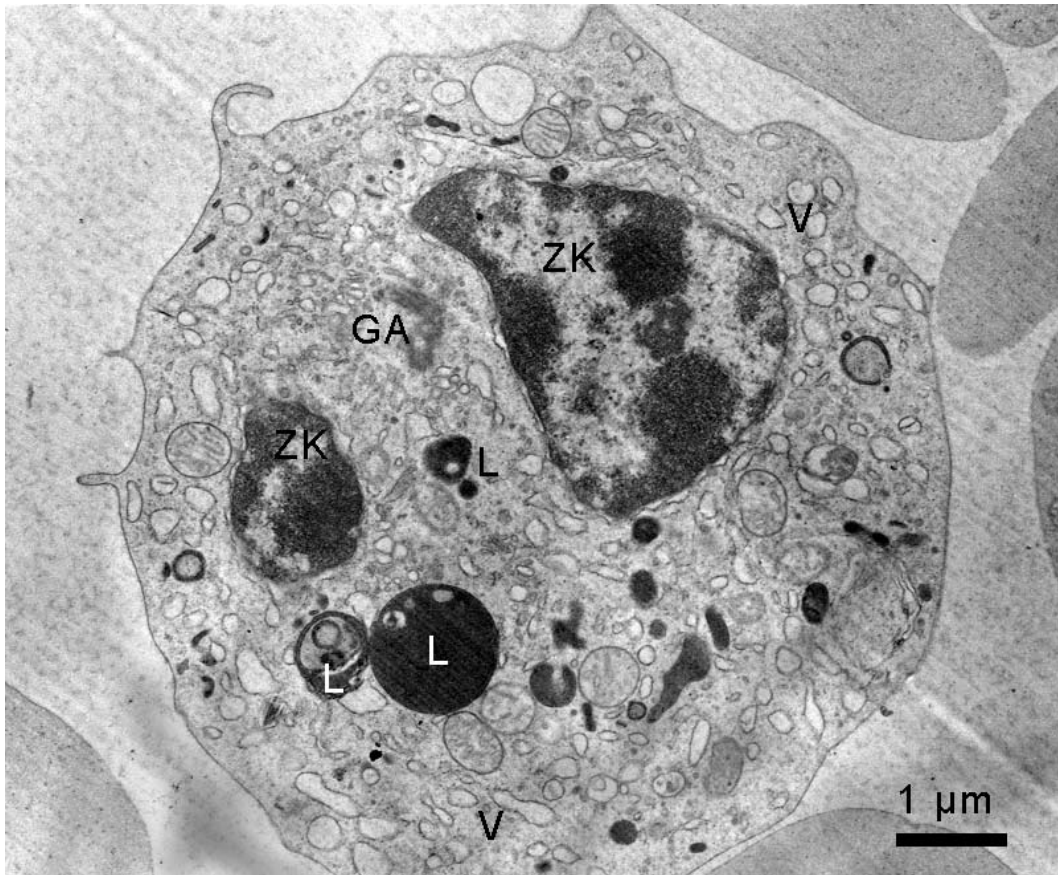


Abb. 69: Zelle mit zahlreichen Lysosomen (L), Vakuolen (V), einem Golgi-Apparat (GA) mit Zentriolen in der Nachbarschaft und einem zweigeteiltem Zellkern (ZK). SSL 42 cm.

## 5 Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen

Beim Vergleich der verschiedenen Fixierungen stellte sich die Aceton-Methanol-Fixierung als die geeignetste für die lektinhistochemischen Nachweise heraus.

Zum Nachweis der Zuckerreste wurden native, mit Ficoll und mit Amoniumchlorid-Lysispuffer behandelte Blutausstriche mit FITC- oder Rhodamin-konjugierten Lektinen inkubiert. Auffällig war, dass in den Proben aus Ficoll<sup>®</sup> das Färbeverhalten der Zellen, insbesondere der Thrombozyten von dem aus nativen Präparaten abwich.

Eine Zellart zeigt, bezogen auf ein bestimmtes Lektin immer das gleiche Reaktionsmuster, wobei mit steigenden SSL keine Veränderungen zu beobachten sind.

Tabelle 14 gibt eine Zusammenfassung über die Ergebnisse.

Die Negativkontrollen aller Proben zeigten keinerlei Fluoreszenz. In der Präabsorption mit den entsprechenden Hemmzuckern kam es zu einer starken Abschwächung der Reaktion.

## 5.1 Erythrozyten

Die reifen kernlosen Erythrozyten reagieren nicht oder nur in Einzelfällen sehr schwach (GSA I, WGA, UEA I) mit den verwendeten Lektinen. Die orthochromatischen und azidophilen Erythroblasten hingegen zeigen im Zytoplasmasaum eine leichte Fluoreszenz nach Inkubation mit den Lektinen Con A, ECA, GSA I und UEA. Mit VVA und WGA (Abb. 70) gefärbte Zellen weisen sowohl im Zytoplasma, wie auch im Kern eine schollige Reaktion auf, die mit zunehmender Reifung stärker wird. LTA und SBA besitzen keine spezifische Bindung an kernhaltige Erythroblasten.

## 5.2 Neutrophile Granulozyten

Die Granula der neutrophilen Granulozyten zeigen mit allen Lektinen eine leichte bis starke Fluoreszenz, wobei keine Bindung im Bereich des Kerns auftritt. Eine besonders starke Fluoreszenz besteht bei Verwendung der Lektine WGA (Abb. 70, 73), ECA (Abb. 71), PNA (Abb. 72), Con A und UEA I, wobei die restliche Lektine mit den Granula innerhalb einer Zelle unterschiedlich stark reagieren. Die Stärke der Fluoreszenz weist keine Korrelation zum Grad der Segmentierung des Kerns auf. In der Doppelfärbung mit FITC- markiertem WGA und Rhodamin-markiertem Con A binden beide Lektine an die Granula, wobei sie mit unterschiedlichen Bindungsstellen reagieren und so unterschiedliche Granula anfärben (Abb. 73).

Unter Verwendung von Con A, ECA, SBA, GSA I treten vereinzelt 15-20 µm große myeloide Zellen mit bohnenförmigem Kern auf, die im Bereich der Kerneinbuchtung eine kleine Anzahl von schwach bis mittelgradig fluoreszierenden Granula aufweisen.

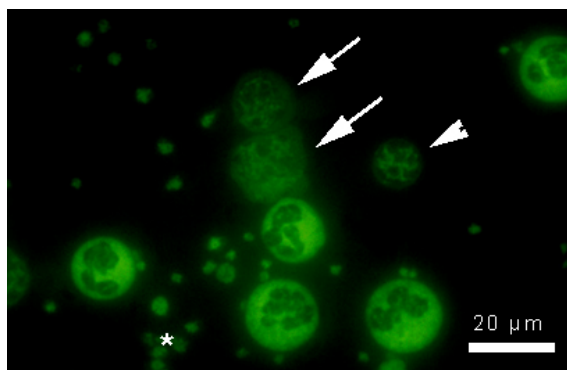


Abb. 70: WGA-positive Lymphozyten (→), neutrophile Granulozyten, Erythroblasten (▴) und Thrombozyten (\*). Neugeborenes Tier.

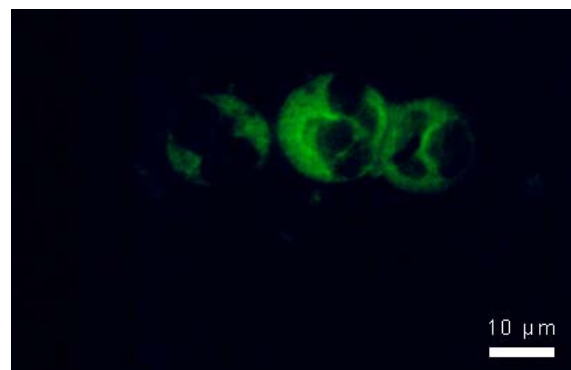


Abb. 71: ECA: Die Granula der neutrophilen Granulozyten reagieren deutlich positiv. Neugeborenes Tier



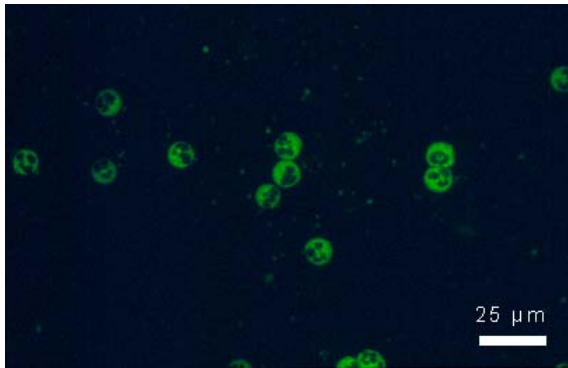


Abb. 72: PNA-positive neutrophile Granulozyten. Neugeborenes Tier.

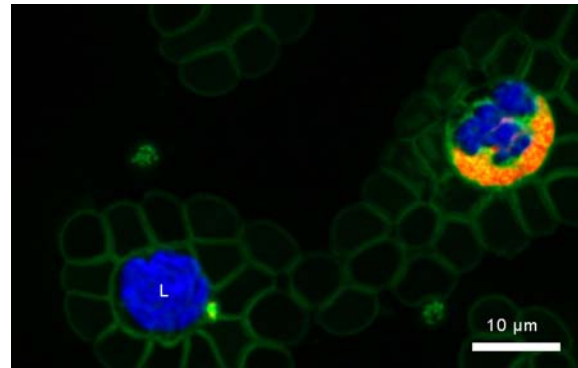


Abb. 73: Doppelfärbung mit FITC-WGA und Rho-Con A. In den neutrophilen Granulozyten treten differenzierbare grüne WGA-positive und rote Con A-positive Granula auf. Kernfärbung DAPI. Lymphozyt (L). SSL 51 cm.

### 5.3 Eosinophile Granulozyten

Bei den Eosinophilen Granulozyten konnte eine starke Reaktion der Granula mit Con A und WGA (Abb. 74) nachgewiesen werden, hingegen besteht nur eine mittelgradige bis schwache Fluoreszenz der Granula bei Inkubation mit PNA, SBA und VVA.

Mit GSA I zeigt sich eine homogene Färbung des Zytoplasmas ohne granuläre Strukturen.

Die Kerne stellen sich in allen drei Fällen negativ dar.

Keinerlei Bindung an die eosinophile Granulozyten tritt bei Verwendung der Lektine LTA und UEA I auf.

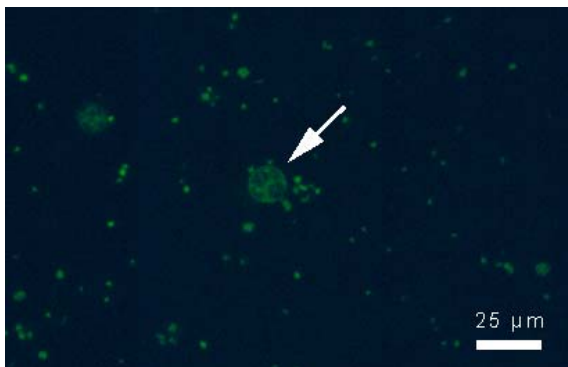


Abb. 74: WGA-positiver eosinophiler Granulozyt. SSL 89 cm.

#### 5.4 Lymphozyten

Das Zytoplasma der Lymphozyten reagiert bei Verwendung der Lektinen PNA, Con A, ECA und GSA I schwach positiv, wobei bei dem Lektin GSA I auch völlig negative Lymphozyten aufgetreten sind. Nach Inkubation mit Con A reagieren im Zytoplasma vorhandene Granula mittelgradig positiv. VVA bindet schwach im Zytoplasma und schwach bis mäßig im Zellkern. Auch mit WGA zeigt der Zellkern eine schwache bis mittlere Fluoreszenz mit wabiger Struktur (Abb. 67), das Zytoplasma ist hier allerdings meist negativ. Keine Reaktion mit Lymphozyten ist bei Verwendung der Lektinen SBA, LTA und UEA I vorhanden.

#### 5.5 Monozyten

Das Zytoplasma der Monozyten zeigt nach Inkubation mit den Lektinen PNA, Con A, ECA und SBA eine geringgradige Fluoreszenz. WGA, GSA I und VVA reagieren zusätzlich schwach bis mittelgradig mit dem Zellkern. Bei Verwendung der Lektine Con A, WGA und VVA sind im Zytoplasma sehr vereinzelte, mittelgradig positive Granula vorhanden.

#### 5.6 Thrombozyten

Die Granula der Thrombozyten binden mit Ausnahme von LTA alle verwendeten Lektinen mäßig bis stark. Aktivierte Thrombozyten bilden in den Ausstrichpräparaten lange dünne Ausläufer, die starke Fluoreszenz mit den Lektinen GSA I, WGA und VVA aufweisen (Abb. 75 und 76). Eine Reaktion der Ausläufer mit Con A und ECA (Abb. 77) kann nur in den Ausstrichpräparaten mit Ficoll® beobachtet werden.

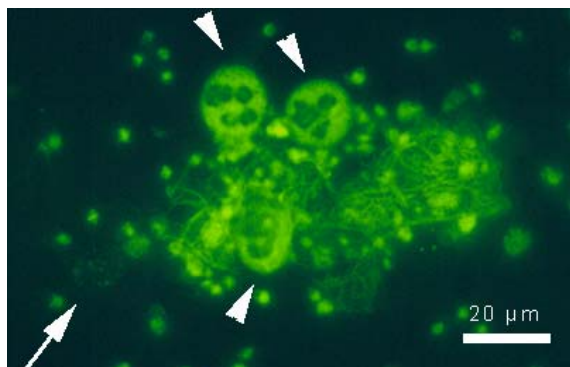


Abb. 75: WGA: Deutlich positive Reaktion der Thrombozyten und deren Zellausläufer. In dem kleinen Koagulum befinden sich stark positive neutrophile Granulozyten (►). Undeutlich ist die schwache Fluoreszenz eines Lymphozytenkerns zu erkennen (→). Neugeborenes Tier.

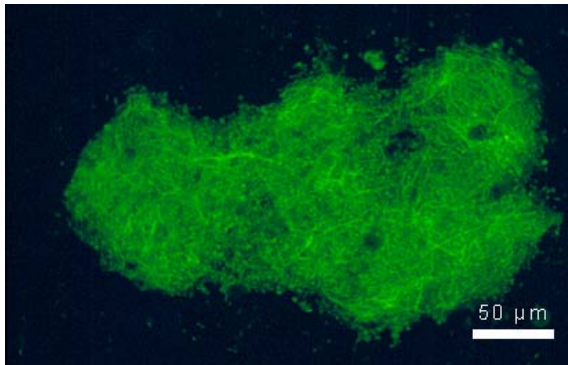


Abb. 76: Starke Fluoreszenz von Thrombozyten und deren Zellausläufern bei Verwendung des Lektins VVA. Neugeborenes Tier.

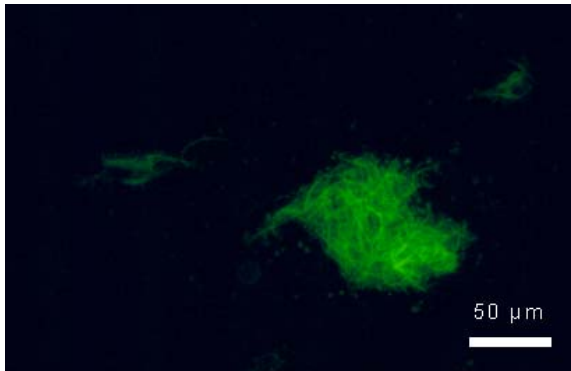


Abb. 77: Koagulum aus aktivierten, ECA-positiven Thrombozyten in einem Ficoll<sup>®</sup>-Präparat. Neugeborenes Tier.

### 5.7 Nicht klassifizierbare Zellen

Neben den oben beschriebenen Zellen treten undifferenzierte, ca. 20 µm große Blutzellen mit einem runden bis bohnenförmigen Kern und ohne erkennbare Granula auf. Diese Zellen zeigen mit Ausnahme von LTA und UEA I mit den verwendeten Lektinen eine schwache Fluoreszenz im Zytoplasma und einen negativen Kern. Bei Verwendung von WGA (Abb. 78) und VVA reagierte zusätzlich der Kern schwach bis mittelgradig in einem grobscholligen Muster.

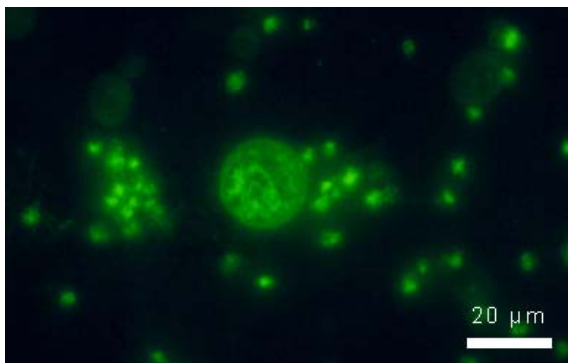


Abb. 78: WGA: schwache, positive Reaktion im Zytoplasma und grobschollig verteilt im Kern dieser undifferenzierten Zelle. SSL 53 cm.



Tab. 14: Lektinbindungsmuster der bovinen Blutzellen aus dem Nabelschnurblut.

Lektin	Reife Erythrozyten	Kernhaltige Erythrozyten	Thrombozyten	Lymphozyten	Neutrophile Granulozyten	Neutrophile Metamyelozyten	Eosinophile Granulozyten	Monozyten	Undifferenzierte Blutzellen
PNA	-	ZP -, K +	Gr +/++	ZP +, K -	Gr + bis +/+++, K -	Gr +/+++, K -	Gr +/-, K -	ZP +, K -	ZP +/-, K -
Con A	-	ZP +, K -	Gr +/+++, (Ausl. +/++)	ZP +/+++, K -	Gr +/++/+++, K -	Gr +/++/+++, K -	Gr +/+++, K -	ZP +, K -	ZP +, K -
ECA	-	ZP +, K -	Gr +/+++, (Ausl. +/++)	ZP +/+++, K -	Gr +/++/+++, K -	Gr +/+++, K -	n.v.	ZP +, K -	ZP +, K -
SBA	-	-	Gr +/++	-	Gr +/++/+++, K -	Gr +/+++, K -	Gr +/+++, K -	ZP +, K -	ZP +/-, K -
GSA I	(-)+	ZP +, K -	Gr +/+++, Ausl. ++	ZP +, K - oder ZP, K -	Gr +/++/+++, K -	Gr +/+++, K -	ZP +, Gr -, K -	ZP und K +/++	ZP +, K -
LTA	-	-	-	-	Gr +/+++, K -	-	-	-	-
WGA	-/+	ZP +, K +	Gr +/+++, Ausl. +/++	ZP -, K +/++	Gr +/++/+++, K -	Gr +/+++, K -	Gr +/+++, K -	Gr +/+++, K +	ZP +/+++, K ++
UEA I	-, (-)+	ZP +, K -	Gr +/++	-	Gr +/+++, K -	Gr +/+++, K -	-	-	-
VVA	-	ZP +, K +	Gr +/+++, Ausl. ++	ZP +, K +/++	Gr +/+++, K -	Gr +/++/+++, K -	Gr +/+++, K -	ZP +/+++, K +/++	ZP +, K +/++

ZP: Zytoplasma, Gr: Granula, K: Kern, Ausl.: Ausläufer, -: negativ, +: schwach positiv, ++: mittelgradig positiv, +++: stark positiv

## **V Diskussion**

Während die hämatopoietischen Zellen und speziell die HSC aus dem Nabelschnurblut beim Menschen gut erforscht sind (Mayani et al., 1998), liegen beim Rind über dieses Thema nur wenige Arbeiten vor (Kraft, 1965; Hubbert & Hollen, 1971; Frerking 1975; Fritsch et al., 1991). Es fehlen sowohl morphologische Beschreibungen sowie Marker, die diese Zellen näher charakterisieren (Fritsch et al., 1991).

