

**Entwicklung eines
fetalspezifischen Antikörpers
zur Charakterisierung
fetaler erythroider Zellen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Silke Zimmermann

geboren am 06.08.1973 in Celle

2004

Referat: Prof. Dr. Bernd Otto
Korreferat: Prof. Dr. Walter H. Müller
Tag der Promotion: 02.08.2004

„Wachsen will ich um jeden Preis ...“

(Paula Modersohn-Becker)

Abstract

The development of haematopoietic cells is characterized by a changing morphology and alterations in antigen expression during different stages of maturation. Known monoclonal antibodies against surface and intracellular antigens permit the determination of specific expression patterns associated with cell development. However, there is still no surface antigen described, which is exclusively expressed on fetal erythroid cells during ontogeny. The aim of this study was the development of monoclonal antibodies, which enable the characterization of fetal erythroid cells as well as their differentiation from adult erythroid blood cells and leucocytes respectively.

Known and often used markers for the determination of erythroid cells are glycophorin A, CD71 (transferrin receptor), CD36 (thrombospondin receptor) and galactose specific soybean agglutinin ligand. However, these surface markers are not only expressed on adult and on fetal erythroid cells but as well on subsets of leucocytes. Comparative analyses of the specificity of these markers and of the newly developed antibodies have been performed on mononuclear cells in umbilical cord blood and adult tissues. Extensive examinations of a selected antibody were additionally performed on fetal tissues such as liver, bone marrow, blood and umbilical cord blood as well as on adult blood, bone marrow, liver and erythroid cell lines.

The investigation resulted in the development of monoclonal antibody 4B9 and in the characterization of its binding specificity towards surface structures of fetal erythroid cells. The 4B9 antigen was expressed on cells of all maturation stages during fetal erythropoiesis, e.g. on undifferentiated proerythroblasts and maturing erythroblasts as well as on erythrocytes. Furthermore, the 4B9 antigen could be detected during the entire ontogeny of the fetus from embryonic erythropoiesis until the time of birth. The 4B9 antigen was not expressed during erythropoiesis in the adult. It is shown that the 4B9 antigen is neither a surface marker on erythroid cells like CD71, CD36, glycophorin A nor one of the blood group antigens I and i. Because of its unique specific expression it is most likely a fetus specific antigen not described so far, which can be useful for the characterization and identification of fetal erythroid cells.

Keywords: fetal erythropoiesis, immunophenotyping, monoclonal antibodies

Zusammenfassung

Die Entwicklung hämatopoetischer Zellen ist in verschiedenen Differenzierungsstadien durch Veränderungen der Morphologie und der Antigenexpression geprägt. Für die Zellentwicklung spezifische Expressionsmuster können mit Hilfe bekannter monoklonaler Antikörper, die gegen Oberflächen- und intrazelluläre Antigene gerichtet sind, charakterisiert werden. Im Verlauf der Ontogenese ist bislang kein Oberflächenantigen beschrieben, das ausschließlich auf fetalen erythroiden Zellen gebildet wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung monoklonaler Antikörper, mit denen fetale erythroide Zellen charakterisiert und von adulten erythroiden Blutzellen sowie Leukozyten differenziert werden können.

Bei den bekannten und zur Beschreibung erythroider Zellen häufig genutzten Markern handelt es sich um Glykophorin A, CD71 (Transferrin-Rezeptor), CD36 (Thrombospondin-Rezeptor) und membranständige Galaktose, die über SBA (Sojabohnenagglutinin) gebunden wird. Diese Oberflächenmarker werden sowohl auf adulten als auch auf fetalen erythroiden Zellen sowie auf Leukozytensubpopulationen exprimiert. Mit Hilfe dieser Marker wurden vergleichende Untersuchungen zur Spezifität der entwickelten Antikörper an mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut und adulten Geweben durchgeführt. Zusätzlich wurden umfassende Untersuchungen des Antikörpers an fetalen Geweben wie Leber, Knochenmark, Blut und Nabelschnurblut sowie adultem Blut, Knochenmark, Leber und erythroiden Zelllinien vorgenommen.