Zur besseren morphologischen Charakterisierung der hämatopoietischen Zellen aus dem Nabelschnurblut beim Rind wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl lichtmikroskopische als auch elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Für die Lichtmikroskopie wurden neben nativen Ausstrichen auch mit Ammoniumchlorid-Lysispuffer und mit Ficoll<sup>®</sup> angereicherte Zellausstriche untersucht. Diese Anreicherung ist notwendig, da speziell die HSC in nur sehr niedrigen Konzentrationen im Nabelschnurblut vorhanden sind. Beim Neugeborenen wird der Gehalt von HSC im Nabelschnurblut auf ca. 1% aller MNC geschätzt (Traycoff et al., 1994, DeBruyn et al., 1995). Allerdings werden während der Fetalentwicklung im peripheren Blut Werte von ca. 3% der MNC erreicht (Wyrsh et al., 1999, Gasparoni et al., 2000, Tocci et al., 2003). Zur Präparation der Blutzellen aus dem Nabelschnurblut für die Elektronenmikroskopie wurde nach der Methode von Wantanabe (1967) vorgegangen, um eine Anreicherung der kernhaltigen Blutzellen zu erhalten.

### **1 Morphologie der reifen Blutzellen und deren Vorläufer**

In der kleinsten elektronenmikroskopisch untersuchten SSL von 3,4 cm treten hauptsächlich kernhaltige und kernlose Erythrozyten auf. Die kernlosen Erythrozyten zählen aufgrund ihrer Morphologie zu den definitiven erythroiden Zellen. (Winqvist, 1954). Während der Fetalentwicklung von SSL 1 cm und 1,6 cm sind 90-100% der Blutzellen kernhaltige primitive Erythrozyten. Obwohl von Rüsse et al. (1992) in der 6. Graviditätswoche (SSL 4,2 cm) noch primitive Erythroblasten im Dottersack beschrieben wurden, konnten unter den hier untersuchten Blutzellen in den kleinen Gefäßen des Nabels der SSL 3,4 cm keine primitiven Erythrozyten mehr gefunden werden. Die Degeneration des Dottersacks und der damit verbundene Abfall der primitiven Erythrozyten beginnt beim Wiederkäuer ca. ab der 6. Graviditätswoche (SSL 4,2 cm) (Rüsse et al., 1992). In diesem Zeitraum sinkt auch die Zahl der primitiven Erythrozyten in der Zirkulation stark ab. Sie werden durch die Zellstadien der definitiven Erythropoese ersetzt. Die definitiven Erythrozyten werden im weiteren Verlauf

der Gravidität in der Leber und schließlich im Knochenmark gebildet (Charbord et al., 1996). In den folgenden Proben (ab SSL 29 cm) wurden folglich ausschließlich definitive Erythrozyten und deren kernhaltige Vorläufer gefunden.

Während der Reifung der Erythrozyten nimmt ihr Hämoglobingehalt zu (Bessis, 1973; Schalm 1977; Jain, 1993). Sowohl in der Lichtmikroskopie als auch in der Elektronenmikroskopie konnte der steigende Hämoglobingehalt der Erythroblasten deutlich aufgrund der zunehmenden Eosinophilie bzw. Elektronendichte des Zytoplasmas nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um fetales Hämoglobin, das hauptsächlich während der fetalen Entwicklung in den Erythrozyten produziert wird (Hubbert & Miller, 1971). Selbst bei Geburt stellt das fetale Hämoglobin mit durchschnittlich 90% noch den Hauptanteil am Gesamthämoglobin (Tisdall & Crowley, 1971; Lee et al., 1971).

Sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch konnten die verschiedenen Stadien der Erythrozytenreifung beobachtet werden, wobei die Morphologie der einzelnen Zellen denen von Wilde (1964) und Kraft (1965) beschriebenen entsprechen. Im Stadium der orthochromatischen Erythroblasten wird der pyknotische Zellkern ausgeschleust, wobei um den freien Kern ein schmaler Zytoplasmasaum erkennbar ist. Im Zytoplasma des neu entstandenen kernlosen Retikulozyten befinden sich noch einige Zellorganellen. Das Stadium der Kernexpulsion konnte in den vorliegenden Untersuchungen sowohl licht-, als auch elektronenmikroskopisch im Nabelschnurblut gezeigt werden. Bei der Reifung von Retikulozyt zu Erythrozyt kommt es zur Exozytose und/oder Autophagozytose von Organellen in membranbegrenzten Zytolysosomen (Bessis, 1973; Ghadially, 1982). In den vorliegenden Untersuchungen trat in den Retikulozyten immer wieder Exozytose auf, wobei deutlich die Öffnung der Exozytose-Vesikel an der Zelloberfläche nach außen beobachtet werden konnte.

Im Zytoplasma der Erythrozyten verschiedener Reifungsstadien war manchmal elektronendichtes granuläres Material sichtbar. Dieses Material entspricht eisenhaltigen Substanzen, die entweder frei im Zytoplasma oder in membranbegrenzten Vakuolen angehäuft werden (Bessis, 1973). Auch in kernlosen Erythrozyten kommt elektronendichtes Material frei im Zytoplasma vor, welche als Siderosome beschrieben werden und in unreifen Erythrozyten auftreten (Bessis, 1973).

Der unreife Charakter vieler Erythrozyten im Nabelschnurblut spiegelt sich auch lichtmikroskopisch in der starken Anisozytose und Polychromasie sowie in der basophilen Tüpfelung wider, die in allen fetalen Proben vorhanden sind (Matovcik & Mentzer, 1985;

Schalm, 1977). In den Kälbern kurz vor und nach der Geburt nimmt die Häufigkeit dieser morphologisch unreifen Erythrozyten stark ab.

Als Besonderheit treten bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen in den neonatalen Erythrozyten elektronendurchlässige Vakuolen auf, die auf vermehrte Bildung von endozytotischen Vesikeln zurückzuführen sind. Die Entstehung dieser Vakuolen wurde bereits in Erythrozyten neugeborener Kinder und im humanen Nabelschnurblut beschrieben ((Matovcik & Mentzer, 1985; Schrier, 1987; Sills et al. , 1988). Normalerweise werden derartig veränderte Zellen in der Milz abgebaut. Das Auftreten dieser Vakuolen wurde daher früher als Anzeichen von Hyposplenismus bei Neonaten interpretiert. Neuere Untersuchungen bei Neugeborenen gehen jedoch davon aus, dass das stark gehäufte Auftreten dieser vakuolenhaltigen Erythrozyten die Abbaukapazität der Milz übersteigt und so diese Zellen vermehrt im peripheren Blut auftreten (Matovcik & Mentzer, 1985; Sills et al., 1988). Beim Kalb wurde dieses Phänomen bis jetzt noch nicht beschrieben. Neben diesen Vakuolen treten an der Zelloberfläche der reifen Erythrozyten Vertiefungen (engl: „pits“) auf, die den Beginn der oben beschriebenen endozytotischen Aktivität darstellen könnten (Holroyde et al., 1969; Matovcik & Mentzer, 1985).

Wie die Erythrozyten zeigen auch die Thrombozyten Anzeichen von Unreife.

In einigen Proben konnten lichtmikroskopisch außergewöhnlich große Thrombozyten beobachtet werden, die die Größe von Erythrozyten erreichten. Diese „Riesenthrombozyten“ zeigen im Elektronenmikroskop ausgeprägte Pseudopodien. Riesenformen der Thrombozyten sowie Pseudopodienbildung sind laut Kramer (2000) Charakteristika neu gebildeter Thrombozyten, die frisch von Megakaryozyten abgespalten worden sind. In der Humanmedizin wurde nachgewiesen, dass Megakaryozyten aus dem UCB trotz hohen Proliferationspotentials unreifer sind und eine geringere Polyploidie aufweisen als Megakaryozyten aus dem Knochenmark und so nur unzureichend Thrombozyten bilden (Cairo & Wagner, 1997; Bornstein et al., 2001). Da die bestehenden unreifen Megakaryozyten nicht genügend Thrombozyten bilden können, treten vermehrt auch unreife Formen im Blut auf. Der unreife Charakter der Plättchen aus dem Nabelschnurblut des Rindes selbst bei neugeborenen Kälbern könnte so auf ein ähnliches Reifungsdefizit der bovinen Megakaryozyten im Nabelschnurblut hinweisen.

In den Thrombozyten konnten peripher liegende Mikrofilamente nachgewiesen werden. Mikrofilamente bilden ein peripheres Band, das sowohl zur Aufrechterhaltung der Zellform wie auch zur Kontraktilität der Thrombozyten beiträgt (Zucker-Franklin, 1969). Wie von Takeuchi et al. (1990) beschrieben fehlten zentral liegende Mikrofilamentbündel. Ebenso

waren die in der Literatur beschriebenen Mikrotubuli nicht erkennbar (Meyers et al., 1982, DuPlessis et al., 1996, Takeuchi et al., 1990). Das Fehlen dieser Strukturen ist höchstwahrscheinlich auf die Fixierung der Proben für die Elektronenmikroskopie bei 4°C zurückzuführen (Zucker-Franklin, 1965).

Das Fehlen des so genannten offenen kanikulären Systems (open canicular system, OCS) beim Rind konnte in allen Stadien der Thrombozytenentwicklung bestätigt werden (Zucker-Franklin et al., 1985).

Obwohl zwischen SSL 5,2 und 12 cm ein gehäuftes Auftreten von Megakaryozyten im Blut von Kraft (1965) beschrieben wurde konnte in keiner meiner untersuchten Proben diese Zellen in Blutproben dieser SSL beobachtet werden. Lediglich elektronenmikroskopisch konnten in der Probe der SSL 42 cm Megakaryozyten nachgewiesen werden. Die Morphologie dieser Zellen entsprach im Wesentlichen dem beim Menschen beschriebenen Aufbau (Tanaka & Godman 1972; Bessis et al., 1973).

Die Beschreibung der neutrophilen Granulozyten und ihrer Vorläufer beim Rind beschränkt sich in der Literatur auf die Charakterisierung der auftretenden Granula und auf die funktionellen Aspekte der Reifung bei Granulozyten (Baggiolini et al., 1985; Gennaro et al., 1983, Van Merris et al., 2002). Lediglich bei den kleinen Wiederkäuern existieren einige umfassende Arbeiten über die Morphologie dieser Zellen (Anosa, 1992; Yamada & Sonoda 1970; Yamada & Sonoda 1972). Im Allgemeinen ähneln die verschiedenen Stufen der Granulopoiese beim Rind denen des Menschen (Bessis, 1973). Allerdings können ultrastrukturell beim Wiederkäuer drei verschiedene Typen an Granula differenziert werden (Gennaro et al., 1983; Baggiolini et al., 1985). In der vorliegenden Arbeit konnten im Elektronenmikroskop die verschiedenen Granulaarten allerdings kaum unterschieden werden, da ohne Peroxidase-Reaktion, alleine anhand der Morphologie, keine sichere Unterscheidung möglich ist (Baggiolini et al., 1985). Rein morphologisch konnten die aufgetretenen Granula in kleinere, elektronendichtere, möglicherweise spezifische, neutrophile Granula und in hellere, größere, z.T. längliche eingeteilt werden. Diese letzteren können zu den azurophilen Granula oder zu der dritten auftretenden Granulaart gezählt werden. Diese dritte Granulaart, die nicht identisch mit den so genannten tertiären Granula des Menschen und Kaninchen sind, tritt nur bei den Wiederkäuern auf und besitzt spezielle Enzyme, die ähnlich dem reaktiven Sauerstoff-System bakterizid wirken (Bertram, 1985). In der Elektronenmikroskopie konnten diese dritte Granulaart nicht eindeutig differenziert werden. Da die Morphologie und Elektronendichte der einzelnen Granulaarten stark von den verschiedenen Verarbeitungsmethoden der Proben und von den verwendeten Fixierungs- und

Kontrastierungslösungen abhängt, ist eine rein morphologische Klassifizierung allgemein schwierig (Tanaka & Goodman, 1972).

Die segmentkernigen und stabkernigen Granulozyten sowie die Metamyelozyten entsprechen elektronen- und lichtmikroskopisch denen des Menschen (Bessis, 1973, Heckner & Freund, 2001). Die Differenzierung der Myelozyten, Myeloblasten und Promyelozyten gestaltet sich schwieriger, da sowohl in der Giemsa als auch in der Schnellfärbung keinen azurophilen Granula in den Granulozytenvorläufern gefunden wurden. Elektronenmikroskopisch konnten die Promyelozyten und Myelozyten gut anhand der auftretenden Granula identifiziert werden. In den Promyelozyten wurden typischer Weise nur die azurophilen Granula beobachtet. Die neu gebildeten spezifischen Granula der Myelozyten lagern sich um den Golgi-Apparat an, von dem aus diese Granula entstehen (Bessis, 1973).

Wie die neutrophilen Granulozyten sind auch die eosinophilen Granulozyten des Rindes kaum untersucht. Insgesamt kommen eosinophile Granulozyten nur sehr vereinzelt in den Nabelschnurproben vor. Regelmäßig treten sie ab dem 4.-5. Graviditätsmonat auf. Dieses zeitliche Verteilungsmuster entspricht den Untersuchungen von Kraft (1965), Frerking (1975) und Hubbert & Hollen (1971). Die eosinophilen Granulozyten des Rindes unterscheiden sich hierbei stark von denen der kleinen Wiederkäuer. In den vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen traten elektronendichte, homogene und konzentrisch geschichtete eosinophile Granula auf. Im Gegensatz dazu besitzen die Granula der kleinen Wiederkäuer kristalloide oder honigwabenartige Struktur und unterscheiden sich somit deutlich von den bovinen (Anosa, 1992; Yamada & Sonoda, 1970).

In der vorliegenden Arbeit konnten, wie auch in den Untersuchungen von Hubbert und Hollen (1971) keine basophilen Granulozyten im Nabelschnurblut der Feten verschiedener SSL und der neugeborenen Kälber gefunden werden. Frerking (1975) hingegen zählte bei Feten ab einer SSL von 50 cm einen Gehalt an basophilen Granulozyten von  $< 0,5\%$  und auch Kraft (1965) konnte ab 45 cm SSL einzelne basophile Granulozyten nachweisen. Diese Beobachtung kann für das Nabelschnurblut nicht bestätigt werden.

Die Lymphozyten der bovinen Feten unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der anderen Haussäugetiere und des Menschen (Bessis, 1973, Sonoda & Marshak, 1970). Die Lymphozytenpopulation des Rindes lässt sich ebenfalls anhand des abnehmenden Zytoplasmagehaltes in verschiedene Reifungsstadien einteilen (Jain, 1993).

Mittlere und große Lymphozyten besitzen beim Rind manchmal Nukleoli (Sonoda & Marshak; 1970; Schalm, 1977). Jain (1986) ordnet die Nukleoli-haltigen Lymphozyten den Lymphoblasten zu. Nukleoli in Lymphozyten konnten in meiner Arbeit allerdings nur

elektronenmikroskopisch, nicht aber lichtmikroskopisch beobachtet werden. Sonoda & Marshak (1970) beschreiben in bovinen Lymphozyten immer wieder Einlagerungen im Kern, die in den vorliegenden Untersuchungen nicht auftraten. Jedoch konnten bei vielen Lymphozyten mit der Kernmembran assoziierte Membranstapel gezeigt werden.

In den vorgelegten elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten im Nabelschnurblut das Rindes immer wieder Blutzellen beobachtet werden, die durch das Auftreten zahlreicher Profile des rER charakterisiert sind. Die Anschnitte des unregelmäßig mit Ribosomen besetzten ERs sind ovoid und verteilt über das gesamte Zytoplasma. Diese Zellen wurden von mir als Monozyten klassifiziert. Die von Sonoda & Marshak (1970) beschriebenen Monozyten besitzen zwar einen etwas geringeren Gehalt an ER, stimmen aber ansonsten in ihrer Morphologie mit den von mir dargestellten Zellen weitgehend überein. Ein hoher Gehalt an endoplasmatischem Retikulum tritt in Zellen auf, die eine hohe Proteinsyntheseleistung besitzen (Rüsse & Sinowatz, 1991). Da Monozyten viele verschiedene lysosomale Enzyme produzieren, könnte der hohe ER-Gehalt dadurch bedingt sein (Jain, 1993).

In den neutrophilen Granulozyten, den Lymphozyten und den Monozyten traten immer wieder Membranstrukturen im Kern, an der Kernmembran sowie frei im Zytoplasma auf. Diese in Stapeln angeordneten oder konzentrisch geschichteten Membranen wurden bis jetzt in den Blutzellen beim Rind noch nicht beschrieben. Möglicherweise stellen sie Membranreste aus der Zellteilung der Vorläuferzellen dar, da sie meist assoziiert mit der Kernmembran liegen. In Betracht zu ziehen ist auch eine Artefakt-Bildung, da die Zellen vor der Fixierung zentrifugiert wurden. Allerdings weisen die Zellorganellen, insbesondere die Mitochondrien und die Zell- und Kernmembranen eine intakte Ultrastruktur auf (Ghadially, 1982), so dass eine Entstehung dieser Membranstrukturen durch prozessbedingte Einflüsse weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Zudem traten sowohl in den licht- als auch elektronenmikroskopischen Untersuchungen phagozytierende Zellen auf. Ultrastrukturell waren Lysosomen deutlich erkennbar, die pyknotische Zellkerne von Erythrozyten, Thrombozyten, Fibrin und andere nicht mehr differenzierbare, zelluläre Bestandteile beinhalteten. Diese Zellen zählen aufgrund ihres hohen Gehalts an Lysosomen und ihrer Phagozytosefähigkeit zu dem mononukleären Phagozytose System (MPS) und sind für die Beseitigung von apoptotischen Zellen und Zellfragmenten im hämatopoietischen System zuständig. Die beobachtete Erythrophagozytose findet während der fetalen Entwicklung hauptsächlich in den ortsansässigen Makrophagen der Leber (Kupffer-Zellen und zentrale Makrophagen der erythroblastischen Inseln), der roten Milzpulpa und des Knochenmarks statt (Rifkind, 1965; Hertzberg & Orlic, 1980). In der

vorliegenden Arbeit konnten diese phagozytierenden MPS-Zellen im Nabelschnurblut nachgewiesen werden, wobei diese Zellen nur von SSL 28,5 bis 42 cm beobachtet worden sind.

## **2 Kinetik der Blutzellen während der Gravidität**

Im Zuge der lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die Gesamtleukozytengehalt manuell in einer Neubauerkammer ausgezählt sowie Differentialblutbilder angefertigt. Da in den kleinen SSL die kernhaltigen Erythrozyten überwiegen und Vorläuferzellen aller Blutzelllinien eher selten auftreten, wurden dreimal 200 kernhaltige Blutzellen ausgezählt. Die Gesamtleukozytenzahl wurde anschließend durch Subtraktion der kernhaltigen roten Blutzellen von der Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen errechnet (Hubbert & Hollen, 1971). So konnten neben den Leukozyten auch die kernhaltigen Erythrozyten in absoluten Werten dargestellt werden.

Der dabei beobachtete Abfall der kernhaltigen Erythrozyten steht im Einklang mit den Ergebnissen der Arbeiten von Hubbert und Hollen (1971), Kraft (1965) und Frerking (1975) bestätigt. Ein vorübergehender Anstieg der kernhaltigen Erythrozyten bei den Feten der SSL 19 cm bis 31 cm wurde auch von Hubbert und Hollen (1971) im fetalen Herzblut berichtet. Ein zweites Maximum an kernhaltigen Erythrozyten tritt in den hier aufgeführten Ergebnissen bei SSL um 50 cm auf, wobei dieser Anstieg in keiner der bisherigen Untersuchungen beobachtet werden konnte. Der hohe Gehalt an kernhaltigen Erythrozyten im Nabelschnurblut kann mit dem erhöhten Bedarf an reifen Erythrozyten während des Wachstums und dem damit verbundene gesteigerten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf der Feten im letzten Drittel der Gravidität erklärt werden (Rüsse & Sinowatz, 1991).