Die Untersuchungen resultierten in der Entwicklung des Antikörperklons 4B9, der spezifisch an Oberflächenstrukturen auf fetalen erythroiden Zellen gebunden hat. Das 4B9-Antigen wurde auf Zellen sämtlicher Reifungsstadien der fetalen Erythropoese, d.h. sowohl auf undifferenzierten Proerythroblasten, reifenden Erythroblasten und Erythrozyten exprimiert. Darüber hinaus war das 4B9-Antigen in der gesamten Ontogenese des Fetus, d.h. von der embryonalen Erythropoese bis zum Zeitpunkt der Geburt, nachweisbar. Im Verlauf der adulten Erythropoese wurde das 4B9-Antigen nicht exprimiert. Es wurde gezeigt, dass es sich beim 4B9-Antigen nicht um einen der auf erythroiden Zellen exprimierten Oberflächenmarker CD71, CD36, Glykophorin A oder die Blutgruppenantigene I und i handelt. Aufgrund der spezifischen Expression liegt die Vermutung nahe, dass es sich um ein noch nicht beschriebenes, fetalspezifisches Antigen handelt, das sich zur Charakterisierung und Identifizierung fetaler erythroider Zellen eignet.

Schlagerwörter: fetale Erythropoese, Immunphänotypisierung, monoklonale Antikörper

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract

Zusammenfassung

1	Einleitung	13
1.1	Die humane Erythropoese im Verlauf der Ontogenese.....	13
1.1.1	Embryonale Blutbildung	14
1.1.2	Fetale hepatolienale Blutbildung	16
1.1.3	Fetale und adulte medulläre Blutbildung	16
1.2	Differenzierung erythroider Zellen.....	17
1.2.1	Morphologische Charakteristika	17
1.2.2	Expression von Oberflächenantigenen.....	18
1.3	Isolierung und Identifizierung fetaler erythroider Zellen	20
1.4	Zielsetzung	21
2	Material.....	23
2.1	Geräte.....	23
2.2	Verbrauchsmaterialien	23
2.3	Chemikalien und Lösungen	23
2.4	Antikörper	24
2.4.1	Primärantikörper.....	24
2.4.2	Sekundärantikörper und Tertiärreagenzien	25
2.4.3	Isotypkontrollen	25
2.5	Puffer und Medien	26
2.6	Gewebe	26
2.7	Zelllinien.....	27

3	Methoden	29
3.1	Gewinnung mononukleärer Zellen aus Vollblut.....	29
3.2	Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung	29
3.3	Kryokonservierung.....	30
3.4	Auftauen mononukleärer Zellen.....	30
3.5	Kultivierung humaner Zellen	31
3.6	Zellpräparationen.....	32
3.6.1	Herstellung von Blutausstrichen.....	32
3.6.2	Herstellung von Zytospinpräparaten.....	32
3.6.3	Herstellung von Gefrierschnitten	32
3.6.4	Stabilisierung von Erythrozyten.....	32
3.7	Entwicklung monoklonaler Antikörper.....	33
3.7.1	Bereitstellung des Antigens und Immunisierung	33
3.7.2	Selektion von B-Zell-Hybridomen und Klonierung.....	33
3.7.3	Reinigung und Markierung von Antikörpern	34
3.7.4	Isotypbestimmung	34
3.8	Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie	35
3.8.1	Direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	35
3.8.2	<i>Screening</i> von Hybridomaklonen.....	36
3.8.3	Überprüfung einer Bindung an Haupt-Blutgruppenantigene.....	37
3.8.4	Kompetition von Antikörperklonen.....	37
3.8.5	Analyse gefärbter Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	38
3.9	Färbungen für die Mikroskopie	39
3.9.1	Zytochemische Färbung von Blutausstrichen zur Zelldifferenzierung ..	39
3.9.2	Immunfärbungen mit der APAAP-Methode	40
3.9.3	Immunzytochemische Färbung mit UltraVision	40
3.9.4	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	41
3.9.5	Analyse gefärbter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	41