In der vorliegenden Arbeit verhalten sich die Leukozyten im Nabelschnurblut während der Gravidität entgegengesetzt zu den kernhaltigen Erythrozyten und steigen kontinuierlich an. Diese Entwicklung wird durch Veröffentlichung von Kraft (1965), Hubbert und Hollen (1971) und Frerking (1975) bestätigt. Von diesen Veröffentlichungen unterteilte nur Kraft (1965) die einzelnen Blutzelllinien in Vorläufer und reife Zellen. Ab einer SSL von 29,5 cm steigen die Metamyelozyten, die stab- und segmentkernigen Granulozyten an, hingegen treten Myeloblasten und Promyelozyten über die gesamte Gravidität hinweg sehr vereinzelt (1 Zelle/2000 Erythrozyten) im fetalen Blut auf. In den vorliegenden Untersuchungen kann das stark vereinzelt Auftreten der Myeloblasten und Promyelozyten bestätigt werden. Die Metamyelozyten sowie die stab- und segmentkernigen Granulozyten nehmen auch in den



vorliegenden Untersuchungen entsprechend der Ergebnisse von Kraft (1965) zu. Die Kinetik der einzelnen Blutzelllinien im Nabelschnurblut spiegelt so im Wesentlichen das sukzessive Auftreten der einzelnen Blutzellfraktionen wieder, wobei die hier ermittelten Werte wie auch in der Untersuchung von Kraft (1965) stark schwanken. Obwohl Rinder ein lymphozytäres Blutbild besitzen, kommen im peripheren Blut neugeborener Kälber mehr neutrophilen Granulozyten als Lymphozyten vor, so dass das Verhältnis neutrophile Granulozyten zu Lymphozyten (N:L) 2,8 beträgt. Der physiologische N:L-Wert für adulte Rinder liegt im Bereich von 0,5 (Jain, 1993; Tennant et al., 1974). In den hier durchgeführten Untersuchungen übertrifft die Zahl der Lymphozyten in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien die Anzahl der neutrophilen Granulozyten.

In den Nabelschnurblutproben, die unmittelbar nach der Geburt gewonnen wurden, verhielt sich der N:L-Wert stark variabel. Obwohl im peripheren Blut neugeborener Kälber durchwegs von einem granulozytärem Blutbild berichtet wird (Tennant et al., 1974), konnte dies für das Nabelschnurblut nicht nachgewiesen werden. Die normalerweise ausgeprägte Neutrophilie und Lymphopenie wird auf den erhöhten Glukokortikoidspiegel im Blut des Muttertiers und des Fetus zurückgeführt (Tennant et al., 1973; Lee & Kehrl., 1998, Hoeben et al., 1999). Hoyer et al. (1990) stellte eine Korrelation zwischen Stress während der Geburt, Glukokortikoidspiegel und Verhalten der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut her. Hierbei zeigte sich, dass bei großem Stress (Schweregeburt, Kaiserschnitt) während der Geburt die sowohl die Neutrophilie als auch die Lymphopenie ausgeprägter ausfallen. In den hier untersuchten Nabelschnurblutproben konnte allerdings keine Korrelation zwischen Schwere der Geburt und Anzahl der einzelnen Blutzellen hergestellt werden.

### **3 Immunhistologische Untersuchungen**

#### **3.1 Vorkommen und Bedeutung des Proliferationsmarkers Ki-67 im Nabelschnurblut**

Mit dem immunhistochemischen Nachweis des nukleären Proliferationsmarkers Ki-67 können Zellproliferationsvorgänge in Geweben sichtbar gemacht werden (Cattoretti et al., 1992). Ki-67 ist nicht nur während der Mitose hochreguliert, sondern beginnt bereits am Ende der G<sub>1</sub>-Phase zu steigen, so dass auch in der S- und G<sub>2</sub>-Phase erhöhte Expression vorhanden ist. Die stärkste Expression wird am Ende der G<sub>2</sub>-Phase und in der Mitose gemessen (Gerdes et al., 1984; Sawhey & Hall 1992).

Die Bildungsstätte der Blutzellen liegt während der Fetalentwicklung in den einzelnen hämatopoietischen Organen Dottersack, AGM-Region, Leber, Milz und Knochenmark. In diesen Lokalisationen finden auch die Zellteilungen statt (Gasper, 2000). Jedoch konnten in meinen Untersuchungen auch Ki-67 und somit mitotisch aktive Zellen im Nabelschnurblut beobachtet werden.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung des Nabelschnurblutes mit dem Proliferationsmarker konnte im Laufe der Gravidität eine abnehmende Proliferation unter den Lymphozyten nachgewiesen werden. Die abnehmende Teilungsaktivität der Lymphozyten könnte auf einen Veränderten Bedarf an diesen Zellen hinweisen. Laut Jain (1993) stellen die Lymphozyten im Fetus die ersten immunologisch aktiven Blutzellen dar. Erst ab der Hälfte der Gravidität beginnen die reifen Granulozyten als Effektorzellen im Immunsystem zu wirken, bis dahin übernehmen die Lymphozyten die Immunabwehr (Jain, 1993). Diese Aufgabe könnte einen erhöhten Bedarf an Lymphozyten nach sich ziehen.

Hingegen waren alle Erythrozytenvorläufer unabhängig von Trächtigkeitsstadium positiv. Dies weist darauf hin, dass sich die kernhaltigen Erythrozytenstadien während der gesamten Gestation teilen, und unmittelbar aus den hämatopoietischen Organen in das Blut ausgeschüttet werden, um den enormen Bedarf an reifen Erythrozyten zu decken (Alsalamy et al., 1999 ).

Die weitgehend fehlende Expression von Ki-67 in anderen Blutzellen weist darauf hin, dass diese Zellen sich entweder nicht mehr teilen (postmitotische reife Blutzellen, Effektorzellen) oder zumindest keine mitotisch aktiven Stadien dieser Zellen im Nabelschnurblut auftreten. Die Zellteilungen finden demnach in den hämatopoietischen Organen statt (Gasper, 2000).

### **3.2 Vorkommen und Bedeutung von CD68 im Nabelschnurblut**

Zum Nachweis von Monozyten und zur Charakterisierung der stark vakuolisierten Zellen, die in den Gestationsstadien der SSL 18-42 cm auftraten, wurden immunhistologische Untersuchungen unter Verwendung des CD68-Antikörpers durchgeführt.

Im Gegensatz zu Kraft (1965) treten in den hier untersuchten Proben Monozyten bereits ab einer SSL von 18 cm auf. Kraft (1965) beobachtete beruhend auf rein morphologischen Untersuchungen Monozyten erst ab einer SSL von 24 cm.

Der Abfall der CD68<sup>+</sup> Zellen ab der SSL 42 cm steht im Gegensatz zu den rein morphologischen Untersuchungen, in denen die Anzahl der Monozyten ansteigt. Diese Diskrepanz kann darin begründet liegen, dass die Monozyten beim Rind anhand rein

morphologischer Kriterien nur sehr schwer charakterisiert werden können (Wilde, 1964; Kramer, 2000).

Die stark vakuolisierten Blutzellen reagierten ebenfalls mit dem CD68-Antikörper. Daher können diese Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit dem MPS-System zugeordnet werden. In der Literatur konnten keine Angaben über derartige Zellen gefunden werden. Sie wurden auch noch nicht im Nabelschnurblut beschrieben.

Diese Zellen könnten die Aufgabe der Phagozytose im Nabelschnurblut übernehmen und z.B. ausgeschleuste Erythrozytenkerne oder andere Zellfragmente phagozytieren.

Elektronenmikroskopisch konnte derartige Inhalt in den Vakuolen nachgewiesen werden.

## **4 Isolation und Charakterisierung der HSC im Nabelschnurblut**

### **4.1 Morphologie der HSC im Nabelschnurblut**

Ganz vereinzelt konnten in den elektronenmikroskopisch untersuchten Proben Zellen nachgewiesen werden, die morphologisch sehr primitiven Blutzellen entsprechen und somit Stammzellen darstellen könnten. Sie besitzen alle einen relativ großen runden euchromatischen Kern und ein ribosomenreiches Zytoplasma. Diese Morphologie entspricht der ultrastrukturellen Beschreibung der HSC bei Nagern und dem Menschen (van Bekkum et al., 1971; Dicke et al., 1973; van Bekkum et al., 1979; Visser et al., 1984; Thiele et al., 1995; Servida et al. 1996; Radley et al., 1999; Deliliers et al., 2001). In den Leukozytenangereicherten Proben wurden lichtmikroskopisch primitive Zellen beobachtet, die morphologisch keiner bestimmten Blutzelllinie zugeordnet werden konnten. Diese primitiven Zellen wiesen die von Dicke et al. (1973), Wickenhäuser et al. (1995) und Thiele et al. (1995) beschriebenen Charakteristika hämatopoietischer Stammzellen auf. Allerdings können diese Zellen lichtmikroskopisch nicht mit letzter Sicherheit als HSC angesprochen werden, da diese auf Grund ihres lymphoiden Aussehens sehr leicht mit anderen mononukleären Zellen verwechselt werden können (Wickenhäuser et al., 1995; Thiele et al., 1995).

Fritsch et al. (1991) reichert bovine Progenitoren aus dem Knochenmark mit Hilfe der Durchflußzytometrie auf Basis von Zellgröße und -dichte, bzw. Granularität und Vorhandensein verschiedener Oberflächenantigene an. Die meisten Progenitoren, die auch in der Lage waren, *in vitro* Kolonien zu bilden, besaßen eine relative Dichte von  $< 1,077$  g/ml, eine mittlere Größe und geringe Granularität. Bei Kultivierung erwiesen sich die isolierten Zellen als Progenitoren und nicht als Stammzellen, da sie immer auf eine bestimmte Blutzelllinie festgelegt waren (Fritsch et al., 1991).

## 4.2 Vorkommen und Bedeutung von CD34 und c-kit im Nabelschnurblut

Licht- und elektronenmikroskopisch gelingt die eindeutige Charakterisierung der HSC nur mit Hilfe immunologischer Nachweismethoden. Im Gegensatz zur Humanmedizin fehlen beim Rind jedoch kommerziell erhältliche, spezifische anti-bovine Antikörper zum Nachweis der HSC. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Antikörper zur Charakterisierung der bovinen HSC hergestellt. Es wurden die Oberflächenproteine CD34 und c-kit ausgewählt, die bei Mensch und Maus gut erforscht sind und als Stammzellmarker herangezogen werden. Da sowohl die Proteinsequenz für das bovine CD34 als auch für das bovine c-kit bekannt ist (Hikono et al., 1999; Zhou et al., 2001), wurden Peptidsequenzen bestehend aus 15 Aminosäuren aus dem extrazellulären Anteil der Oberflächenmarker ausgewählt.

Die Immunisierung erfolgte nach einem Standardprotokoll zur Herstellung von Antikörpern im Eidotter von Legehennen. Als Aufreinigungsprotokoll wurde das Ammoniumchlorid-Dextran-Verfahren gewählt, da nach diesem Protokoll die höchsten Mengen an Antikörper im nicht-chromatographischen Verfahren aus dem Dotter isoliert werden können (Fischer et al., 1996). Der IgG-Gehalt der einzelnen Antikörperpräparationen wurde durch Extinktionsmessung bestimmt. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass es bei allen zwölf untersuchten Proben (sechsmal FIA, sechsmal PCSL) zu einer Antikörperproduktion und –übertragung ins Eidotter kam, da die Werte der Extinktionsmessung vor der Immunisierung immer unter denen der immunisierten Hühner lagen.

### 4.2.1 Charakterisierung und immunhistochemischer Nachweis von CD34

CD34 gilt, trotz der angesprochenen Kontroverse über CD34<sup>+</sup> oder CD34<sup>-</sup> HSC, als einer der wichtigsten Stammzellmarker. Obwohl sehr viel über Vorkommen und Funktion bei Mensch und Maus bekannt ist (Tavian et al., 1996, Bhatia et al., 1998), ist dieser Stammzellmarker beim Rind noch weitgehend unerforscht (Zhou et al., 2001). Für die Erforschung von Vorkommen und Verteilung des bovinen CD34 fehlten anti-bovine Antikörper. Auch besteht keine Kreuzreaktivität bei Verwendung von anti-humanen CD34-Antikörpern (Sopp et al., 1997, Kritzenberger & Wrobel, 2004). Aus diesen Gründen wurden in der vorgelegten Arbeit anti-bovine CD34-Antikörper hergestellt und charakterisiert sowie das Vorkommen von CD 34 in bovinem Gewebe untersucht.

Im ELISA gelang die Detektion von CD34 in der fetalen bovinen Leber mit keiner der drei Dotterantikörper gegen das bovine CD34. Sowohl in den Antikörper-Verdünnungsstufen 1:1000 als auch 1:4000 konnten keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden, da sich die

Extinktionswerte immer auf einem gleich bleibendem Niveau bewegten. Daher muss für alle drei anti-bovinen CD34-Antikörper von einer unspezifischen Bindung ausgegangen werden, die unabhängig von der Verdünnung des eingesetzten Leberhomogenats bestehen. Diese unspezifischen Reaktionen traten auf, obwohl die Negativkontrollen unter Verwendung von Bicarbonat-Puffer pH 9,6 anstelle des Leberhomogenats negativ waren.

In der Immunhistochemie an Blutaussstrichen zeigten die aus dem Dotter der immunisierten Hühner hergestellten Antikörper gegen das bovine CD34-Antigen eine Reaktion mit myeloiden Vorläufern, neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und Lymphozyten. In den Gewebeschnitten reagierten Blutzellen in der fetalen Leber sowie in peripheren Gefäßen. Die große Anzahl dieser Zellen in der fetalen Leber des Rindes steht im Gegensatz zu der geringen Häufigkeit der CD34<sup>+</sup>-Blutzellen in der humanen fetalen Leber, die je nach Autor mit 0,6 bis 15 % angegeben wird (Anderson et al., 1996; Weekx et al., 1996; Gilles et al., 1997; Pahal et al., 2000). Zudem zeigte sich auch in kernlose Zellen, die als Erythrozyten angesprochen werden müssen, eine positive Reaktion mit diesen Antikörpern, obwohl die Erythrozyten in den Blutaussstrichen durchwegs negativ sind. Die Bindung der anti-bovinen CD34 Antikörper an Thrombozyten und Granulozyten steht im Gegensatz zu dem Reaktionsmuster bei Mensch und Maus (Terstappen et al., 1991; Tjonnfjord et al., 1996; Sutherland et al., 1992). Beim Mensch weisen als einzige die primitiven myeloiden Vorläuferzellen noch CD34-Protein auf ihrer Oberfläche auf (Deliliers, 2001). Zhou et al. (2001) produzierten einen monoklonalen anti-bovinen CD34-Antikörper, der allerdings nur ein sehr schwaches Signal beim Nachweis von CD34<sup>+</sup>-HSC in der fetalen Leber ergab (Zhou et al., 2001). Die von anderen Autoren beim Menschen beobachtete Reaktion von CD34 mit Endothelien, embryonalen Fibroblasten und Zellen des Nervensystems konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht beobachtet werden (Fina et al., 1990; Baumhüter et al., 1995; Lin et al., 1995).

Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen und des Western Blots sprechen für einen unspezifische Reaktion dieser Antikörper. In der Immunhistologie kann ein scheinbar spezifisches Reaktionsmuster mit Thrombozyten und Granulozyten im Blutaussstrich sowie mit kernlosen und kernhaltigen Blutzellen im Gewebeschnitt beobachtet werden. In den Gewebeschnitten der bovinen Feten fehlte allerdings eine Bindung an die Strukturen, die beim Menschen als positiv beschrieben wurden (Fina et al., 1990; Baumhüter et al., 1995; Lin et al., 1995).

Es bleibt die Frage, ob die Expression von CD34 beim Rind vergleichbar mit der des Menschen ist. Zhou et al. (2001) detektierte im Northern Blot CD34-RNA in Gehirn, Milz, Lunge und Herz von fetalen Kälbern. Allerdings war das Auftreten einer CD34-RNA in der Leber kaum nachweisbar (Zhou et al., 2001). Beim Menschen wurde bis jetzt noch keine RNA für CD34 in Lunge und Herz nachgewiesen. In wie weit auch CD34-Protein in diesen Geweben beim Rind exprimiert wird, bleibt allerdings offen.

Es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die von mir hergestellten anti-CD34 Antikörper in der Immunhistologie spezifisch mit dem entsprechenden Oberflächenprotein reagieren, obwohl die Negativkontrollen stets negativ waren. In den parallel durchgeführten Immunreaktionen mit den IgG-Präparationen aus den Kontrolleiern, die vor der ersten Immunisierung der Legehennen gewonnen wurden, zeigte sich eine schwache, in allen Geweben auftretende Reaktion, die nicht vergleichbar war mit der Reaktion der Antikörper, die nach Immunisierung der Legehennen gewonnen wurden.

### 4.2.2 Charakterisierung und immunohistochemischer Nachweis von c-kit

Der zweite in der in der hämatopoietischen Stammzellforschung wichtige Zellmarker ist das Oberflächenprotein c-kit. Der anti-c-kit Antikörper reagiert vorrangig mit Progenitoren, die bereits aktiviert sind und nicht mehr den ruhenden Charakter der primitiven Stammzellen besitzen (Reisbach et al., 1993, Ashman et al., 1991). Für das Rind existieren auch hier keine kommerziell erhältlichen Antikörper, so dass eigene anti-bovine c-kit Antikörper durch Immunisierung von Legehennen gewonnen wurden, die anschließend im ELISA und Western Blot sowie in der Immunhistologie spezifiziert wurden.

Aufgrund des Reaktionsmusters im ELISA kann für die drei c-kit Antikörper von einer spezifischen Bindung ausgegangen werden. Im ELISA konnte für die drei c-kit Antikörper der FIA-Gruppe ein Titer bestimmt werden. Hierbei weist der Antikörper D die höchste Sensivität unter den drei c-kit Antikörpern der FIA-Gruppe auf.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der im ELISA reagierenden Proteine wurde für den Antikörper D ein Western Blot durchgeführt. Es wurde entsprechend dem Molekulargewicht des humanen c-kit auch beim Rind eine Bande im Bereich von ca. 140 – 155 kDa erwartet (Ashman et al., 1999; Broudy, 1997; Majumder et al., 1988). In dem ExcelGel-Gel mit dem Auftrennungsbereich 35 – 200 kDa konnten allerdings nur Banden mit erheblich niedrigerem Molekulargewicht detektiert werden, die in der Auftrennung auf den PhastGel-Gel (Auftrennungsbereich 15 – 150 kDa) als 15, 19 und 35 kDa-Banden sichtbar wurden. Als Grund für das Auftreten mehrerer Proteinfragmente kleinerer Molekulargewichte kommt der

Zerfall des ursprünglichen Proteins in unterschiedlich kurze Fragmente in Frage. Wobei davon ausgegangen werden muss, dass mindesten drei solcher Proteinfragmente aufgetreten sind. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass der Antikörper kleinere Proteine gebunden hat, die nicht c-kit sind, sondern nur eine ähnliche Aminosäuresequenz aufweisen und somit mit den Antikörpern kreuzreagieren.

In der Immunhistologie zeigten die drei anti-bovinen c-kit-Antikörper ein spezifisches Bindungsmuster, das teilweise identisch mit dem Reaktionsverhalten eines anderen c-kit Antikörpers aus einer Veröffentlichung von Kritzenberger & Wrobel (2004) ist. Die Bindung des anti-c-kit-Antikörpers an Nervenzellen in den Spinalganglien und an das Rückenmark sowie an das Epithel der Bronchien ist in beiden Arbeiten vergleichbar. Allerdings reagierten in der vorliegenden Untersuchung nur vereinzelte Nervenzellen in den Spinalganglien und im Rückenmark, wohingegen bei Kritzenberger & Wrobel (2004) das gesamte Rückenmark und alle Zellen der Spinalganglien positiv erscheinen. Auch bindet der c-kit-Dotterantikörper nur an die Oberflächendifferenzierungen der Bronchien und nicht an das gesamte Epithel. Im Gegensatz zu der Untersuchung von Kritzenberger & Wrobel (2004) und dem Verteilungsmuster in humanen Geweben (Ashman et al., 1999; Rossi et al., 2000) konnte keine positive Reaktion in den Endothelien und in den primordialen Keimzellen des fetalen und adulten Hoden sowie in Melanozyten festgestellt werden (Ashman et al., 1999). Das Auftreten von c-kit in den Osteoblasten der fetalen Knochen wurde bis jetzt noch nicht beschrieben. Lediglich wurde die Expression dieses Antigens in Osteoklasten des Menschen nachgewiesen, wobei die Osteoblasten SCF (c-kit-Ligand), aber kein c-kit (Rezeptor) exprimieren (Gattei et al., 1996).

Laut Hikono et al. (2001a) verhalten sich 1,5 % der Blutzellen im peripheren Blut adulter Kühe c-kit-positiv, wobei diese ein lymphoides Aussehen besitzen und lymphoide Marker (CD3, IgM) coexprimieren. Diese lymphoiden c-kit-exprimierenden Zellen sind die vorherrschende Population unter den c-kit<sup>+</sup> Zellen des peripheren Blutes beim Rind (Hikono et al., 2001a). Für die Blutzellen im Nabelschnurblut konnte in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls eine positive Reaktion in lymphoiden Zellen nachgewiesen werden. Diese c-kit<sup>+</sup> lymphoiden Zellen könnten Stammzellen bzw. sehr primitive Vorläuferzellen sein, da sie sowohl morphologisch den lymphoiden Charakter dieser Zellen besitzen, als auch mit dem Stammzellmarker reagieren.