4	Ergebnisse	43
4.1	Spezifisches Expressionsprofil auf fetalen und adulten erythroiden Zellen..	43
4.2	Selektion von Antikörper produzierenden Hybridomaklonen	46
4.2.1	Etablierung des Selektionsverfahrens	46
4.2.1.1	Bestimmung des Anteils an Erythroblasten in Nabelschnurblut.....	46
4.2.1.2	Differenzierung kernhaltiger und kernloser Zellen mittels LDS 751	47
4.2.1.3	Unterscheidung von Leukozytensubpopulationen über CD45	48
4.2.1.4	Identifizierung erythroider Vorläuferzellen mittels CD71	48
4.2.1.5	Multi-Parameter-Analyse zur Selektion von Antikörperklonen	50
4.2.2	<i>Screening</i> von Antikörper produzierenden Hybridomaklonen	51
4.3	Charakterisierung der neuen Antikörperklone 4B8, 4B9 und 5D10	53
4.3.1	Isotypisierung	53
4.3.2	Untersuchung der Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an Haupt- Blutgruppenantigene	53
4.3.3	Überprüfung der Bindung an Zelllinien mit erythroiden Merkmalen.....	54
4.3.3.1	Leukämische Zelllinie K-562	55
4.3.3.2	Erythroide Zelllinie KMOE-2	56
4.3.4	Analyse einer kompetitiven Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10	57
4.4	Charakterisierung der Bindung von 4B9 und 5D10 an Zellen aus adulten Gewebe	59
4.4.1	Untersuchung der Bindung an MNCs aus adultem Blut	59
4.4.2	Überprüfung der Bindung an Zellen aus adultem Knochenmark.....	61
4.4.2.1	Charakterisierung von adultem Knochenmark mittels bekannter Marker und dem 4B9-Antigen.....	61
4.4.2.2	Charakterisierung 4B9-positiver Knochenmarkzellen	63
4.4.2.3	Mikroskopische Analyse adulter Knochenmarkzellen	63
4.4.3	Untersuchung von adultem hämolymphatischem Gewebe	65
4.5	Vergleich der 4B9-Expression auf Zellen aus Nabelschnurblut und adultem Blut.....	66
4.6	Charakterisierung der Bindung von 4B9 an Zellen aus fetalen Geweben....	67
4.6.1	Nachweis der Bindung von 4B9 an embryonale Zellen aus Dottersackgewebe.....	67
4.6.2	Untersuchung der 4B9-Expression auf Zellen aus fetaler Leber	68

4.6.3	Bindung von 4B9 an fetale Knochenmarkzellen	69
4.6.4	Untersuchung der 4B9-Expression auf Zellen aus fetalem Blut	70
4.6.5	Verteilung des 4B9-Antigens auf MNCs aus Nabelschnurblut	72
4.6.6	Überprüfung einer Bindung von 4B9 auf fetalen lymphoiden Zellen	73
4.7	Übersicht: Ergebnisse histologischer und zytologischer Analysen	74
4.8	Immunphänotypisierung erythroider Zellen aus Nabelschnurblut	75
5	Diskussion	77
5.1	Das 4B9-Antigen wird auf differenzierten Zellen der embryonalen und fetalen Erythropoese exprimiert.....	77
5.2	Charakterisierung der Bindung von 4B9 im Verlauf der Ontogenese	79
5.3	Vergleich der Expression des 4B9-Antigens mit der Bildung von bekannten Oberflächenmarkern auf erythroiden Zellen.....	82
5.4	Potentieller diagnostischer Nutzen des neuen Antikörperklons	85
5.5	Ausblick	88
6	Literatur.....	89
7	Anhang.....	97
7.1	Abbildungsverzeichnis	97
7.2	Tabellenverzeichnis	99
7.3	Abkürzungen.....	101
7.4	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	103
7.5	Dank	105