Die zusätzlich auftretende Bindung an kernhaltige Erythrozyten, Granulozyten und deren Vorläufer sowie an Thrombozyten wurde in den Untersuchungen an peripheren Blutzellen von Hikono et al. (2001a) allerdings nicht beschrieben.

Hingegen wurde in der Maus eine geringe Expression von c-kit bei Promyelozyten und Myelozyten beschrieben, wobei auch ca. 50% der eosinophilen Granulozyten und Monozyten des murinen Knochenmarks c-kit-positiv sind (Metcalf & Nicola, 1991). Im Widerspruch zu meinen Ergebnissen steht auch das ausdrückliche Fehlen von c-kit in kernhaltigen Erythrozyten der Maus (Metcalf & Nicola, 1991). In allen immunhistologischen Versuchen mit den Dotterantikörpern gegen das bovine c-kit reagierte der Antikörper D am stärksten mit den jeweiligen Strukturen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen aus den ELISA-Tests.

Neben den eigenproduzierten Dotterantikörpern wurde ein kommerziell erhältlicher polyklonaler anti-c-kit Antikörper (sc-168, Santa Cruz Biotechnology) in der Immunhistochemie verwendet, der bereits beim Schaf als kreuzreaktiv getestet wurde (Tisdall et al., 1999; Mehri et al., 2001). An den Gewebeproben des Rindes und an den bovinen Blutaussstrichen reagiert dieser Antikörper ähnlich wie die Dotterantikörper, jedoch fiel die Reaktion insgesamt sehr schwach aus. Das Bindungsmuster bei den Blutzellen glich im Wesentlichen denen der c-kit-Dotterantikörpern. Es kam zu spezifischen Bindungen in den Blutvorläufern der bovinen fetalen Leber, in den Nervenzellen der Spinalganglien sowie im Rückenmark der Rinderfeten. Bei Verwendung dieses c-kit-Antikörpers im fetalen Hoden der SSL 3,3 bis 13 cm zeigte sich eine schwache Reaktion mit den Leydig-Zellen, wohingegen die primordialen Keimzellen wiederum negativ blieben. Merhi et al. (2001) beschrieben ebenfalls eine Reaktion dieses Antikörpers mit den Leydig-Zellen des adulten Schafes. Auch bei der Maus ist dieses Reaktionsmuster von c-kit bekannt (Rossi et al., 2000). Da Kritzenberger & Wrobel (2004) mit diesem Antikörper keine Immunfärbung an bovinen Gewebeschnitten detektierten, besteht die Möglichkeit, dass die schwache Reaktion dieses Antikörpers auf einer geringen Kreuzreaktivität zu bovinem Gewebe beruht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Reaktionsmuster der drei von mir hergestellten anti-bovinen c-kit Antikörper sich teilweise mit den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen deckt (Ashman et al., 1999; Hikono et al. 2001a; Hikono et al. 2001b; Rossi et al., 2000; Kritzenberger & Wrobel 2004). Obwohl im Western Blot keine Bindung an ein Protein mit entsprechendem Molekulargewicht nachgewiesen werden konnte, scheinen die Antikörper spezifisch an bereits als c-kit-positiv beschriebene Strukturen im bovinen Fetus zu binden.



## 5 Vorkommen und Bedeutung der Zuckerreste im Nabelblut

Zur Darstellung der verschiedenen Glykokonjugate im bovinen Nabelschnurblut wurden FITC-gekoppelte Lektine verwendet. Diese neun verwendeten Lektine (Tab. 7) bieten die Möglichkeit die Kohlehydratstruktur der Zellmembran, der Oberflächenrezeptoren und der intrazellulären Bestandteile der Blutzellen zu untersuchen (Lis und Sharon, 1986). Beim Rind ist insbesondere das Lektinbindungsmuster der Lymphozyten gut beschrieben. Die meisten Lymphozyten binden demnach Con A, WGA und SBA (Pearson et al., 1979; Johanson et al., 1983; Djilali et al., 1987). In meinen Untersuchungen konnte das Reaktionsmuster der Lymphozyten gegenüber Con A und WGA bestätigt werden, allerdings war keine positive Reaktion der Lymphozyten nach Inkubation mit SBA zu beobachten. Zusätzlich zu den oben erwähnten Lektinen reagierten die bovinen Lymphozyten des Nabelschnurblutes mit VVA, ECA und GSA I. Eine bevorzugte Reaktion von PNA mit T-Lymphozyten (Pearson et al., 1979; Johanson et al., 1983), konnte nicht bestätigt werden, da PNA in den verwendeten Blutaussstrichen alle lymphoiden Zellen färbte. Diese Ergebnisse zeigen, dass in den bovinen Lymphozyten Zucker der Glukose/Mannose-, N-Acetylglukosamin- und N-Acetylgalaktosamin-Gruppen auftreten. Da weder eine Bindung von LTA, noch von UEA-I an Lymphozyten auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass in den bovinen Lymphozyten keine freien L-Fucose-Bindungsstellen vorhanden sind. Die fehlende Reaktion nach Inkubation mit UEA wird durch die Untersuchungsergebnisse von Pearson (1979) bestätigt. Bei Verwendung von mitogenen Lektinen (Con A, WA, PNA, SBA) in der Zellkultur wurden kaum Unterschiede im Proliferations- und Transformationspotential von fetalen und adulten Lymphozyten gefunden (Tierney & Simpson-Morgan, 1997). Dies entspricht den Ergebnissen aus meinen glykohistochemischen Untersuchungen, da auch hier keine Unterschiede in dem Lektinbindungsverhalten zwischen Lymphozyten aus kleinen SSL (10 cm) und geburtsreifen, bzw. neugeborenen Kälbern auftraten.

Entsprechend der Beobachtung, dass ovine neutrophile Granulozyten eine Vielzahl von Lektinen binden, wurde auch in meinen Untersuchungen an den bovinen Nabelschnurblutproben eine Reaktion aller verwendeten Lektine mit den Granula der neutrophilen Granulozyten beobachtet. Das granuläre Bindungsmuster für die Lektine WGA, Con A, UEA-I, ECA, SBA und PNA tritt auch in den neutrophilen Granulozyten des Menschen auf (Kuemmel et al., 1996). Es konnte in einer Doppelfärbung mit Con A und WGA gezeigt werden, dass die beiden Lektine spezifisch zwei unterschiedliche Granulaarten binden. Dieses Lektinbindungsverhalten spiegelt die Heterogenität der Kohlehydratgruppen in den verschiedenen Granula der neutrophilen Granulozyten wider (Haig et al., 1990). Auch die

eosinophilen Granulozyten des Schafes reagierten in den Untersuchungen von Haig et al. (1990) mit allen verwendeten Lektinen. Ebenso zeigen die eosinophilen Granula des Menschen eine positive Reaktion mit WGA und Con A sowie schwach mit UEA-I, SBA, ECA und PNA (Kuemmel et al., 1996). Die bovinen eosinophilen Granulozyten aus dem Nabelschnurblut hingegen wiesen nach Inkubation mit LTA-FITC, UEA I-FITC und ECA-FITC keine Fluoreszenz auf.

Ebenso wie die Granulozyten zeigen auch die bovinen Thrombozyten mit allen verwendeten Lektinen außer LTA eine positive Reaktion. In der Humanmedizin wurde für WGA und Con A eine wichtige Rolle in der Thrombozytenaggregation sowie in der Fibrininteraktion nachgewiesen (Rendu et al., 1984; Chow et al., 1985; Daimon et al., 1989). Die eindeutig positive Reaktion dieser beiden Lektine mit den bovinen Plättchen legt eine entsprechende Funktion beim Rind nahe. Zudem unterstützt die positive Reaktion der Thrombozytenausläufer mit Con A diese Theorie.

Entsprechend den Untersuchungen von Craig et al. (1992) an humanen Blutzellen binden einige Lektine, wie z.B. Con A, PNA und ECA an alle bovinen Blutzellen außer an Erythrozyten. In den vorliegenden Untersuchungen konnte zudem eine positive Reaktion von GSA I, WGA und VVA mit allen auftretenden Blutzellen mit Ausnahme der Erythrozyten nachgewiesen werden.

In den lektinhistochemischen Untersuchungen konnte nie eine ausgeprägte Bindung der verwendeten Lektine an Erythrozyten und deren Vorläufer gezeigt werden.

Humane Erythrozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl an verschiedenen Glykoproteinen und -lipiden, die charakteristisch für eine bestimmte Blutgruppe sind und spezifisch mit einzelnen Lektinen reagieren. Auf diese Weise werden in der Humanmedizin über eine Hämagglutination die verschiedenen Blutgruppen des ABH-Systems bestimmt (Boyd & Regura 1949; Khan et al., 2002).

Die fehlende Reaktion der erythroiden Zellen des Rindes mit den neun verwendeten Lektinen in den vorliegenden Untersuchungen ist daher auffällig. Für das Lektin Con A gibt es Untersuchungen, demnach dieses Lektin bovine Erythrozyten zwar bindet, aber keine Hämagglutination herbeiführen kann (Hines et al., 1972; Ostrand-Rosenberg, 1976). Das Lektin VVA wird mit Glykokonjugaten der bovinen Blutgruppen V und I' in Verbindung gebracht (Miller & Hubbert, 1975). In der aktuellen Untersuchung konnte jedoch keine Reaktion dieser beiden Lektine mit Erythrozyten nachgewiesen werden.

Unreife große Blutzellen färbten sich mit den verwendeten Lektinen nur sehr schwach an. Nur die Vorläufer der Granulozyten konnten anhand ihrer positiven Granula einer Blutzell-Linie

zugeordnet werden. Die mäßige Bindung der Lektine an unreife Blutzellen könnte im Zusammenhang mit der geringeren Expression an Differenzierungsmolekülen stehen dieser Zellen stehen.

Das glykohistochemische Verhalten der Stammzellen konnte nicht interpretiert werden, da diese Zellen sich alleine anhand der morphologischen Kriterien nicht mit Sicherheit identifizieren lassen.

## VI Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die hämatopoietischen Zellen des bovinen Nabelschnurblutes und insbesondere die HSC zu charakterisieren. Hierzu wurden Proben aus dem Nabelblut von bovinen Feten der SSL 3,4 cm bis 94 cm und von Kälbern unmittelbar nach der Geburt gewonnen und mit Ammoniumchlorid-Lysispuffer und Ficoll<sup>®</sup> aufgereinigt. Zur Charakterisierung der einzelnen Zellen wurden lichtmikroskopische, immunhistochemische, glykohistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Morphologisch unterscheiden sich die einzelnen Typen von Blutzellen verschiedener SSL nicht. Allerdings verändert sich die Verteilung der einzelnen Blutzellen während der Gravidität erheblich. Im Laufe der Fetalentwicklung steigt die Anzahl der kernhaltigen Zellen an (SSL 8,5 und 10 cm), verläuft dann aber sehr variabel. Der prozentuale Anteil der kernhaltigen Erythrozyten-Vorläufer fällt hierbei von nahezu 100% bei SSL 8,5 auf 0% bei Geburt ab. Die Anzahl der Leukozyten hingegen entwickeln sich wesentlich uneinheitlicher. Im Wesentlichen steigt der Gehalt der Leukozyten von  $244 \pm 120$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  Blut bei SSL 10 cm auf  $10886 \pm 94/\mu\text{l}$  bei SSL 94 cm an. In der kleinsten lichtmikroskopisch untersuchten SSL von 8,5 cm konnten noch keine Leukozyten nachgewiesen werden. Die ersten ab SSL 10 cm auftretenden Leukozyten sind Lymphozyten. Die Granulozyten und ihre Vorläufer verhalten sich während der Gravidität sehr variabel.

Die licht- und elektronenmikroskopisch Untersuchungen ergaben, dass die reifen Blutzellen sowie ihre Vorläufer morphologisch den Zellen des Menschen ähnlich sind, aber dennoch einige Unterschiede aufweisen. In den kernlosen Erythrozyten des bovinen Nabelschnurblutes neugeborener Kälber traten immer wieder Erythrozyten auf, die elektronenmikroskopisch sichtbare Vakuolen aufweisen. Diese Vakuolen weisen, wie auch beim Menschen, auf eine gewisse Unreife dieser Zellen hin. Auch bei den Thrombozyten wurden atypische unreife Formen nachgewiesen, die mit  $5 - 7 \mu\text{m}$  deutlich größer als normale bovine Thrombozyten waren und plumpe weitgehend organellenfreie Zytoplasmafortsätze aufwiesen. Die bovinen Monozyten besitzen im Vergleich zum Menschen in ihrem Zytoplasma extrem viel raues endoplasmatisches Retikulum. Im bovinen Nabelschnurblut der SSL 28,5 und 42 cm konnten licht- und elektronenmikroskopisch sowie immunzytochemisch (CD68) stark vakuolisierte Zellen nachgewiesen werden, die als Makrophagen klassifiziert wurden. Diese Zellen phagozytieren ausgeschleuste Kerne orthochromatischer Erythroblasten, Thrombozyten, Fibrin und andere Zellfragmente und sind so an der Beseitigung von Zellbestandteilen aus

dem zirkulierenden Blut beteiligt. Elektronenmikroskopisch konnten in den neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten immer wieder Stapel aus Membranen beobachtet werden, die frei im Zytoplasma, assoziiert mit der Kernmembran oder im Kern selbst auftraten. Diese Membranen könnten als Überreste aus den Zellteilungsvorgängen auf die mitotische Aktivität dieser Zellen hinweisen.

Zusätzlich zu den klassifizierbaren Zellen der einzelnen Blutzelllinien konnten während der gesamten Trächtigkeit Blutzellen beobachtet werden, die sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch einen wenig differenzierten unreifen Charakter aufwiesen und der Morphologie der humanen HSC entsprachen. Diese Zellen traten allerdings nur sehr vereinzelt auf und wurden lichtmikroskopisch nur in den angereicherten Proben beobachtet. In der Humanmedizin werden HSC durch das Auftreten von verschiedenen Stammzellmarkern definiert, da die Charakterisierung anhand rein morphologischer Aspekte nur schwer möglich ist. Die beiden am häufigsten verwendeten Stammzellmarker CD34 und c-kit (CD117) sind für das Rind nicht kommerziell verfügbar und wurden deshalb durch Immunisierung von Legehennen mit je drei Peptid-Antigenen hergestellt. Anschließend wurden die IgY-Antikörper durch eine Ammoniumsulfat-Dextran-Fällung aus dem Dotter isoliert. Bei der Charakterisierung dieser gewonnenen Antikörper im ELISA und Western Blot, konnte nur für die anti-bovinen c-kit-Antikörper eine spezifische Bindung nachgewiesen werden. Im Western Blot zeigte sich allerdings nicht die erwartete Bande im Bereich zwischen 140-155 kDa, sondern die detektierten Banden befanden sich im Bereich zwischen 15 und 35 kDa. Alle drei anti-c-kit Antikörper zeigten in der Immunhistologie ein spezifisches Verteilungsmuster im bovinen fetalen Gewebe und in den Blutausstrichen. Das Auftreten einer positiven Reaktion in den Spinalganglien, Rückenmarksnervenzellen und in der Oberflächendifferenzierung des Bronchialepithels der bovinen Feten sowie in lymphoiden Zellen des Nabelschnurblutes deckt sich mit dem bereits beschriebenen Verteilungsmuster dieses Proteins.

In den glykohistochemischen Untersuchungen mit den direkt FITC-markierten Lektinen PNA, Con A, ECA, SBA, GSA I, LTA, WGA, UEA I und VVA konnte nur eine sehr schwache Bindung der Lektine an Vorläuferzellen beobachtet werden, wohingegen die reifen Blutzellen und insbesondere die neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten stark mit fast allen eingesetzten Lektinen reagierten.

## VII Summary

### **Isolation and characterization of hematopoietic stem cells in the bovine umbilical cord blood**

The objective of the present studies was to characterize the hematopoietic cells in the bovine umbilical cord blood (UCB) particularly the hematopoietic stem cells (HSC). For this purpose blood was collected at the slaughterhouse from fetuses with 3,4 to 94 cm CRL and from calves right after birth. The mononuclear cells of the blood samples were enriched by ammonium-chloride-lysisbuffer and Ficoll<sup>®</sup>. For the characterization of the blood cells light and electron microscopic techniques as well as immunohistological and glycohistochemical methods were employed.

Morphologically there are no differences between the blood cells of different CRLs, but the number of cells changed dramatically. In small CRLs the nucleated blood cells increase. In the following gestational stages there are great variations in the number of nucleated blood cells. The percentage of nucleated red blood cells decreased from nearly 100% at CRL 8,5 and 10 cm to 0% at birth. The number of leukocytes was heterogeneous. In general the leukocytes increased from  $244 \pm 120/\mu\text{l}$  UCB (CRL 10 cm) to  $10886 \pm 94/\mu\text{l}$  (CRL 94 cm). In the smallest CRL of 8,5 cm no leukocytes could be detected. The first appearing leukocytes were lymphocytes. The granulocytes and their progenies showed a very variable numbers throughout gestation.

Concerning the morphology of the bovine blood cells and their progenies they were comparable to human blood cells. Electron microscopically the non-nucleated erythrocytes of the UCB of newborn calves possessed numerous vacuoles. These vacuoles were also detected in human erythrocytes and correspond to the immature character of the red blood cells in the UCB. As well the thrombocytes show an immature morphology with giant forms (5-7  $\mu\text{m}$ ) and nearly organell-free clumsy pseudopods. In difference to the human monocytes the bovine ones showed much more rough endoplasmic reticulum. Blood cells with numerous vacuoles were detected by electron and light microscopy in the UCB of fetuses of 28,5 to 42 cm CRL, which were characterized immunohistochemically as CD68-positive. These cells were classified as macrophages.

In the neutrophilic granulocytes as well as in the lymphocytes and monocytes stacks of membranes appeared. They were localized either dispersed in the cytoplasm and nucleoplasm or were associated with the nuclear envelope. These membranes could be residues of the cell cycle and display the immature character of these cells in the UCB.

In addition to the well defined cells of the various blood cell lineages blood cells could be observed, which correspond to the non-differentiated character described for human HSC. These cells were scarce in the bovine UCB. By light microscopy they only were detected in the enriched preparations of lysis-buffer or Ficoll<sup>®</sup> treated samples. The characterization of HSC based on morphology is very difficult, because of their lymphocyte-like appearance. To identify these cells for sure you need stem cell markers. The most often used stem cell markers for humans are CD34 and c-kit (CD117).

For a better characterization of the observed stem cell-like UCB-cells we developed antibodies against the above mentioned stem cell markers. For that purposed laying hens were immunized with peptides synthesized of 15 amino acids belonging to the extracellular region of these two bovine proteins. The IgG-antibodies were isolated from the eggs by precipitation with ammoniumsulfate and dextran. In order to determine the specificity and sensitivity of these antibodies ELISA-tests and western Blots were employed. The antibodies against the bovine CD34-protein fail to achieve satisfying results. Only the three antibodies against the bovine c-kit showed a specific reaction in the ELISA. In the Western Blot a reaction with proteins of the molecular weight 15 to 35 kDa was detected, although the estimated molecular weight for the bovine c-kit-protein was 140-155 kDa. However, in the immunohistochemical stainings the anti-bovine c-kit antibodies showed a characteristic distribution in bovine fetal tissue. The detection of c-kit in the spinal ganglions, in the neurons of the spinal cord as well as in the bronchial epithelium of bovine fetuses is in agreement with the distribution in human tissues. In regard to the UCB lymphoid cells were c-kit-positive. In addition to these positive cells and tissues a positive reaction was observed in osteoblasts, thrombocytes and granulocytes. To determine the distribution of different sugar residues in the cells of the UCB the binding patten of nine different lectins (PNA, Con A, ECA, SBA, GSA I, LTA, WGA, UEA I and VVA) was investigated. Neutrophilic granulocytes and thrombocytes display a strong reaction with most of the lectins whereas the progenies showed only a weak reaction if at all.

## VIII Literaturverzeichnis

**Aglietta M, Bertolini F, Carlo-Stella C, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Olivieri A, Siena S, Zanon P, Tura S (1998)**

Ex vivo expansion of hematopoietic cells and their clinical use.  
Haematologica 83: 824-48.

**Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000)**

A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.  
Nature 404: 193-7.

**Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Aazam M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB (1995)**

Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo.  
Exp Cell Res. 220: 194-200.

**Allsopp RC, Cheshier S, Weissman IL (2001)**

Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells.  
J Exp Med 193: 917-24.

**Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, Harley CB, Weissman IL. (2003)**

Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation.  
Blood 102: 517-20.

**Alsalami MT, Fillippich LJ. (1999)**

Haematology of foetal sheep.  
Aust Vet J. 77: 588-94.

**Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaun J, Dieterlen-Lievre F. (2003)**

Mouse placenta is a major hematopoietic organ.  
Development 130: 5437-44.

**Anderson EM, Jones DR, Liu DT, Evans AA. (1996)**

Gestational age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal hematopoietic progenitor cell preparations.  
Fetal Diagn Ther. 11: 427-32.

**Anosa VO. (1993)**

Ultrastructure of developing and mature caprine leukocytes.  
Anat Histol Embryol. 22: 328-41.

**Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. (2001)**

HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation.  
Exp Hematol 29: 1125-34.

**Ashman LK, Cambareri AC, To LB, Levinsky RJ, Juttner CA. (1991)**

Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow.  
Blood 78: 30-7.

**Ashman LK. (1999)**

The biology of stem cell factor and its receptor C-kit.  
Int J Biochem Cell Biol 31: 1037-51.

**Ashraf MT, Khan RH. (2003)**

Mitogenic lectins.  
Med Sci Monit.9: RA265-9.



**Baggiolini M, Horisberger U, Gennaro R, Dewald B. (1985)**

Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Itrastructure of circulating and maturing cells.

Lab Invest. 52: 151-8.

**Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. (1992)**

Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population.

Proc Natl Acad Sci U S A 189: 2804-8.

**Baumhüter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA. (1993)**

Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34.

Science 262: 436-8.

**Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. (1963)**

Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.

Nature. 197: 452-54.

**Behn I I, Hommel U, Oertel M, Hauschildt S. (1996)**

Kinetics of IgY Formation after Immunisation of Hens with Different Protein Antigens.

ALTEX. 13: 18-21.

**Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Donini A, Dorotea L, Tonutti E, Rinaldi C, Pittino M, Baccarani M, Del Frate G, Biffoni F, Sala P, Hilbert DM, Degrassi A. (1999)**

Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34+ cells.

Blood Cells Mol Dis 25: 141-6.

**Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID. (1988)**

Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons.

J Clin Invest. 81: 951-5.

**Bessis M. (1973)**

In: Living blood cells and their ultrastructure. Bessis M, Weed RI, eds.

Springer-Verlag Berlin.

**Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. (1998)**

A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity.

Nat Med. 4: 1038-45.

**Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. (1997)**

Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 94: 5320-5.

**Bicknese AR, Goodwin HS, Quinn CO, Henderson VC, Chien SN, Wall DA. (2002)**

Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia.

Cell Transplant. 11: 261-4.

**Blackburn EH. (1992)**

Telomerases.

Annu Rev Biochem. 61: 113-29.

**Bornstein R, Garcia-Vela J, Gilsanz F, Auray C, Cales C. (2001)**

Cord blood megakaryocytes do not complete maturation, as indicated by impaired establishment of endomitosis and low expression of G1/S cyclins upon thrombopoietin-induced differentiation.

Br J Haematol. 114: 458-65.

**Boyd WC, Regura RM (1949)**

Haemagglutinating substances in various plants.

J Immunol. 62: 333-9.

**Boyd WC, Shapleigh E. (1954)**

Diagnosis by subgroups of blood groups A and AB by use of plant agglutinins (lectins).  
J Lab Clin Med. 44: 235-7.

**Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertocello I. (1997)**

Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment.  
Exp Hematol. 25: 445-53.

**Brandt J, Briddell RA, Srour EF, Leemhuis TB, Hoffman R. (1992)**

Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells.  
Blood 79: 634-41.

**Broudy VC, Lin N, Zsebo KM, Birkett NC, Smith KA, Bernstein ID, Papayannopoulou T. (1992)**

Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor.  
Blood. 79: 338-46.

**Broudy VC. (1997)**

Stem cell factor and hematopoiesis.  
Blood. 90: 1345-64.

**Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. (1991)**

The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts.  
Int Immunol. 3: 175-84.

**Brümmendorf TH, Dragowska W, Zijlmans JMJM, Thornbury G, Lansdorp PM. (1998)**

Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells.  
J Exp Med 188: 1117-24.

**Bruno L, Hoffmann R, McBlane F, Brown J, Gupta R, Joshi C, Pearson S, Seidl T, Heyworth C, Enver T. (2004)**

Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro.  
Mol Cell Biol. 24: 741-56.

**Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP. (1998)**

Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice.  
Blood. 92: 2269-79.

**Bunting KD, Zhou S, Lu T, Sorrentino BP. (2000)**

Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo.  
Blood. 96: 902-9.

**Cairo MS, Wagner JE. (1997)**

Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation.  
Blood. 90: 4665-78.

**Capel B, Hawley R, Covarrubias L, Hawley T, Mintz B. (1989)**

Clonal contributions of small numbers of retrovirally marked hematopoietic stem cells engrafted in unirradiated neonatal W/W<sup>v</sup> mice.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 86: 4564-8.

**Cardoso AA, Li ML, Batard P, Hatzfeld A, Brown EL, Levesque JP, Sookdeo H, Panterne B, Sansilvestri P, Clark SC. (1993)**

Release from quiescence of CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 90: 8707-11.

- Cashman JD, Lapidot T, Wang JC, Doedens M, Shultz LD, Lansdorp P, Dick JE, Eaves CJ. (1997)**  
Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice.  
Blood. 89: 4307-16.
- Charbord P, Tavian M, Humeau L, Peault B. (1996)**  
Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment.  
Blood. 87: 4109-19.
- Chaudhary PM, Roninson IB. (1991)**  
Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells.  
Cell. 66: 85-94.
- Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, Broxmeyer HE, Cooper S, Hague N, Moore M, Lasky LA. (1996)**  
Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34.  
Blood. 87: 479-90.
- Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN. (2003)**  
Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening.  
Nucleic Acids Res. 31: 1576-83.
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. (1999)**  
In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 3120-5.
- Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. (1996)**  
Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow.  
Stem Cells 14: 239-48.
- Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. (1995)**  
Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional.  
Blood. 85: 402-13.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. (1998)**  
A common precursor for hematopoietic and endothelial cells.  
Development. 125: 725-32.
- Chow TW, McIntire LV, Peterson DM. (1985)**  
Role of the membrane concanavalin A binding site in platelet-fibrin interactions.  
Biochim Biophys Acta. 812: 512-22.
- Christensen JL, Weissman IL. (2001)**  
Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 14541-6.
- Christianson SW, Greiner DL, Hesselton RA, Leif JH, Wagar EJ, Schweitzer IB, Rajan TV, Gott B, Roopenian DC, Shultz LD. (1997)**  
Enhanced human CD4+ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice.  
J Immunol. 158: 3578-86.
- Civin CI, Trischmann T, Kadan NS, Davis J, Noga S, Cohen K, Duffy B, Groenewegen I, Wiley J, Law P, Hardwick A, Oldham F, Gee A. (1996)**  
Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis.  
J Clin Oncol. 14: 2224-33.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. (1990)**  
Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues.  
J Histochem Cytochem. 38: 1277-87.

**Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. (1992)**  
Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.  
EMBO J. 11: 1921-9.

**Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. (1994)**  
Telomerase activity in human ovarian carcinoma.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 91: 2900-4.

**Craig WH, Thomas TE, Lansdorp PM. (1992)**  
Use of lectins for characterization and purification of human bone marrow cells that express CD34.  
J Hematother. 1: 55-64.

**Cumano A, Dieterlen-Lievre F, Godin I. (1996)**  
Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura.  
Cell. 86: 907-16.

**Cumano A, Ferraz JC, Klaine M, Di Santo JP, Godin I. (2001)**  
Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution.  
Immunity. 15: 477-85.

**Daimon T, Sano-Martins IS. (1989)**  
Alterations of wheat-germ agglutinin binding pattern on cell surface of blood platelets after thrombin stimulation.  
Histochemistry. 91: 461-7.

**D'Arena G, Cascavilla N, Musto P, Greco M, Di Mauro L, Carella AM, Dello Iacono N, Carotenuto M. (1996)**  
Flow cytometric characterization of CD34+ hematopoietic progenitor cells in mobilized peripheral blood and bone marrow of cancer patients.  
Haematologica. 81: 216-23.

**D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Carotenuto M. (1998)**  
Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34+ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study.  
Haematologica. 83: 587-92.

**de Bruijn MF, Peeters MC, Luteijn T, Visser P, Speck NA, Dzierzak E. (2000a)**  
CFU-S(11) activity does not localize solely with the aorta in the aorta-gonad-mesonephros region.  
Blood. 96: 2902-4.

**de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, Dzierzak E. (2000b)**  
Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo.  
EMBO J. 19: 2465-74.

**de Bruyn C, Delforge A, Bron D, Bernier M, Massy M, Ley P, de Hemptinne D, Stryckmans P. (1995)**  
Comparison of the coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR antigens on CD34+ purified cells from human cord blood and bone marrow.  
Stem Cells. 13: 281-8.

**Deliliers GL, Caneva L, Fumiatti R, Servida F, Rebulli P, Lecchi L, De Harven E, Soligo D. (2001)**  
Ultrastructural features of CD34+ hematopoietic progenitor cells from bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood.  
Leuk Lymphoma. 42: 699-708.

**Dicke KA, van Noord MJ, van Bekkum DW. (1973)**  
Attempts at morphological identification of the hemopoietic stem cell in rodents and primates.  
Exp Hematol. 1: 36-45.

**Dieterlen-Lievre F. (1975)**

On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach.  
Embryol Exp Morphol. 33: 607-19.

**DiGiusto D, Chen S, Combs J, Webb S, Namikawa R, Tsukamoto A, Chen BP, Galy AH. (1994)**

Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34.  
Blood. 84: 421-32.

**Djilali S, Boulouis HJ, Montagutelli X. (1987)**

Lymphocyte markers in domestic animals. I. Mitogenic lectins and non-mitogenic lectins.  
Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 10: 187-204.

**Donnelly DS, Zeltermann D, Sharkis S, Krause DS. (1999)**

Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations.  
Exp Hematol. 27: 788-96.

**Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gatringer C, Huber H, Andreeff M. (1992)**

Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. Blood. 80: 2729-34.

**du Plessis L, Botha AJ, Stevens K. (1996)**

Ultrastructure of buffalo, *Syncerus caffer*, platelets: comparison with bovine and human platelets.  
J Morphol. 229: 309-14.

**Elwood N. (2004)**

Telomere biology of human hematopoietic stem cells.  
Cancer Control. 11: 77-85.

**Ema H, Nakauchi H. (2000)**

Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo.  
Blood. 95: 2284-8.

**Ema H, Nakauchi H. (2003)**

Self-renewal and lineage restriction of hematopoietic stem cells.  
Curr Opin Genet Dev. 13: 508-12.

**Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. (2000)**

In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells.  
J Exp Med. 192: 1281-8.

**Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MA. (1997)**

Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells.  
Blood. 90: 182-93.

**Erhard MH, Mahn K, Schmidt P, Oltmer S, Preisinger R, Zinsmeister P, Stangassinger M. (2000a)**

Evaluation of various immunisation procedures in laying hens to induce high amounts of specific egg yolk antibodies.  
ALTA. 28: 63-80.

**Erhard MH, Özpınar H, Bilal T, Abbas Y, Kutay C, Eseceli H, Stangassinger M. (2000b)**

The humoral response and the productivity of laying hens kept on the ground or in cages.  
ALTA. 28: 699-705.

**Erices A, Conget P, Minguell JJ. (2000)**

Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.  
Br J Haematol. 109: 235-42.

**Fackler MJ, Civin CI, May WS. (1992)**

Up-regulation of surface CD34 is associated with protein kinase C-mediated hyperphosphorylation of CD34.  
J Biol Chem. 267: 17540-6.

**Farmilo AJ, Stead RH. (2003)**

Fixierung. In: Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage, Boenisch H, DakoCytomation Corp., Carpinteria.

**Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. (2000)**

Schalm's Veterinary Hematology, 5<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

**Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. (1990)**

Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. Blood 75: 2417-26.

**Fischer M, Hlinak A, Montag T, Claros M, Schade R, Ebner D. (1996)**

Vergleich von Standardmethoden zur Präparation von Dotterentikörpern. Tierärztl Prax. 24: 411-8.

**Flake AW, Harrison MR, Adzick NS, Zanjani ED. (1986)**

Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras. Science. 233: 776-8.

**Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Spangrude GJ, Weissman IL. (1993)**

Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. J Cell Biol. 122: 897-902.

**Frerking H. (1975)**

Entwicklung des Blutbildes beim Rinderfetus während der zweiten Hälfte der Tragzeit. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 88: 264-9.

**Fritsch G, Nelson RT, Muiya P, Naessens J, Black SJ. (1991)**

Characterization of bovine haemopoietic progenitor cells using monoclonal antibodies and fluorocytometry. Vet Immunol Immunopathol. 27: 277-92.

**Fritsch G, Stimpfl M, Kurz M, Printz D, Buchinger P, Fischmeister G, Hoecker P, Gadner H. (1996)**

The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood. Bone Marrow Transplant. 17: 169-78.

**Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Siebert HC. (2002)**

The sugar code: functional lectinomics. Biochim Biophys Acta. 1572: 165-77.

**Gabius HJ, Gabius S. (1993)**

Detection of tumor-associated expression of carbohydrate-binding proteins (lectins). The use of neoglycoproteins and neoglycoenzymes in glycohistochemical and glyco cytological studies. Methods Mol Biol. 14: 263-75.

**Gabius HJ. (1997)**

Concepts of tumor lectinology. Cancer Invest. 15: 454-64.

**Gabius HJ. (2000)**

Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. Naturwissenschaften. 87: 108-21.

**Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. (2000)**

Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. Blood. 95: 2813-20.

- Garcia-Porrero JA, Manaia A, Jimeno J, Lasky LL, Dieterlen-Lievre F, Godin IE. (1998)**  
Antigenic profiles of endothelial and hemopoietic lineages in murine intraembryonic hemogenic sites.  
*Dev Comp Immunol.* 22: 303-19.
- Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini MA, Bonfichi M, di Mario M, Piazzini G, Martinotti L, Vanelli L, Rondini G, Chirico G. (2000)**  
Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation.  
*Pediatr Res.* 47: 825-9.
- Gasper PW. (2000)**  
The hematopoietic system. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5<sup>th</sup> ed., Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 63-68.
- Gattei V, Aldinucci D, Quinn JM, Degan M, Cozzi M, Perin V, Iulii AD, Juzbasic S, Improta S, Athanassou NA, Ashman LK, Pinto A. (1996)**  
Human osteoclasts and preosteoclast cells (FLG 29.1) express functional c-kit receptors and interact with osteoblast and stromal cells via membrane-bound stem cell factor.  
*Cell Growth Differ.* 7: 753-63.
- Gennaro R, Dewald B, Horisberger U, Gubler HU, Baggiolini M. (1983)**  
A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils.  
*J Cell Biol.* 96: 1651-61.
- Ghadially FN. (1982)**  
Ultrastructural pathology of the cell and matrix, 2<sup>nd</sup> ed.  
Butterworths, London.
- Gilles JM, Divon MY, Bentolila E, Rotenberg OD, Gebhard DF, Rashbaum WK, Lyman WD. (1997)**  
Immunophenotypic characterization of human fetal liver hematopoietic stem cells during the midtrimester of gestation.  
*Am J Obstet Gynecol.* 177: 619-25.
- Glimm H, Oh IH, Eaves CJ. (2000)**  
Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G(2)/M transit and do not reenter G(0).  
*Blood.* 96: 4185-93.
- Gluckman E. (2000)**  
Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation.  
*Exp Hematol.* 28: 1197-205.
- Godin I, Dieterlen-Lievre F, Cumano A. (1995a)**  
B-lymphoid potential in pre-liver mouse embryo.  
*Semin Immunol.* 7: 131-41.
- Godin I, Dieterlen-Lievre F, Cumano A. (1995b)**  
Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 773-7.
- Godin IE, Garcia-Porrero JA, Coutinho A, Dieterlen-Lievre F, Marcos MA. (1993)**  
Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors.  
*Nature.* 364: 67-70.
- Goldstein IJ, Poretz RD. (1986)**  
Isolation, Physicochemical Characterization, and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins. In: The Lectins - Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ, eds., Academic Press, Orlando. 33-243.

**Goodall A. (1908)**

Haematogenesis in foetal sheep.  
J Pathol Bacteriol. 12: 191-210.

**Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. (1996)**

Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.  
J Exp Med. 183: 1797-806.

**Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP. (1997)**

Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species.  
Nat Med. 3: 1337-45.

**Goodell MA. (1999)**

CD34(+) or CD34(-): does it really matter?  
Blood. 94: 2545-7.

**Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Greaves MF. (1987)**

Characterisation of stroma-dependent blast colony-forming cells in human marrow.  
J Cell Physiol. 130: 150-6.

**Gordon MY, Hibbin JA, Kearney LU, Gordon-Smith EC, Goldman JM. (1985)**

Colony formation by primitive haemopoietic progenitors in cocultures of bone marrow cells and stromal cells.  
Br J Haematol. 60: 129-36.

**Gordon MY, Marley SB, Davidson RJ, Grand FH, Lewis JL, Nguyen DX, Lloyd S, Goldman JM. (2000)**

Contact-mediated inhibition of human haematopoietic progenitor cell proliferation may be conferred by stem cell antigen, CD34.  
Hematol J. 1: 77-86.

**Greenwood MJ, Lansdorp PM. (2003)**

Telomeres, telomerase, and hematopoietic stem cell biology.  
Arch Med Res. 34: 489-95.

**Greiner DL, Shultz LD, Yates J, Appel MC, Perdrizet G, Hesselton RM, Schweitzer I, Beamer WG, Shultz KL, Pelsue SC. (1995)**

Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice.  
Am J Pathol. 146: 888-902.

**Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. (1999)**

Mammalian telomeres end in a large duplex loop.  
Cell. 97: 503-14.

**Haar JL, Ackerman GA. (1971)**

A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse.  
Anat Rec. 170: 199-224.

**Habibian HK, Peters SO, Hsieh CC, Wu J, Vergilis K, Grimaldi CI, Reilly J, Carlson JE, Frimberger AE, Stewart FM, Quesenberry PJ. (1998)**

The fluctuating phenotype of the lymphohematopoietic stem cell with cell cycle transit.  
J Exp Med. 188: 393-8.

**Haig DM, Brown D, Thomson J. (1990)**

Phenotypic analysis of ovine bone marrow cells using monoclonal antibodies and ectins.  
Vet Immunol Immunopathol. 25: 219-33.

**Harley CB, Futcher AB, Greider CW. (1990)**

Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.  
Nature. 345: 458-60.



**Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. (1992)**

The telomere hypothesis of cellular aging.  
Exp Gerontol. 27: 375-82.

**Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. (2001)**

CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors.  
Stem Cells. 19: 304-12.

**Hartnett BJ, Yao D, Suter SE, Ellinwood NM, Henthorn PS, Moore PE, McSweeney PA, Nash RA, Brown JD, Weinberg KI, Felsburg PJ. (2002)**

Transplantation of X-linked severe combined immunodeficient dogs with CD34+ bone marrow cells.  
Biol Blood Marrow Transplant. 8: 188-97.

**Hartwig JH. (1992)**

Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation.  
J Cell Biol. 118: 1421-42.

**Hayflick L. (1965)**

The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.  
Exp Cell Res. 37: 614-36.

**Healy L, G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. (1995)**

The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 12240-4.

**Heckner F, Freund M. (2001)**

Praktikum der mikroskopischen Hämatologie, 10., korrigierte Aufl., Urban & Fischer, München.

**Hellman S, Botnick LE, Hannon EC, Vigneulle RM. (1978)**

Proliferative capacity of murine hematopoietic stem cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 75: 490-4.

**Herbst R, Munemitsu S, Ullrich A. 1995**

Oncogenic activation of v-kit involves deletion of a putative tyrosine-substrate interaction site.  
Oncogene. 10: 369-79.

**Hikono H, Ohta M, Kubota T, Zhou JH, Inumaru S, Sakurai M. (1999)**

Production and characterization of monoclonal antibodies that recognize bovine Kit receptor.  
Vet Immunol Immunopathol. 68: 101-12.

**Hikono H, Ohta M, Sakurai M, Momotani E. (2001a)**

Expression of Kit, the receptor for stem cell factor, in bovine peripheral blood.  
J Vet Med Sci. 63: 321-4.

**Hikono H, Ohta M, Zhou JH, Sakurai M. (2001b)**

Expression and distribution of the Kit receptor in bovine bone marrow cells.  
Am J Vet Res. 62: 974-7.

**Hines HC, Uhlenbruck G, Schmid DO. (1972)**

Possible relationship between concanavalin A reactivity and the bovine A blood group system.  
Vox Sang. 22: 529-31.

**Hodgson GS, Bradley TR. (1979)**

Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell?  
Nature. 281: 381-2.

**Hoeben D, Burvenich C, Massart-Leen AM, Lenjou M, Nijs G, van Bockstaele D, Beckers JF. (1999)**

In vitro effect of ketone bodies, glucocorticosteroids and bovine pregnancy-associated glycoprotein on cultures of bovine bone marrow progenitor cells of cows and calves.  
Vet Immunol Immunopathol 68: 229-240.

**Hofmann A, Erhard M, Schmidt P, Bessler W, Wiesmuller H, Zinsmeister P, Stangassinger M, Löscher U. (1996)**

Lipopeptide als Adjuvantien bei der Immunisierung von Legehennen.  
ALTEX.13: 26-29.

**Hogan CJ, Shpall EJ, McNulty O, McNiece I, Dick JE, Shultz LD, Keller G. (1997)**

Engraftment and development of human CD34(+)-enriched cells from umbilical cord blood in NOD/LtSz-scid/scid mice.  
Blood. 90: 85-96.

**Holyoake TL, Nicolini FE, Eaves CJ. (1999)**

Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow.  
Exp Hematol. 27: 1418-27.

**Houssaint E, Hallet MM. (1988)**

Inability of adult circulating haemopoietic stem cells to sustain haemopoiesis in mouse fetal liver microenvironment.  
Immunology. 64: 463-7.

**Houssaint E. (1981)**

Differentiation of the mouse hepatic primordium. II. Extrinsic origin of the haemopoietic cell line.  
Cell Differ. 10: 243-52.

**Hu MC, Chien SL. (1998)**

The cytoplasmic domain of stem cell antigen CD34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling.  
Blood. 91: 1152-62.

**Huang E, Nocka K, Beier DR, Chu TY, Buck J, Lahm HW, Wellner D, Leder P, Besmer P. (1990)**

The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus.  
Cell. 63: 225-33.

**Huang S, Terstappen LW. (1994)**

Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells.  
Blood. 83: 1515-26.

**Hubbert WT, Hollen EJ (1971).**

Cellular blood elements in the developing bovine fetus.  
Am J Vet Res. 32: 1213-9.

**Hubbert WT, Miller WJ. (1971)**

Developmental polymorphism in bovine hemoglobin.  
Am J Vet Res. 32: 1723-30.

**Huss R. (2000)**

Isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources.  
Stem Cells. 18: 1-9.

**Ikuta K, Kina T, MacNeil I, Uchida N, Peault B, Chien YH, Weissman IL. (1992)**

Development of gamma delta T-cell subsets from fetal hematopoietic stem cells.  
Ann N Y Acad Sci. 651: 21-32.

**Ikuta K, Weissman IL. (1992)**

Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 89: 1502-6.

**Ito T, Tajima F, Ogawa M. (2000)**

Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells.  
Exp Hematol. 28: 1269-73.

**Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Miyamoto T, Watanabe S, Akashi K. (2003)**

Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals support lymphopoiesis, but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion.  
J Exp Med. 197: 1311-22.

**Jain NC.(1993)**

Essentials of veterinary hematology.  
Lea & Febiger, Philadelphia.

**Jesenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C, (1981)**

Eggs: conveniently packages antibodies. Methods for purification of yolk IgG. J Immunol Methods 46: 63-8.

**Johansson C, Morein B. (1983)**

Evaluation of labelling methods for bovine T and B lymphocytes.  
Vet Immunol Immunopathol. 4: 345-59.

**Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB. (1981)**

Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy.  
J Cell Biol. 88: 526-35.

**Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ. (1999)**

P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death.  
Blood. 93: 1075-85.

**Karnovsky MJ. (1975)**

A formaldehyd-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy.  
J Cell Biol 27: 137A-138A.

**Katayama N, Shih JP, Nishikawa S, Kina T, Clark SC, Ogawa M. (1993)**

Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors.  
Blood. 82: 2353-60.

**Kawashima I, Zanjani ED, Almada-Porada G, Flake AW, Zeng H, Ogawa M. (1996)**

CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells.  
Blood. 87: 4136-42.

**Kay HEM. (1965)**

How many cell-generations.  
The Lancet 2: 418-419.

**Khan F, Khan RH, Sherwani A, Mohmood S, Azfer MA. (2002)**

Lectins as markers for blood grouping.  
Med Sci Monit. 8: RA293-300.

**Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A, Nakauchi H. (1999)**

Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells.  
Stem Cells. 17: 286-94.

**Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Owan K. (2002)**

The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells.  
Clin Cancer Res. 8:22-8.

**Koch B, Regnat W, Schedel I, Hermanek H, Leibold W, Kalden JR. (1983)**

The binding of different lectins on peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic inflammatory and malignant diseases.

Immunobiology 164: 99-109.

**Kollet O, Peled A, Byk T, Ben-Hur H, Greiner D, Shultz L, Lapidot T. (2000)**

beta2 microglobulin-deficient (B2m(null)) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function.

Blood. 95: 3102-5.

**Kondo M, Scherer DC, Miyamoto T, King AG, Akashi K, Sugamura K, Weissman IL. (2000)**

Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines.

Nature. 407: 383-6.

**Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997)**

Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.

Cell. 91: 661-72.

**Kraft W. (1965)**

Die weißen Blutzellen des Rinderfetus,

Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 78: 301-4.

**Kramer JW. (2000)**

Normal Hematology of Cattle, Sheep and Goat. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5<sup>th</sup> ed., Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1075-84.

**Kramer TT, Cho HC. (1970 )**

Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg.

Immunology. 19: 157-67.

**Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. (1996)**

CD34: structure, biology, and clinical utility.

Blood. 87: 1-13.

**Kritzenberger M, Wrobel KH. (2004)**

Histochemical in situ identification of bovine embryonic blood cells reveals differences to the adult haematopoietic system and suggests a close relationship between haematopoietic stem cells and primordial germ cells.

Histochem Cell Biol. 121: 273-89.

**Kubota T, Hikono H, Sasaki E, Sakurai M. (1994)**

Sequence of a bovine c-kit proto-oncogene cDNA.

Gene. 141: 305-6.

**Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, Ure J, Zhao S, Zuyev S, Ansell J, Medvinsky A. (2002)**

Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver.

Development. 129: 4891-9.

**Kümmel TA, Thiele J, Hafenrichter EG, Varus E, Fischer R. (1996)**

Distribution of lectin binding sites in human bone marrow. Identification by use of an ultrastructural postembedding technique.

J Submicrosc Cytol Pathol. 28: 537-51.

**Labastie MC, Cortes F, Romeo PH, Dulac C, Peault B. (1998)**

Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo.

Blood. 92: 3624-35.

**Lacaud G, Gore L, Kennedy M, Kouskoff V, Kingsley P, Hogan C, Carlsson L, Speck N, Palis J, Keller G. (2002) Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro.**  
Blood. 100: 458-66.

**Lambert JF, Liu M, Colvin GA, Dooner M, McAuliffe CI, Becker PS, Forget BG, Weissman SM, Quesenberry PJ. (2003)**  
Marrow stem cells shift gene expression and engraftment phenotype with cell cycle transit.  
J Exp Med. 197: 1563-72.

**Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. (1993)**  
Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells.  
J Exp Med. 178: 787-91.

**Lansdorp PM, Dragowska W, Thomas TE, Little MT, Mayani H. (1994)**  
Age-related decline in proliferative potential of purified stem cell candidates.  
Blood Cells. 20: 376-80.

**Lansdorp PM. (1995a)**  
Telomere length and proliferation potential of hematopoietic stem cells.  
J Cell Sci. 108: 1-6.

**Lansdorp PM. (1995b)**  
Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells.  
Exp Hematol. 23: 187-91.

**Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE. (1996)**  
Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy.  
Nat Med. 2: 1329-37.

**Le Guern AC, Giovino MA, Abe M, Theodore PR, Qi J, Down JD, Sachs DH, Sykes M, Yang YG. (2003)**  
Stem cell activity of porcine c-kit<sup>+</sup> hematopoietic cells.  
Exp Hematol. 31: 833-40.

**Leary AG, Ogawa M. (1987)**  
Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors.  
Blood. 69: 953-6.

**Leary AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M. (1992)**  
Growth factor requirements for survival in G<sub>0</sub> and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 89: 4013-7.

**Lebkowski JS, Schain LR, Okrongly D, Levinsky R, Harvey MJ, Okarma TB. (1992)**  
Rapid isolation of human CD34 hematopoietic stem cells--purging of human tumor cells.  
Transplantation. 53: 1011-9.

**Lee CK, Odell GV, Eliot FP, Anderson IL, Jones EW. (1971)**  
Postnatal loss of bovine fetal hemoglobin.  
Am J Vet Res. 32 :1039-44.

**Lee EK, Kehrli ME Jr. (1998)**  
Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves.  
Am J Vet Res. 59 :37-43.

**Leemhuis T, Yoder MC, Grigsby S, Agüero B, Eder P, Srouf EF. (1996)**  
Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123.  
Exp Hematol. 24: 1215-24.

**Lemischka IR, Raulet DH, Mulligan RC. (1986)**

Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells.  
Cell. 45: 917-27.

**Leslie GA, Clem LW. (1969)**

Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken.  
J Exp Med. 130: 1337-52.

**Lessard J, Sauvageau G. (2003)**

Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells.  
Nature. 423: 255-60. Epub (2003) 20.

**Leven RM. (2000)**

Megakaryocytes. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5<sup>th</sup> ed., Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 443-47.

**Li CL, Johnson GR. (1994)**

Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells.  
Blood. 84: 408-14.

**Li D, Wang GY, Liu ZF, Shi YX, Zhang H, Bai ZL. (2004)**

Macrophage-associated erythropoiesis and lymphocytopoiesis in mouse fetal liver: ultrastructural and ISH analysis.  
Cell Biol Int. 28: 457-61.

**Lin G, Finger E, Gutierrez-Ramos JC. (1995)**

Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues.  
Eur J Immunol. 25: 1508-16

**Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. (2001)**

From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.  
Cell Mol Life Sci. 58: 931-59.

**Liu Y, Rao MS. (2003)**

Transdifferentiation--fact or artifact.  
J Cell Biochem. 88: 29-40.

**Loris R. (2002)**

Principles of structures of animal and plant lectins.  
Biochim Biophys Acta.: 1572: 198-208.

**Lösch U. (1972)**

Zur Charakterisierung einer erblichen Dysgammaglobulinämie,  
Universität München, Habilitationsschrift.

**Lu M, Kawamoto H, Katsube Y, Ikawa T, Katsura Y. (2002)**

The common myelolymphoid progenitor: a key intermediate stage in hemopoiesis generating T and B cells.  
J Immunol. 169: 3519-25.

**Lyman SD, Jacobsen SE. (1998)**

c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities.  
Blood. 91: 1101-34.

**Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH. (1999)**

Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms.  
J Invest Dermatol. 112: 165-70.

**Magli MC, Iscove NN, Odartchenko N. (1982)**

Transient nature of early haematopoietic spleen colonies.  
Nature. 295: 527-9.

**Majdic O, Stockl J, Pickl WF, Bohuslav J, Strobl H, Scheinecker C, Stockinger H, Knapp W. (1994)**

Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34.  
Blood. 83: 1226-34.

**Majumder S, Brown K, Qiu FH, Besmer P. (1988)**

c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization.  
Mol Cell Biol. 8: 4896-903.

**Mantel C, Hendrie P, Broxmeyer HE. (2001)**

Steel factor regulates cell cycle asymmetry.  
Stem Cells. 19: 483-91.

**Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. (1993a)**

Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines.  
Blood. 82: 2664-72.

**Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. (1993b)**

Lineage commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and does not appear to be influenced by cytokines.  
J Cell Physiol. 157: 579-86.

**McCulloch EA, Siminovitch L, Till JE, Russell ES, Bernstein SE. (1965)**

The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype Sl-Sld.  
Blood. 26: 399-410.

**McCulloch EA, Siminovitch L, Till JE. (1964)**

Spleen-colony formation in anemic mice of genotype WW.  
Science. 144: 844-6.

**McNiece IK, Bertonecello I, Kriegler AB, Quesenberry PJ. (1990)**

Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC).  
Int J Cell Cloning. 8: 146-60.

**McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. (1991a)**

Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages.  
Exp Hematol. 19: 226-31.

**McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. (1991b)**

The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. Synergistic interaction with IL-7.  
J Immunol. 146: 3785-90.

**McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC, Quesenberry PJ. (1989)**

Detection of a human CFC with a high proliferative potential.  
Blood. 74: 609-12.

**McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC, Quesenberry PJ. (1989)**

Detection of a human CFC with a high proliferative potential.  
Blood. 74: 609-12.

**McSweeney PA, Rouleau KA, Storb R, Bolles L, Wallace PM, Beauchamp M, Krizanac-Bengez L, Moore P, Sale G, Sandmaier B, de Revel T, Appelbaum FR. (1996)**

Canine CD34: cloning of the cDNA and evaluation of an antiserum to recombinant protein.  
Blood. 88: 1992-2003.

**McSweeney PA, Rouleau KA, Wallace PM, Bruno B, Andrews RG, Krizanac-Bengez L, Sandmaier BM, Storb R, Wayner E, Nash RA. (1998)**

Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34.  
Blood. 91: 1977-86.

**Medvinsky A, Dzierzak E. (1996)**

Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region.  
Cell. 86: 897-906.

**Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, Dzierzak EA. (1993)**

An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse.  
Nature. 364: 64-7.

**Menard M, Meyers KM. (1988)**

Storage pool deficiency in cattle with the Chediak-Higashi syndrome results from an absence of dense granule precursors in their megakaryocytes.  
Blood. 72: 1726-34.

**Merhi RA, Guillaud L, Delouis C, Cotinot C. (2001)**

Establishment and characterization of immortalized ovine Sertoli cell lines.  
In Vitro Cell Dev Biol Anim. 37: 581-8.

**Mertens B, Muriuki C, Muiya P, Andrianarivo A, Mwangi S, Logan-Henfrey L. (1997)**

Bovine stem cell factor: production of a biologically active protein and mRNA analysis in cattle infected with *Trypanosoma congolense*.  
Vet Immunol Immunopathol. 59: 65-78.

**Metcalf D, Nicola NA. (1991)**

Direct proliferative actions of stem cell factor on murine bone marrow cells in vitro: effects of combination with colony-stimulating factors.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 88: 6239-43.

**Metcalf D. (1998)**

Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation.  
Blood. 92: 345-7.

**Meyers KM, Hopkins G, Holmsen H, Benson K, Prieur DJ. (1982)**

Ultrastructure of resting and activated storage pool deficient platelets from animals with the Chediak-Higashi syndrome.  
Am J Pathol. 106: 364-77.

**Mikami T, Eguchi M, Kurosawa H, Sato Y, Sugita K, Suzumura H, Tadokoro N, Watanabe H, Inaba N. (2002)**

Ultrastructural and cytochemical characterization of human cord blood cells.  
Med Electron Microsc. 35: 96-101.

**Miller WJ, Hubbert WT. (1975)**

Adult isoantigen and lectin reactivity of bovine fetal red cells.  
Biol Neonate. 27: 23-39.

**Moore MA, Metcalf D. (1970)**

Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo.  
Br J Haematol. 18: 279-96.

**Morel F, Szilvassy SJ, Travis M, Chen B, Galy A. (1996)**

Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34 antigen.  
Blood. 88: 3774-84.



**Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL. (1995)**

The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 10302-6.

**Morrison SJ, Prowse KR, Ho P, Weissman IL. (1996)**

Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential.  
Immunity. 5: 207-16.

**Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. (1997a)**

Regulatory mechanisms in stem cell biology.  
Cell. 88: 287-98.

**Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. (1997b)**

Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors.  
Development. 124: 1929-39.

**Morrison SJ, Weissman IL. (1994)**

The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype.  
Immunity. 1: 661-73.

**Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. (1994)**

Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo.  
Immunity. 1: 291-301.

**Muller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB. (2002)**

Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation.  
Blood. 100: 1302-9.

**Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. (1997)**

Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells.  
Microsc Res Tech. 39: 350-64.

**Nakahata T, Ogawa M. (1982)**

Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 79: 3843-7.

**Nakamura Y, Komano H, Nakauchi H. (1993)**

Two alternative forms of cDNA encoding CD34.  
Exp Hematol. 21: 236-42.

**Ni Y, Tizard I. (1996)**

Lectin-carbohydrate interaction in the immune system.  
Vet Immunol Immunopathol. 55: 205-23.

**Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, Kina T, Nakauchi H, Nishikawa S. (1991)**

Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells.  
J Exp Med. 174: 63-71.

**Ogawa M. (1993)**

Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.  
Blood. 81: 2844-53.

**Ogawa M. (1999)**

Stochastic model revisited.  
Int J Hematol. 69: 2-5.

**Oguro M, Koizumi F, Sasagawa S. (1978)**

Blood cells in the peripheral blood and hematopoietic organs of the human fetus during hepatic hematopoiesis.  
Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi. 41: 1231-41.

**Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. (1991)**  
Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule.  
Blood. 78: 1706-12.

**Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. (1996)**  
Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.  
Science. 273: 242-5.

**Ostrand-Rosenberg S. (1976)**  
Lack of identity of the A antigen and concanavalin A receptor on bovine erythrocytes; implications for membrane structure.  
Vox Sang. 30: 268-81.

**Palacios R, Imhof BA. (1993)**  
At day 8-8.5 of mouse development the yolk sac, not the embryo proper, has lymphoid precursor potential in vivo and in vitro.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 90: 6581-5.

**Palis J, Chan RJ, Koniski A, Patel R, Starr M, Yoder MC. (2001)**  
Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 4528-33.

**Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. (1999)**  
Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse.  
Development. 126: 5073-84.

**Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC, Zsebo KM. (1991)**  
Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile.  
Blood. 78: 1403-12.

**Paulus JM. (1970)**  
DNA metabolism and development of organelles in guinea-pig megakaryocytes: a combined ultrastructural, autoradiographic and cytophotometric study.  
Blood. 35: 298-311.

**Petti S, Testa U, Migliaccio AR, Mavilio F, Marinucci M, Lazzaro D, Russo G, Mastroberardino G, Peschle C. (1985)**  
Embryonic hemopoiesis in human liver: morphologic aspects at sequential stages of ontogenic development.  
Prog Clin Biol Res. 193: 57-71.

**Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH. (1989)**  
An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse.  
Blood. 74: 2755-63.

**Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P. (1988)**  
Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus.  
EMBO J. 7: 1003-11.

**Radley JM, Ellis S, Palatsides M, Williams B, Bertoncello I. (1999)**  
Ultrastructure of primitive hematopoietic stem cells isolated using probes of functional status.  
Exp Hematol. 27: 365-9.

**Radley JM, Haller CJ. (1982)**  
The demarcation membrane system of the megakaryocyte.  
Blood. 60: 213-9.

**Reisbach G, Bartke I, Kempkes B, Kostka G, Ellwart J, Birner A, Thalmeier K, Mailhammer R, Bornkamm GW, Ullrich A. (1993)**

Characterization of hemopoietic cell populations from human cord blood expressing c-kit.  
Exp Hematol. 21: 74-9.

**Rendu F, Lebret M. (1984)**

Interaction of wheat germ agglutinin with human platelets: a model for studying platelet response.  
Thromb Res. 36: 447-56.

**Reynolds ES. (1962)**

The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.  
J Cell Biol 1: 208-12.

**Romeis B. (1989)**

Mikroskopische Technik. 17. Aufl., Böck P, Hrsg., Urban und Schwarzenberger, München.

**Rosendaal M, Hodgson GS, Bradley TR. (1979)**

Organization of haemopoietic stem cells: the generation-age hypothesis.  
Cell Tissue Kinet. 12: 17-29.

**Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R. (2000)**

Role of c-kit in mammalian spermatogenesis.  
J Endocrinol Invest. 23: 609-15.

**Rosti V, Malabarba L, Ramajoli I, Casula S, Bergamaschi G, Danova M, Invernizzi R, Pecci A, Salvaneschi L, Cazzola M. (2000)**

Cord blood-derived hematopoietic progenitor cells: in vitro response to hematopoietic growth factors and their recruitment into the S-phase of the cell cycle.  
Haematologica. 85(Suppl): 18-25.

**Roy V, Verfaillie CM. (1999)**

Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: implications for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis.  
Exp Hematol. 27: 302-12.

**Rüdiger H, Gabius HJ. (2001)**

Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications.  
Glycoconj J. 18: 589-613.

**Rüsse I, Sinowatz F, Richter L, Lehmann M, Schallenberger E. (1992)**

Die Entwicklung des Dottersacks bei Wiederkäuern (Schaf und Rind).  
Anat Histol Embryol. 21: 324-47

**Rüsse I, Sinowatz F. (1991)**

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.  
Verlag Paul Paray, Berlin.

**Russell ES. (1979)**

Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists.  
Adv Genet. 20: 357-459.

**Sabin FR. (1920)**

Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the liver blastoderm of chicks during the second day of incubation.  
Contr Embryol 9: 215-262.

**Sackstein R, Fu L, Allen KL. (1997)**

A hematopoietic cell L-selectin ligand exhibits sulfate-independent binding activity.  
Blood. 89: 2773-81.

- Saeland S, Duvert V, Caux C, Pandrau D, Favre C, Valle A, Durand I, Charbord P, de Vries J, Banchereau J. (1992)**  
Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells.  
Exp Hematol. 20: 24-33.
- Samper E, Fernandez P, Eguia R, Martin-Rivera L, Bernad A, Blasco MA, Aracil M. (2002)**  
Long-term repopulating ability of telomerase-deficient murine hematopoietic stem cells.  
Blood. 99: 2767-75.
- Sasaki E, Okamura H, Chikamune T, Kanai Y, Watanabe M, Naito M, Sakurai M. (1993)**  
Cloning and expression of the chicken c-kit proto-oncogene.  
Gene. 128: 257-61.
- Sato T, Laver JH, Ogawa M. (1999)**  
Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells.  
Blood. 94: 2548-54.
- Schalm OW. (1977)**  
Bovine hematology.  
Mod Vet Pract. 58: 923-30.
- Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. (2002)**  
The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors.  
Blood. 99: 507-12.
- Schmidt P, Erhard M, Wanke R, Hofmann A, Schmahl W. (1996)**  
Lokale Reaktion bei Verwendung verschiedener Adjuvantien bei Legehennen.  
ALTEX. 13:3 0-34.
- Schwarzkopf C, Thiele B. (1996)**  
Effectivity of Different Methods for the Extraction and Purification of IgY.  
ALTEX.13: 35-39.
- Servida F, Soligo D, Caneva L, Bertolini F, de Harven E, Campiglio S, Corsini C, Deliliers GL. (1996)**  
Functional and morphological characterization of immunomagnetically selected CD34+ hematopoietic progenitor cells.  
Stem Cells. 14: 430-8.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. (1995)**  
Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice.  
Nature. 376: 62-6.
- Sharon N, Lis H. (2004)**  
Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. A historical overview.  
Glycobiology. 14: 53R-62R.
- Shimizu Y, Shaw S. (1993)**  
Cell adhesion. Mucins in the mainstream.  
Nature. 366:630-1.
- Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL. (1995)**  
Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice.  
J Immunol. 154: 180-91.
- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. (1963)**  
The distribution of colony-forming cells among spleen colonies.  
J Cell Physiol. 62: 327-36.

**Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. (1992)**

Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells.  
J Immunol. 148: 267-71.

**Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. (1994)**

Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups.  
Am J Hum Genet. 55: 876-82.

**Sogo S, Inaba M, Ogata H, Hisha H, Adachi Y, Mori S, Toki J, Yamanishi K, Kanzaki H, Adachi M, Ikehara S. (1997)**

Induction of c-kit molecules on human CD34+/c-kit < low cells: evidence for CD34+/c-kit < low cells as primitive hematopoietic stem cells.  
Stem Cells. 15: 420-9.

**Sonoda M, Marshak RR. (1970)**

Electron microscopic observations on the mononuclear cells in the peripheral blood of the clinically normal and lymphosarcoma cows.  
Jpn J Vet Res. 18: 9-20.

**Sopp P, Howard CJ. (1997)**

Cross-reactivity of monoclonal antibodies to defined human leucocyte differentiation antigens with bovine cells.  
Vet Immunol Immunopathol. 56: 11-25.

**Spangrude GJ, Johnson GR. (1990)**

Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 87: 7433-7.

**Srouf EF, Zanjani ED, Brandt JE, Leemhuis T, Briddell RA, Heerema NA, Hoffman R. 1992**

Sustained human hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult human bone marrow cells.  
Blood. 79: 1404-12.

**Steffens WL. (2000)**

Ultrastructural features of leukocytes. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5<sup>th</sup> ed., Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 326-36.

**Stillmark H. (1888)**

Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen.  
Diss, Dorpat.

**Storms RW, Goodell MA, Fisher A, Mulligan RC, Smith C. (2000)**

Hoechst dye efflux reveals a novel CD7(+)CD34(-) lymphoid progenitor in human umbilical cord blood.  
Blood.;96: 2125-33.

**Suda J, Sudo T, Ito M, Ohno N, Yamaguchi Y, Suda T. (1992)**

Two types of murine CD34 mRNA generated by alternative splicing.  
Blood. 79: 2288-95.

**Sutherland DR, Keating A. (1992)**

The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications.  
J Hematother. 1: 115-29.

**Sutherland DR, Watt SM, Dowden G, Karhi K, Baker MA, Greaves MF, Smart JE. (1988)**

Structural and partial amino acid sequence analysis of the human hemopoietic progenitor cell antigen CD34.  
Leukemia. 2: 793-803.

**Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. (1989)**

Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro.  
Blood. 74: 1563-70.

**Tablin F, Castro M, Leven RM. (1990)**

Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation.  
J Cell Sci. 97: 59-70.

**Takano H, Ema H, Sudo K, Nakauchi H. (2004)**

Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs.  
J Exp Med. 199: 295-302.

**Tanaka S, Yanagisawa N, Tojo H, Kim YJ, Tsujimura T, Kitamura Y, Sawasaki T, Tachi C. (1997)**

Molecular cloning of cDNA encoding the c-kit receptor of Shiba goats and a novel alanine insertion specific to goats and sheep in the kinase insert region.  
Biochim Biophys Acta. 1352: 151-5.

**Tanaka Y, Goodmann JR. (1972)**

Electronmicroscopy of human blood cells.  
Harper & Row, New York.

**Tavassoli M. (1991)**

Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview.  
Blood Cells. 17: 269-81

**Tavian M, Coulombel L, Luton D, Clemente HS, Dieterlen-Lievre F, Peault B. (1996)**

Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo.  
Blood. 87: 67-72.

**Tennant B, Harrold D, Reina-Guerra M, Kendrick JW, Laben RC. (1974)**

Hematology of the neonatal calf: erythrocyte and leukocyte values of normal calves.  
Cornell Vet. 64: 516-32.

**Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. (1991)**

Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells.  
Blood. 77:1218-27.

**Thiele J, Wickenhauser C, Baldus SE, Kuemmel T, Zirbes TK, Drebber U, Wirtz R, Thiel A, Hansmann ML, Fischer R. (1995)**

Characterization of CD34+ human hemopoietic progenitor cells from the peripheral blood: enzyme-, carbohydrate- and immunocytochemistry, morphometry, and ultrastructure.  
Leuk Lymphoma. 16: 483-91.

**Tierney TJ, Simpson-Morgan MW. (1997)**

The proliferative responses of lymphocytes from foetal calves and adult cattle.  
Vet Immunol Immunopathol. 59:49-64.

**Till JE, McCulloch EA. (1961)**

A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.  
Radiat Res. 14: 213-22.

**Till JE. (1963)**

Quantitative aspects of radiation lethality at the cellular level.  
Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med. 90: 917-27.

**Timoshenko AV, Gorudko IV, Maslakova OV, Andre S, Kuwabara I, Liu FT, Kaltner H, Gabius HJ. (2003)**

Analysis of selected blood and immune cell responses to carbohydrate-dependent surface binding of proto- and chimera-type galectins.  
Mol Cell Biochem. 250: 139-49.

**Tisdall DJ, Fidler AE, Smith P, Quirke LD, Stent VC, Heath DA, McNatty KP. (1999)**  
Stem cell factor and c-kit gene expression and protein localization in the sheep ovary during fetal development.  
*J Reprod Fertil.* 116: 277-91.

**Tisdall M, Crowley JP. (1971)**  
The pattern of disappearance of foetal haemoglobin in young calves.  
*Res Vet Sci.* 12: 583-4.

**Tjonnfjord GE, Steen R, Veiby OP, Egeland T. (1996)**  
Lineage commitment of CD34+ human hematopoietic progenitor cells.  
*Exp Hematol.* 24: 875-82.

**Tocci A, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Fisk NM. (2003)**  
CD34+ cells from first-trimester fetal blood are enriched in primitive hemopoietic progenitors.  
*Am J Obstet Gynecol.* 188: 1002-10.

**Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, Brandt JE, Hoffman R, Law P, Ishizawa L, Srouf EF. (1994a)**  
Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells.  
*Exp Hematol.* 22: 215-22.

**Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, Clapp DW, Srouf EF. (1994b)**  
Rapid exit from G0/G1 phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34+ cells an enhanced ex vivo expansion potential.  
*Exp Hematol.* 22: 1264-72.B

**Turner AM, Bennett LG, Lin NL, Wypych J, Bartley TD, Hunt RW, Atkins HL, Langley KE, Parker V, Martin F. (1995)**  
Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines.  
*Blood.* 85: 2052-8.

**Uchida N, Combs J, Chen S, Zanjani E, Hoffman R, Tsukamoto A. (1996)**  
Primitive human hematopoietic cells displaying differential efflux of the rhodamine 123 dye have distinct biological activities.  
*Blood.* 88: 1297-305.

**Uchida N, He D, Frieria AM, Reitsma M, Sasaki D, Chen B, Tsukamoto A. (1997)**  
The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood.  
*Blood.* 89: 465-72.

**Ullrich A, Schlessinger J. (1990)**  
Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity.  
*Cell.* 61: 203-12.

**van Bakkum DW, van den Engh GJ, Wagemaker G, Bol SJ, Visser JW. (1979)**  
Structural identity of the pluripotential hemopoietic stem cell.  
*Blood Cells.* 5: 143-59.

**van Bakkum DW, van Noord MJ, Maat B, Dicke KA. (1971)**  
Attempts at identification of hemopoietic stem cell in mouse.  
*Blood.* 38: 547-58.

**Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. (1994)**  
Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 9857-60.

**Visser JW, Bauman JG, Mulder AH, Eliason JF, de Leeuw AM. (1984)**  
Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells.  
*J Exp Med.* 159: 1576-90.

**Wallmann J, Staak C, Luge E. (1990)**

A simple method for the isolation of immunoglobulin (Y) from the eggs of immunized hens.  
Zentralbl Veterinarmed B. 37: 317-20.

**Wang JC, Doedens M, Dick JE. (1997)**

Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay.  
Blood. 89: 3919-24.

**Wanke R, Schmidt P, Erhard MH, Sprick-Sanjose Messing A, Stangassinger M, Schmahl W, Hermanns W. (1996)**

Freundsches komplettes Adjuvans beim Huhn: effiziente Immunstimulation bei gravierender lokaler inflammatorischer Reaktion.  
J Vet Med A. 43: 243-53.

**Weber A, Andrews J, Dickinson B, Larson V, Hammer R, Dirks V, Sorensen D, Frommes S. (1969)**

Occurrence of nuclear pockets in lymphocytes of normal, persistent lymphocytotic and leukemic adult cattle.  
J Natl Cancer Inst. 43: 1307-15.

**Weekx SF, Van Bockstaele DR, Plum J, Moulijn A, Rodrigus I, Lardon F, De Smedt M, Nijs G, Lenjou M, Loquet P, Berneman ZN, Snoeck HW. (1998)**

CD34<sup>++</sup> CD38<sup>-</sup> and CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source.  
Exp Hematol. 26: 1034-42.

**Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB. (1997)**

Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT.  
Nat Genet. 17: 498-502.

**Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. (2001)**

Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations.  
Annu Rev Cell Dev Biol. 17: 387-403.

**Wells WA. (2002)**

Is transdifferentiation in trouble?  
J Cell Biol. 157: 15-8.

**Wickenhäuser C, Thiele J, Drebber U, Kvasnicka HM, Thiel A, Schmitz B, Hansmann ML, Fischer R. (1995)**

CD34<sup>+</sup> human hemopoietic progenitor cells of the bone marrow differ from those of the peripheral blood: an immunocytochemical and morphometric study.  
Acta Haematol. 93: 83-90.

**Wilde JKH. (1964)**

The cellular elements of the bovine bone marrow.  
Res Vet Sci. 5: 213-21.

**Winqvist G. (1954)**

Morphology of the blood and the hemopoietic organs in cattle under normal and some experimental conditions  
Acta anatomica. Suppl. 21: 1-157.

**Wong PM, Chung SW, Chui DH, Eaves CJ. (1986)**

Properties of the earliest clonogenic hemopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 83: 3851-4.

**Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. (1996)**

Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells.  
Dev Genet. 18: 173-9.



**Wu AM, Till JE, Siminovitch L, McCulloch EA. (1968)**

Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system.  
J Exp Med. 127: 455-64.

**Wunder E. (2001)**

Chances and limits of cord blood transplantation.  
Ernst Schering Res Found Workshop. 33: 71-83.

**Wyrsh A, dalle Carbonare V, Jansen W, Chklovskaja E, Nissen C, Surbek D, Holzgreve W, Tichelli A, Wodnar-Filipowicz A. (1999)**

Umbilical cord blood from preterm human fetuses is rich in committed and primitive hematopoietic progenitors with high proliferative and self-renewal capacity.  
Exp Hematol. 27: 1338-45.

**Yamada Y, Sonoda M. (1970)**

Eosinophils of ovine peripheral blood in electron microscopy.  
Jpn J Vet Res. 18:117-23.

**Yamada Y, Sonoda M. (1972)**

Basophils of ovine peripheral blood in electron microscopy.  
Nippon Juigaku Zasshi. 34(1):29-32.

**Yamaguchi M, Ikebuchi K, Hirayama F, Sato N, Mogi Y, Ohkawara J, Yoshikawa Y, Sawada K, Koike T, Sekiguchi S. (1998)**

Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34(+) progenitors in G0/G1 versus S+G2/M phases of the cell cycle.  
Blood. 92: 842-8.

**Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. (1987)**

Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand.  
EMBO J. 6: 3341-51.

**Yoder MC, Hiatt K. (1997)**

Engraftment of embryonic hematopoietic cells in conditioned newborn recipients.  
Blood. 89: 2176-83.

**Yogalingam G, Anson DS. (2003)**

Molecular cloning of feline CD34.  
Vet Immunol Immunopathol. 1595: 53-61.

**Young PE, Baumhueter S, Lasky LA. (1995)**

The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development.  
Blood 85: 96-105.

**Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. (1998)**

Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells.  
Exp Hematol. 26: 353-60.

**Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. (2003)**

Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells.  
Exp Hematol. 31: 406-12.

**Zanjani ED, Flake AW, Rice H, Hedrick M, Tavassoli M. (1994)**

Long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep.  
J Clin Invest. 93: 1051-5.

**Zhou JH, Hikono H, Ohta M, Sakurai M. (2001)**

Cloning of bovine CD34 cDNA.  
J Vet Med Sci. 63: 1051-3.

**Zhou JH, Hikono H, Ohtaki M, Kubota T, Sakurai M. (1994)**

Cloning and characterization of cDNAs encoding two normal isoforms of bovine stem cell factor.  
Biochim Biophys Acta. 1223: 148-50.

**Zijlmans JM, Visser JW, Kleiverda K, Kluin PM, Willemze R, Fibbe WE. (1995)**

Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 8901-5.

**Zinsmeister VA, Ackerman GA. (1983)**

Surface localization of wheat germ agglutinin and concanavalin A binding sites on normal human blood cells: an ultrastructural histochemical study.  
Tissue Cell. 15: 673-81.

**IX Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Complex-Methode
ABC-Protein	ATP-binding cassette-Protein
AGM-Region	Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region
APAAP-Methode	Akalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase-Methode
Bcrp1	Breast cancer resistant protein-1
BFU-E	Blast-forming unit erythrocyte
Bmi-1	bone morphogenetic protein 1
CAFC	Cobblestone Area-Forming Cell
CAM	Cell adhesion molecule“
CD	Cluster of differentiation
CFC	Colony forming cell
CFC-Blast	Blast Colony-Forming Cell Assay
CFU-G	Colony-forming unit Granulozyten
CFU-GEMM	Colony-forming unit Granulozyten Erythrozyten Makrophagen Monozyten
CFU-M	Colony-forming unit
CFU-Meg	Colony-forming unit Megakaryozyten
CFU-MegE	Colony-forming unit Megakaryozyten-Erythrozyten
CFU-MG	Colony-forming unit Macrophagen-Granulozyten
CFU-S d8, d12	Colony-forming unit spleen Tag 8, Tag 12
CLP	Common lymphoid progenitor
CMP	Common myeloid progenitor
Con A	Concanavalia ensiformes Agglutinin
DNA	Desoxyribonukleinsäure

ECA	Erythrina cristagalli Agglutinin
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent assay
FIA	Freund inkomplettes Adjuvans
FITC	Fluoroisothiocyanat
FL	fetale Leber
flt2	fetal liver kinase 2
flt3	fms-like tyrosine kinase 3
FSC	Forward scatter
G	Guanin
G <sub>0</sub> -Phase	Ruhephase des Zellzyklus
G-1	Granulozyten-Marker-1
G <sub>1</sub> - Phase	gap 1, Zyklusphase 1 vor DNA-Verdoppelung
G <sub>2</sub> -Phase	gap 2, Zyklusphase 2 nach DNA-Verdoppelung
GA	Golgi-Apparat
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-colony stimulating factor
GMP	Granulozyten-Makrophagen-Progenitor
GSA I	Griffonia simplicifolia Agglutinin I
GvHD	Graft versus Host Disease
HLA-DR	D-related human leukocyte antigens
Hoe	Hoechst 33342
HPP-CFC	High Proliferative Potential Colony-Forming Cell
HSC	Hämatopoietische Stammzellen
HSPC	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Yolk
IL3	Interleukin 3

JAK/STAT	Janus Activating Kinase/signal Transducers and Activators of Transcription
k.o.	knock-out
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KL	kit Ligand
Lin	Lineage
LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin
LTC-IC	Longterm culture-initiating cells
LT-HSC	Long term hematopoietic stem cells
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MDR	Multidrug resistance
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor
MGF	Mast cell growth factor
MNC	Mononuclear cells
MPP	Multipotent progenitor
NBT/BCIP	Nitroblautetrazoliumchlorid/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat, Toluidin-Salz
NOD/LtSz-scid/scid	Non-obese diabetic
NOD/SCID	Non-obese diabetic/severe combined immunodeficient
NOV	Nephroblastoma overexpressed
p.c.	post conceptionem
PcG	Polycomb group Gene
PCR	Polymerase chain reaction
PCSL	N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysin
PDGF	Platelet derived growth factor

P-gp	P-Glycoprotein
PNA	Arachis hypogaea Agglutinin
rER	raues endoplasmatische Retikulum
Rho	Rhodamin 123
RNA	Ribonukleinsäure
SBA	Glycine max Agglutinin
Sca-1	Stem cell antigen 1
SCF	Stem cell factor
SCID	Severe combined immunodeficiency
sER	smooth (glattes) endoplasmatisches Retikulum
SLF	Steel factor
Sl-Locus	Steel locus
SP	Side Population
S-Phase	DNA-Synthesephase des Zellzyklus
SRC	SCID-repopulating cells
SSC	Sideward scatter
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
STC	Short term culture
ST-HSC	Short term hematopoietic stem cells
T	Thymidin
TGF $\beta$	Tumor growth factor $\beta$
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
UCB	Umbilical cord blood
UEA I	Ulex europeaeus Agglutinin I
VVA	Vicia villosa Agglutinin
W-Lokus	White Spotting Lokus
WGA	Triticum vulgare Agglutinin