1 EINLEITUNG

Die menschliche Erythropoese ist vergleichsweise weniger umfangreich als die Leukozytopoese, stellt aber dennoch einen umfassenden Bereich der Hämatologie dar. Die embryonale, die fetale und die adulte Erythropoese unterscheiden sich hinsichtlich des Blutbildungsortes, der gebildeten Zellstadien, aber auch in Bezug auf Einflüsse durch Wachstumsfaktoren und die Form des Hämoglobins, das gebildet wird. Es wird vermutet, dass fetale und adulte erythroide Blutzellen sich auch in der Expression von Oberflächenmarkern unterscheiden. Zurzeit sind jedoch nur Antigene bekannt, die sowohl auf erythroiden Zellen des fetalen und des adulten Organismus als auch auf Leukozytensubpopulationen gebildet werden. Aufgrund der Tatsache, dass kein fetalspezifischer Marker zur Verfügung steht, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, neue monoklonale Antikörper zu entwickeln und deren spezifische Bindung an fetale Erythroblasten zu untersuchen. Mit Hilfe eines Markers, der fetale und adulte Zellen differenziert, könnten fetale Zellen isoliert und identifiziert, sowie einzelne Phasen innerhalb der fetalen Erythropoese näher charakterisiert werden.

1.1 Die humane Erythropoese im Verlauf der Ontogenese

Die Erythropoese, d.h. die Bildung und Entwicklung der roten Blutkörperchen, ist ein Zweig der Hematopoese, der sich wie die Thrombozytopoese, die Granulozytopoese und die Bildung der Monozyten von myeloiden Stammzellen ableiten lässt (s. Abb.1).

Im Verlauf der Erythropoese lassen sich unreife, kernhaltige erythroide Vorläuferstadien und reife, kernlose Erythrozyten unterscheiden. Die myeloiden, pluripotenten Stammzellen werden auch als CFU-GEMM (*colony-forming units-granulocytes, erythrocytes, monocytes, megakaryocytes*) bezeichnet. Bei der Einnistung ins Knochenmarkgewebe bilden sie Kolonien aus determinierten Vorläuferzellen. Aus diesen Vorläufern entwickeln sich bei der Erythropoese die burst-forming units-erythroid (BFU-E), die sich wiederum zu colony-forming units-erythroid (CFU-E) differenzieren. Diese beiden Vorläuferstadien, BFU-E und CFU-E, sind morphologisch noch nicht unterscheidbar, sondern lassen sich nur mit Hilfe von Zellkultur-Assays anhand der Kolonienbildung identifizieren. Aus diesen Stadien entwickeln sich die morphologisch unterscheidbaren Erythroblasten, die sich über das Retikulozytenstadium zu Erythrozyten differenzieren (Alter, 1994).

Das Blutkreislaufsystem ist das erste funktionierende Organsystem im Embryo. Die ersten Entwicklungsprozesse des Gefäßsystems setzen bereits zwischen dem 18. und 26. Tag ein (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2002). Die fetale Hämatopoese gliedert sich in drei Abschnitte: die embryonale (megaloblastische) Phase in Blutinseln des Dottersacks, die hepatolienale Phase in der Leber und die medulläre Phase im Knochenmark. Das

Knochenmarksgewebe bleibt im adulten Organismus letztlich der alleinige Blutbildungsort (Peault, 1996; Hann, 1994a).

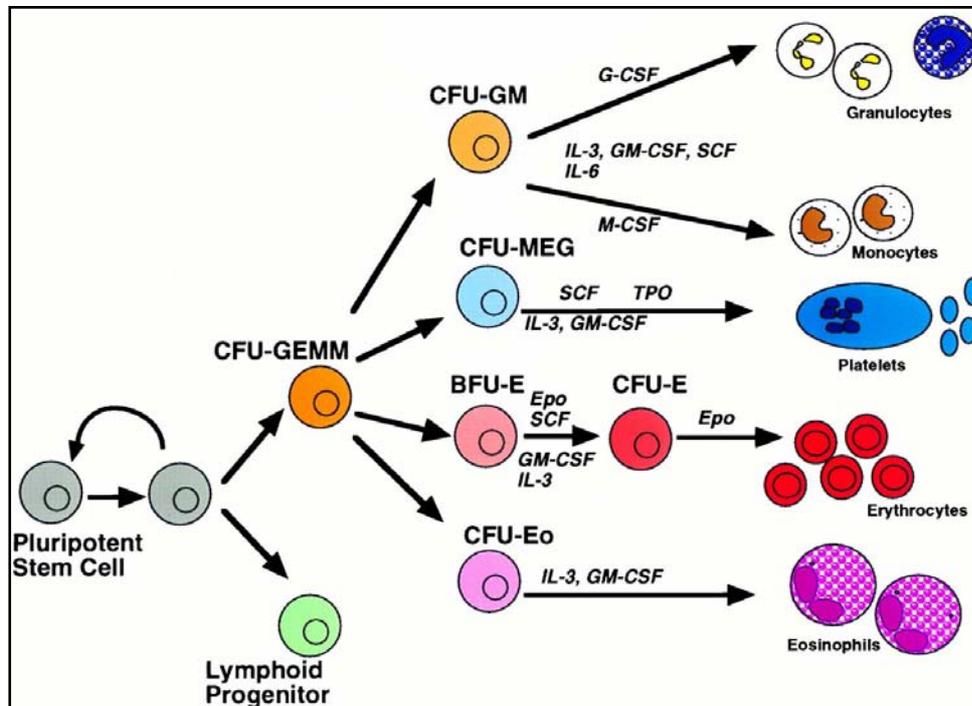


Abbildung 1: Übersicht der Erythropoese

Schematische Darstellung der Entwicklung erythroider, lymphoider und myeloider Zellen aus einer pluripotenten Stammzelle. Das Stadium der CFU-GEMM (CFU: colony-forming units, GEMM: granulocytes, erythrocytes, monocytes, megakaryocytes) entspricht dem der myeloiden Stammzelle.

1.1.1 Embryonale Blutbildung

Die frühe Entwicklung eines Gefäßsystems findet ausschließlich im extraembryonalen Mesenchym an der Wand des Dottersacks in so genannten Blutinseln statt. Bei den zentralen Zellen dieser Inseln handelt es sich um große, kernhaltige Stammzellen, die Hämangioblasten. Die Tochterzellen der Hämangioblasten differenzieren sich in dieser frühen Phase in zwei Richtungen, die Angioblasten und die Hämozytoblasten. Die weiter innen lokalisierten hämatopoetischen Zellen, die Hämozytoblasten, werden zu den Stammzellen des Blutes. Die eher am Rand liegenden, einen länglichen Zellkern besitzenden Angioblasten bilden Endothelzellschläuche aus, die Hohlräume umschließen und dadurch zu ersten kapillarartigen Gefäßen werden (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2002). Die 1. Phase der Blutbildung beginnt etwa zwischen dem 15. und 18. Tag mit der Entstehung der ersten Hämozytoblasten (Megaloblasten) im Dottersack (s. Abb.2). Die sich daraus entwickelnden embryonalen Erythrozyten sind relativ groß und produzieren embryonales Hämoglobin. Außerdem bleiben sie in Besitz eines inaktiven Zellkerns. Das Maximum der Bildung dieser embryonalen Blutzellform liegt etwa in der 4. Woche, dauert

an bis zur 6. bis 8. Woche und ist ab der 10. Woche nicht mehr nachweisbar (Sinowatz et al., 1999).