## X Verzeichnis der Tabellen, Abbildungen und Diagramme

Tab. 1: Übersicht über häufig verwendete in vitro- und in vivo-Tests zum allgemeinen Nachweis von HSC.	20
Tab. 2: Größe der Blutzellen aus dem bovinen Knochenmark in $\mu\text{m}$ .	37
Tab. 3: Einteilung der Lektine nach ihrer Zuckerspezifität.	45
Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Proben aus dem Nabelschnurblut.	48
Tab. 5: Proben für die Elektronenmikroskopie.	50
Tab. 6: Übersicht über die in der Immunhistologie verwendeten Antikörper.	53
Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Lektine.	56
Tab. 8: Übersicht über die zur Immunisierung verwendeten Aminosäuresequenzen.	59
Tab. 9: Extinktionswerte und IgG-Konzentrationen der aufgereinigten Dotterantikörper.	78
Tab. 10: Titer für die anti-bovinen c-kit Antikörper D, E und F.	80
Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Gewebe zur immunhistochemischen Charakterisierung der polyklonalen Dotterantikörper CD34 und c-kit.	81
Tab. 12: Verteilung von immunreaktivem CD34 im fetalen bovinen Gewebe.	84
Tab. 13: Verteilung von immunreaktivem c-kit im fetalen bovinen Gewebe.	86
Tab. 14: Reaktionsmuster der bovinen Blutzellen aus dem Nabelschnurbkut mit den neun verwendeten Lektinen	119
Abb. 1: Übersicht über die verschiedenen Stadien der Hämatopoiese.	33
Abb. 2: Orthochromatischer Erythroblast. SSL 13 cm.	65
Abb. 3: Polychromatische und orthochromatische Erythroblasten. SSL 21 cm.	65
Abb. 4: Basophiler Erythroblast in Teilung. SSL 20,5 cm.	65
Abb. 5: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt. SSL 31 cm.	66
Abb. 6: Neutrophiler Metamyelozyt. SSL 33 cm.	66
Abb. 7: Neutrophiler Myelozyt. Lysispuffer. SSL 42 cm.	66
Abb. 8: Neutrophiler Promyelozyt. SSL 21 cm.	66
Abb. 9: Reifer eosinophiler Granulozyt. Neugeborenes Tier.	67
Abb. 10: Eosinophiler Metamyelozyt. SSL 21 cm.	67
Abb. 11: Eosinophiler Myelozyten. SSL 33 cm.	67
Abb. 12: Großer Lymphozyt. SSL 31 cm.	68
Abb. 13: Kleiner Lymphozyt. SSL 31 cm.	68
Abb. 14: Monozyt. Neugeborenes Tier.	68
Abb. 15: Thrombozyten und Riesenthrombozyten. SSL 21 cm.	69
Abb. 16: Riesenthrombozyten.	69
Abb. 17: Nicht klassifizierbare Blutzelle. Lysispuffer. SSL 53 cm.	69

Abb. 18: Vakuolisierte Zelle. SSL 28,5 cm.	70
Abb. 19: Zelle mit stark vakuolisiertem Zytoplasma. SSL 31 cm.	70
Abb. 20: Längliche, evtl. epitheliale Zellen. SSL 31 cm.	71
Abb. 21: Ki-67, teilender Erythroblast. SSL 42 cm.	75
Abb. 22: Ki-67, positiver Lymphozyt und Erythroblast. SSL 53 cm.	75
Abb. 23: Ki-67, positiver großer Lymphozyt. SSL 18 cm.	75
Abb. 24: CD68-positiver Monozyt. SSL 94 cm.	77
Abb. 25: Stark positiver Monozyt. SSL 18 cm.	77
Abb. 26: CD68-positiver Makrophage. SSL 18 cm.	77
Abb. 27: c-kit-positive lymphoide Zelle. SSL 18 cm	78
Abb. 28: Western Blot. c-kit D, Leberhomogenat 1:16, Antikörper 1:200.	81
Abb. 29: CD34 B-positive Blutzellen. Leber eines Fetus. SSL 2,5 cm.	83
Abb. 30: CD34 C-positive Blutzellen. SSL 2,5 cm.	83
Abb. 31: CD34-positiver neutrophiler Granulozyt und CD34-positiver Thrombozyt. SSL 10 cm.	83
Abb. 32: c-kit D, positive Reaktion im Bronchialepithel, SSL 4,4 cm.	85
Abb. 33: c-kit F-positiven Zellen in den Spinalganglien und im Rückenmark. SSL 4,4 cm.	85
Abb. 34: c-kit D-positive Osteoblasten. SSL 4,4 cm.	85
Abb. 35: c-kit D-positive Blutzellen. SSL 2,5 cm.	85
Abb. 36: c-kit D-positive lymphoide Zellen. SSL 51 cm.	86
Abb. 37: Semidünnschnitt einer Karnovsky-fixierten Probe aus dem Nabelschnurblut.	87
Abb. 38: Ausschnitt aus einem Gefäß aus der Wharton Sulze mit verschiedenen Stadien der Erythrozyten-Reifung. SSL 3,4 cm.	90
Abb. 39: Basophiler. SSL 29 cm.	91
Abb. 40: Polychromatischer Erythroblast. SSL 42 cm.	91
Abb. 41: Orthochromatischer Erythroblast mit marginalisiertem Kern. SSL 53 cm.	92
Abb. 42: Kernexpulsion in einem orthochromatischen Erythroblasten. SSL 42 cm.	92
Abb. 43: Ausgeschleuster „nackter“ pyknotischer Zellkern. SSL 42 cm.	93
Abb. 44: Retikulozyt. SSL 42 cm.	93
Abb. 45: Reifer Erythrozyt mit intrazytoplasmatischen Vakuolen. Neugeborenes Tier.	94
Abb. 46: Neutrophiler Promyelozyt. SSL 42 cm.	96
Abb. 47: Neutrophiler Myelozyt. SSL 53 cm.	96
Abb. 48: Neutrophiler Myelozyt. Neugeborenes Tier.	97
Abb. 49: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt. SSL 53 cm.	97
Abb. 50: Neutrophiler Granulozyt mit 3 Kernsegmenten. Neugeborenes Tier.	98



Abb. 51: Neutrophiler Granulozyt mit Glykogen. Neugeborenes Tier.	98
Abb. 52: Neutrophiler Granulozyt mit Membranen am Zellkern. Neugeborenes Tier.	99
Abb. 53: Eosinophiler Granulozyt mit konzentrischen Granula. SSL 89 cm.	100
Abb. 54: Eosinophiler Granulozyt. SSL 89 cm.	100
Abb. 55: Lymphozyten. Neugeborenes Tier.	102
Abb. 56: Lymphozyt mit Membranstrukturen an der Kernmembran. Neugeborenes Tier.	102
Abb. 57: Lymphozyten mit konzentrisch geschichteten Membranen. Neugeborenes Tier.	103
Abb. 58: Monozyt. SSL 42 cm.	104
Abb. 59: Monozyt mit deutlich ausgebildetem Golgi-Apparat. Neugeborenes Tier.	105
Abb. 60: Monozyt mit Membranstrukturen am Kern. SSL 42 cm.	105
Abb. 61: Megakaryozyt. SSL 42 cm.	108
Abb. 62: Thrombozyt. SSL 42 cm.	109
Abb. 63: Thrombozyt mit Glykogen. SSL 42 cm.	109
Abb. 64: „Riesenthrombozyt“. SSL 53 cm.	110
Abb. 65: Primitive Blutzelle mit hohem Kern-Zytoplasma-Verhältnis. SSL 42 cm.	111
Abb. 66: Unreife Blutzelle. SSL 42 cm.	112
Abb. 67: Phagozytierende Zelle. SSL 42 cm.	113
Abb. 68: Phagozytose eines. SSL 42 cm.	113
Abb. 69: Zelle mit zahlreichen Lysosomen. SSL 42 cm.	114
Abb. 70: WGA-positive Granulozyten und Lymphozyten. Neugeborenes Tier.	115
Abb. 71: ECA-positive neutrophilen Granulozyten. Neugeborenes Tier.	115
Abb. 72: PNA-positive neutrophile Granulozyten. Neugeborenes Tier.	116
Abb. 73: Doppelfärbung mit FITC-WGA und Rho-Con A, neutrophiler Granulozyt. SSL 51 cm.	116
Abb. 74: WGA-positiver eosinophiler Granulozyt. SSL 89 cm.	116
Abb. 75: WGA-positive Thrombozyten und deren Zellausläufer. Neugeborenes Tier.	117
Abb. 76: VVA-positive Thrombozyten. Neugeborenes Tier.	118
Abb. 77: Koagulum aus aktivierten, ECA-positiven Thrombozyten. Ficoll®. Neugeborenes Tier.	118
Abb. 78: WGA-positive differenzierte Zelle. SSL 53 cm.	118
Diagr. 1: Veränderungen in der Anzahl der kernhaltigen Zellen pro $\mu\text{l}$ Nabelschnurblut im Laufe der Trächtigkeit.	71
Diagr. 2: Veränderungen in der Anzahl der kernhaltigen Erythroblasten pro $\mu\text{l}$ Nabelschnurblut im Laufe der Trächtigkeit.	72
Diagr. 3: Veränderungen in der Anzahl der Leukozyten pro $\mu\text{l}$ Nabelschnurblut im	

Laufe der Trächtigkeit.	73
Diagr. 4: Veränderungen in der Anzahl der reifen Granulozyten und Lymphozyten/Monozyten pro $\mu\text{l}$ Nabelschnurblut im Laufe der Trächtigkeit.	73
Diagr. 5: Prozentualer Anteil der Ki-67-positiven Lymphozyten und Erythroblasten im Verlauf der Trächtigkeit.	74
Diagr. 6: Verlauf der CD68+ Zellen während der Gravidität.	76

## XI Anhang

### Lösungen für die Lichtmikroskopie, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und Glykohochemie

#### Giemsa-Lösung

Giemsa-Stammlösung	0,3 ml
Aqua dest.	ad 10 ml

#### PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,4

NaCl <sup>1</sup>	42,50 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	6,35 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	1,95 g
Aqua dest.	ad 5,00 l
pH auf 7,4 einstellen	

#### TRIS-Puffer, pH 6,8

NaCl	43,90 g
TRIZMA-HCl <sup>2</sup>	34,25 g
TRIZMA-Base <sup>2</sup>	4,50 g
Aqua dest.	ad 5,00 l
pH auf 6,8 einstellen	

#### TRIS-Puffer, pH 7,4

NaCl	43,90 g
TRIZMA-HCl <sup>2</sup>	34,25 g
TRIZMA-Base <sup>2</sup>	4,50 g
Aqua dest.	ad 5,00 l
pH auf 7,4 bis 7,6 einstellen	

#### Ammoniumchlorid-Lysis-Puffer

NH <sub>4</sub> Cl <sup>1</sup>	8,29 g
NaHCO <sub>3</sub> <sup>1</sup>	0,842 g
EDTANa <sub>2</sub> <sup>1</sup>	0,0372 g
Aqua dest.	ad 1,00 l
pH auf 7,4 einstellen	

#### Wasserstoffperoxidlösung zur Hemmung der endogenen Peroxidase

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%ig) <sup>1</sup>	50 ml
Aqua dest	150 ml

### DAB-Wasserstoffperoxid-Lösung

#### Lösung A:

Aqua dest.	60 ml
DAB <sup>6</sup>	6 Tab.

#### Lösung B:

Aqua dest.	5 ml
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1</sup>	15 µl

#### Gebrauchslösung:

Lösung A	60 ml
Lösung B	400 µl

Gut mischen und filtrieren

## **Lösungen für Elektronenmikroskopie**

### Cacodylat-Puffer

#### Lösung A:

Cacodylat Na(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO <sub>2</sub> x 3H <sub>2</sub> O <sup>4</sup>	8,56 g
Aqua dest.	ad 200 ml

#### Lösung B:

HCl 0,2 M <sup>1</sup>

#### Cacodylat-Puffer 0,2 M, pH 7,2:

Lösung A	50,0 ml
Lösung B	4,2 ml
Aqua dest.	ad 100,0 ml

#### Cacodylat-Puffer 0,1 M, pH 7,2:

Cacodylat-Puffer 0,2 M	50 ml
Aqua dest.	50 ml

### Fixierungslösung nach Karnovsky

#### 10% Paraformaldehyd-Lösung

Paraformaldehyd <sup>1</sup>	10 g
Aqua dest.	ad 100 ml
NaOH, 1 M <sup>1</sup>	bis zu 6 Tropfen

#### Karnovsky Stammlösung

Paraformaldehyd-Lösung, 10%	20 ml
Cacodylat-Puffer, 0,2 M	50 ml
Kalziumchlorid, wasserfrei <sup>5</sup>	0,05g

#### Karnovsky Gebrauchslösung

Karnovsky Stammlösung	10 ml
Glutaraldehyd, 25% <sup>4</sup>	1,37 ml

Osmiumtetroxid (1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%)-Kontrastierungslösung

Osmiumtetroxid-Lösung, 2%

Osmiumtetroxid, 4%ig<sup>3</sup> 2 ml

Cacodylat-Puffer, 0,1 M 2 ml

Kaliumferrocyanid-Lösung, 3%

Kaliumferrocyanid<sup>2</sup> 0,3 g

Cacodylat-Puffer, 0,1 M ad 10 ml

Osmiumtetroxid (1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%) in Cacodylat-Puffer, 0,1 M

Osmiumtetroxid-Lösung, 2% 4 ml

Kaliumferrocyanid-Lösung, 3% 4 ml

Epon

Poly/bed 812<sup>3</sup> 16 ml

DDSA<sup>3</sup> 10 ml

NMA<sup>3</sup> 9 ml

DMP-30<sup>3</sup> 0,3 – 0,5 ml

Bleicitrat-Lösung nach Reynolds

Natriumcitrat Stock

Natriumcitrat  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2 \text{H}_2\text{O}$ <sup>1</sup> 35,7 g

Aqua dest ad 100 ml

Bleinitrat Stock:

Bleinitrat  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ <sup>1</sup> 33,1 g

Aqua dest ad 100 ml

Bleicitrat-Lösung

Aqua dest. 16 ml

Natriumcitrat Stock 3 ml

Bleinitrat Stock 2 ml

NaOH, 1 M<sup>1</sup> 4 ml

Aqua dest. ad 100 ml

**Lösungen für die Fällung der IgG-Fraktion aus dem Eidotter**

TBS, pH 7,3

TRIS<sup>2</sup> 6,05 g

NaCl<sup>1</sup> 43,5 g

Aqua dest. in 5 l

pH mit konz. HCl auf pH 7.3 einstellen

## XI Anhang

---

### Dextransulfat, 10%-ig

Dextransulfat (Mol. Wt. 500.000) <sup>2</sup>	1,5 g
Aqua dest.	15 ml

### Kalziumchlorid-Lösung, 1M

CaCl <sub>2</sub> <sup>2</sup>	73,51 g
Aqua dest.	1 l

### Dialysepuffer, pH 7,8

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>1</sup>	29,03 g
NaCl <sup>1</sup>	45 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>1</sup>	1,65 g
Aqua dest.	5 l
pH ohne Einstellen erreichen	

## **Lösungen für ELISA**

### SDS-Puffer

TRIS HCl <sup>2</sup>	30mM
EDTA <sup>1</sup>	3 mM
SDS 7,5 % im Puffer	

### Bicarbonat-Puffer pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>1</sup>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub> <sup>1</sup>	2,93 g
Aqua dest.	ad 1 l

### Wasserstoffperoxid-TMB-Lösung

#### Zitronensäure-Puffer

Zitronensäure Monohydrat (0,21 mol/l) <sup>1</sup>	44,129 g
KOH (1M) <sup>1</sup>	200 ml
Aqua dest.	800 ml
pH mit 1M KOH auf 3,95 einstellen	

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Puffer

Puffer	500 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%ig) <sup>1</sup>	168 µl

#### Wasserstoffperoxid-TMB-Lösung

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Puffer	10 ml
TMB <sup>2</sup>	0,5 ml

ELISA-Spülflüssigkeit

NaCl <sup>1</sup>	85,5 g
Tween <sup>2</sup>	2,5 ml
Aqua dest	10 l

PBS-Puffer pH 7,2

NaCl <sup>1</sup>	33,95 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>1</sup>	7,35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>1</sup>	2,15 g
Aqua dest.	5 l

**Lösungen für Western Blot**

Coomassie-Färbelösung

PhastGel BlueR <sup>7</sup>	1 Tab.
Aqua dest.	80 ml
Methanol <sup>1</sup>	120 ml
Vor Gebrauch filtrieren	

Coomassie-Entfärbelösung

Methanol <sup>1</sup> (30 %ig)	150 ml
Eisessig <sup>1</sup> (10%ig)	50 ml
Aqua dest.	300 ml

Coomassie-Fixierer

Glycerin <sup>1</sup> (5 %ig)	25 ml
Eisessig <sup>1</sup> (10 %ig)	50 ml
Aqua dest.	425 ml

Anodenpuffer I

TRIS <sup>2</sup>	18,6 g
Methanol <sup>1</sup>	100 ml
Aqua dest.	400 ml

Anodenpuffer II

TRIS <sup>2</sup>	1,51 g
Methanol <sup>1</sup>	100 ml
Aqua dest.	400 ml

## XI Anhang

---

### Kathodenpuffer

$\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure <sup>2</sup>	2,62 g
Methanol <sup>1</sup>	100 ml
Aqua dest.	400 ml

### NBT/BCIP-Lösung

NBT/BCIP, Tuloidinsalz <sup>2</sup>	1 Tab.
Aqua dest.	10 ml

1 Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

2 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

3 Polysciences Inc., Warrington

4 Agar Scientific LTD, Stansted

5 Serva, Heidelberg

6 Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Dänemark

7 Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg



## **XII Danksagung**

Für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die stets gute Beratung und Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz sehr herzlich danken.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Tieranatomie II, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt C. Neumüller für ihre Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Bei G. Rußmeier, Ch. Zahn und M. Kosarian möchte ich mich für die Einarbeitung in lichtmikroskopischen, immun- und glykohistochemische Techniken bedanken. S. Baidnl danke ich vielfach für die Unterstützung bei technischen und fachlichen Problemen mit dem Computer. Für die Hilfe bei den Formatierungsarbeiten am Computer danke ich herzlich PD Dr. S. Reese.

Für die Unterstützung bei der Probennahme danke ich den Mitarbeitern der Gynäkologischen Tierklinik der LMU, insbesondere Dr. P. Weisser sowie H. Kelm für die Hilfe am Schlachthof.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. G. Arnold für die Synthese der Peptidsequenzen bedanken. Einen besonderen Dank möchte ich auch Prof. Dr. M. Erhard, M. LeBris und den Mitarbeitern des Institutes für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene aussprechen für die Betreuung der Legehennen und für die tatkräftige Unterstützung bei der Immunisierung der Legehennen sowie bei der Aufreinigung der Dotterantikörper.

Für die Einarbeitung und nette Unterstützung bei der Durchführung der Enzymimmunoassays bedanke ich mich herzlich bei M. Moravek und den Mitarbeitern des Institutes für Hygiene und Technologie der Milch.

S. Mitterer danke ich für das Korrekturlesen.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die mir die Ausbildung ermöglicht haben und mich während der gesamten Zeit uneingeschränkt unterstützt haben. Insbesondere möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Vater für viele aufschlußreiche Einblicke in die Tiermedizin und für die Unterstützung bei der Probennahme bedanken. Zusätzlich möchte ich mich bei Alex bedanken, der mir stets ermutigend zur Seite stand.

## **XIII Lebenslauf**

### persönliche Daten

Name	<u>Dagmar</u> Elisabeth Ruth Grandel
Geburtsdatum	11.03.1977
Geburtsort	Regensburg
Familienstand	verheiratet

### Schulausbildung

Sep. 1983-Jul. 1987	Grundschule Diesenbach
Sep. 1987-Jun. 1996	Albrecht-Altdorfer-Gymnasium, Regensburg
28.06.1996	Abitur

### Studium und Promotion

Nov. 1996-Jan. 2002	Studium der Veterinärmedizin an der LMU München
08.01.2002	Staatsexamen
21.02.2002	Approbation
Apr. 2002 - Okt. 2004	Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit
Jun. 2002 - Mai 2004	Graduierten-Stipendium der LMU