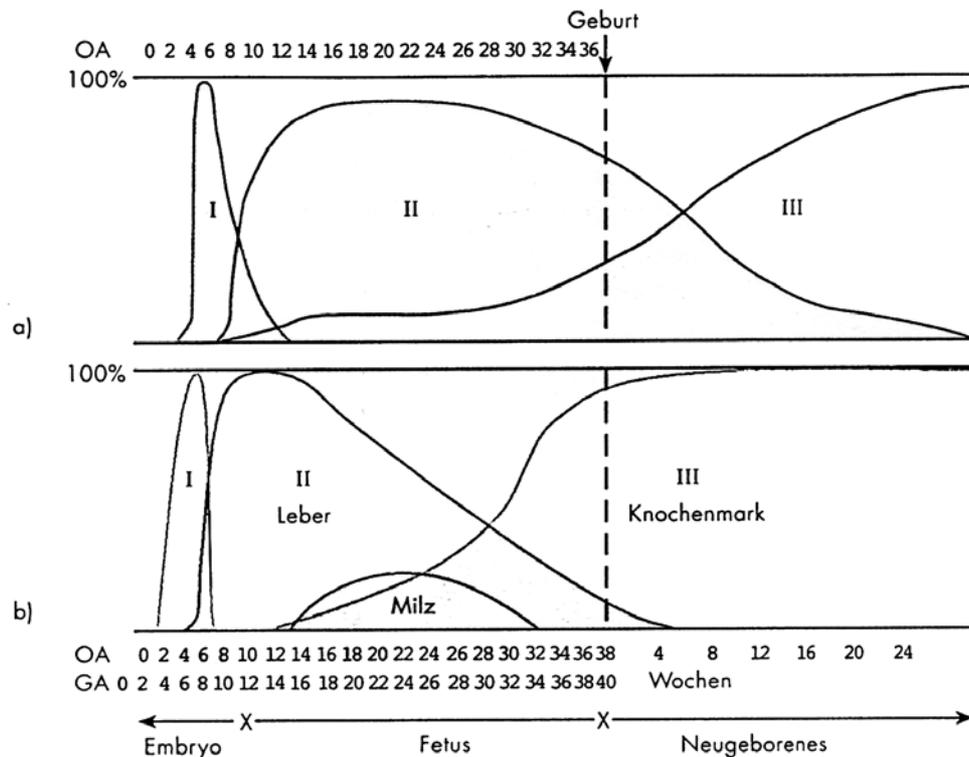


Abbildung 2: Phasen der Hämoglobinbildung und Erythropese während der Fetalentwicklung des Menschen.

(a) Prozentualer Anteil am Gesamthämoglobin. I = embryonales Hämoglobin ($\zeta_2\varepsilon_2, \alpha_2\varepsilon_2, \delta_2\gamma_2$); II = fetales Hämoglobin ($\alpha_2\gamma_2$); III = adultes Hämoglobin ($\alpha_2\beta_2, \alpha_2\delta_2$). (b) Prozentualer Anteil an der Gesamterythropese. I = megaloblastische Phase (extraembryonale Blutbildung); II = hepatolienale Blutbildung; III = medulläre Blutbildung. OA = Ovulationsalter; GA = Gestationsalter. (nach Nathan und Oski, 1981, aus Funktionelle Embryologie, Rohen und Lütjen-Drecoll, 2002).

Die Hämatopoese im Dottersack grenzt sich stark von der späteren Hämatopoese an anderen Blutbildungsstellen ab. Zum einen findet im Dottersack ausschließlich Erythropese statt, obwohl nachweisbar multipotente Stammzellen vorhanden sind, die sich auch zu anderen hämatopoetischen Zellen differenzieren könnten. Weiterhin ist diese Phase der Erythropese nicht durch Erythropoetin (EPO), einem zu den Zytokinen gehörenden hämatopoetischem Wachstumsfaktor, stimulierbar. Es ist nicht bekannt, ob es sich hierbei tatsächlich um eine Unabhängigkeit von EPO handelt, oder ob die Erythropese schon vollständig durch EPO gesättigt ist, so dass eine weitere Stimulation nicht mehr möglich ist. Letztlich ist für die Hämatopoese im Dottersack charakteristisch, dass keine Ausschleusung des Zellkerns stattfindet, so dass das reife Stadium der Erythropese im Dottersack ein kernhaltiger, kurzlebiger Erythrozyt ist (Tavassoli, 1991).

1.1.2 Fetale hepatolienale Blutbildung

Während und nach der Rückbildung des Dottersacks findet die nächste Phase der embryonalen Erythropoese im Mesenchym der Leberanlage (ab 4. Woche bis nach der Geburt) und etwas später auch in der Milz (12. bis 32. Woche) statt (s. Abb.2). Es wird angenommen, dass die Entwicklung hämatopoetischer Organe (Leber, Milz, Knochenmark) von der Kolonialisierung durch im Dottersack gebildete, zirkulierende Hämozytoblasten abhängig ist (Metcalf und Moore, 1970).

Bis zum 3. Monat entwickeln sich aus den eingewanderten Hämozytoblasten zunächst kernhaltige, dann zunehmend kernlose Erythrozyten. Die Proliferationsrate hämatopoetischer Zellen hepatolienaler Abstammung ist zunächst sehr hoch, d.h. die Zellen verdoppeln sich alle acht Stunden. Später verringert sich die Verdopplungszeit auf zwei Tage. An dieser Stelle werden die Zelldifferenzierung und die schnelle Vermehrung von Erythrozyten durch den Wachstumsfaktor EPO reguliert (Tavassoli, 1991). Die in der Leber entstandenen Erythrozyten enthalten fetales Hämoglobin (HbF) und haben eine Lebensspanne von etwa 50 Tagen. Diese Form von Erythrozyten zirkuliert während der gesamten Embryonalzeit und noch kurze Zeit nach der Geburt im Blutkreislauf. In dieser Phase der Blutentwicklung sind in der Leber und der Milz auch die ersten Vorstufen von Granulozyten nachzuweisen, die ebenfalls aus Hämozytoblasten entstehen. Dennoch findet in der Leber überwiegend die Bildung erythroider Zellen statt, wie das Verhältnis von Erythroblasten zu Granulozyten (5:1) zeigt (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2002).

1.1.3 Fetale und adulte medulläre Blutbildung

Ab der 10. Woche beginnt auch die Erythropoese im Mesenchym des Knochenmarks, wo sich hämatopoetische Stammzellen, die über die Blutzirkulation aus der Leber kommen, einnisten und proliferieren. Die dort gebildeten Erythrozyten enthalten adultes Hämoglobin (s. Abb.2). Ein deutlicher Wechsel des Hauptbildungsortes hämatopoetischer Zellen von der Leber in das fetale Knochenmark findet allerdings erst ab der 16. Woche statt. Als Folge der medullären Blutbildung treten die Blutbildungsherde von Leber und Milz nach und nach in den Hintergrund. Etwa ab der 11. Woche kann die Bildung von Stammzellen der Granulozyten (Myelozytopoese bzw. Granulozytopoese) sowie ab der 12. Woche die Bildung der Lymphozyten (Lymphozytopoese) beobachtet werden. Die Hämatopoese im Knochenmark dominiert schließlich ab der 28. Woche und die Blutbildung in der Leber nimmt bis zur Geburt nur noch einen geringen Stellenwert ein. Der Verlauf von fetaler und adulter Erythropoese ist ab diesem Zeitpunkt identisch, nur der Anteil an kernhaltigen Erythroblasten im adulten Knochenmark hat sich gegenüber dem in der fetalen Entwicklung dezimiert. Zum Zeitpunkt der Geburt ist das gesamte Knochenmark des Fetus hämatopoetisch aktiv. Nach der Umwandlung in überwiegend gelbes Knochenmark

ist die Bildung der Blutzellen auf das rote Knochenmark beschränkt, welches sich in den kurzen und platten Knochen sowie in den Röhrenknochen befindet (Sinowitz et al., 1999).

Im adulten Organismus bleibt das Knochenmark alleiniger Ort der Blutbildung. Die Blut bildenden Zellen bleiben in Matrix eingebettet, bis sie nach der Reifung in das periphere Blut abgegeben werden. Neben retikulärem Bindegewebe und Retikulumzellen können im roten Knochenmark Stammzellen, reife und unreife Zellen der Erythropoese, Granulo- und Thrombozytopoese, sowie Monozyten nachgewiesen werden. Die Lymphozytopoese erfolgt aus pluripotenten Stammzellen in den lymphatischen Organen Leber, Milz und Lymphknoten (Alter, 1994).

1.2 Differenzierung erythroider Zellen

Die Differenzierung und Reifung hämatopoetischer Zellen ist sowohl mit physikalischen und biochemischen Veränderungen als auch mit Änderungen bezüglich der Antigenexpression, die für jede Verzweigung in der Zellentwicklung spezifisch ist, verbunden. Eine Charakterisierung von Zellen kann anhand besonderer phänotypischer Merkmale erfolgen (Cha et al., 2004; Gulati und Hyun, 1994). Aufgrund erhöhter Aussagekraft werden zur Beschreibung von Zellen oder Zellpopulationen häufig morphologische Untersuchungen und Immunphänotypisierungen über spezifische Marker mittels Durchflusszytometrie miteinander kombiniert (Choolani et al., 2003; Bischoff et al., 2003).

1.2.1 Morphologische Charakteristika

Erythroide Zellen, die sich in der Entwicklung befinden, können anhand der Zellgröße, des Verhältnisses von Zytoplasma zu Zellkern, der Kernform und -dichte und anhand der Farbe des Zytoplasmas sowohl von Leukozyten als auch untereinander gut differenziert werden (s. Abb.3).

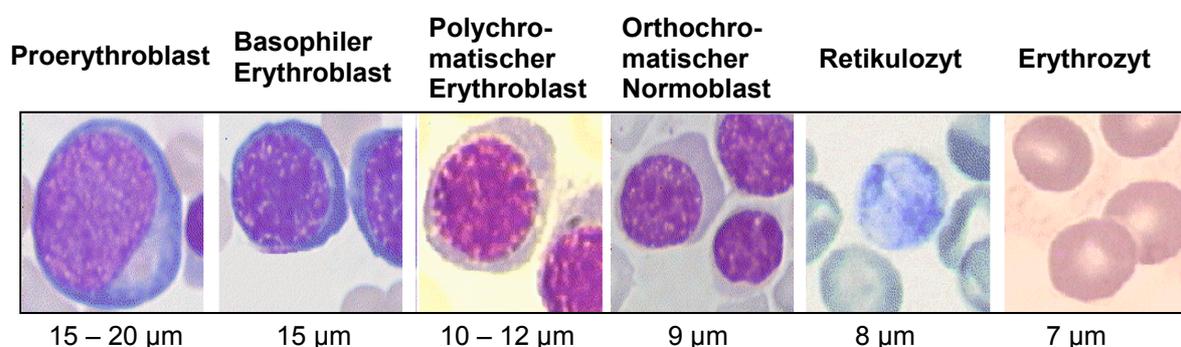


Abbildung 3: Differenzierung erythroider Zellen

Darstellung zytochemisch gefärbter erythroider Zellen vom frühen Proerythroblastenstadium bis zum kernlosen Erythrozyten.

Bei den ersten erythroiden Zellen, die morphologisch identifizierbar sind, handelt es sich um ca. 15 – 20 µm große, basophile Zellen, die Proerythroblasten. Diese Zellen weisen nach zytochemischer Färbung ein dunkelblaues Plasma, einen großen runden Zellkern mit homogenem Chromatin und bis zu zwei Nuklei auf. Der Zellkern nimmt im Verhältnis zum Zytoplasma ca. 90% des Zellvolumens ein. Die darauf folgende Entwicklungsstufe repräsentiert die basophilen Erythroblasten. Diese etwa 15 µm großen Zellen besitzen immer noch ein basophiles Zytoplasma, was hohen RNA- und Proteingehalt widerspiegelt. In diesem Stadium nimmt der Zellkern im Verhältnis zum Zytoplasma nur noch etwa 75 % des Zellvolumens ein. Die Teilung basophiler Erythroblasten erzeugt polychromatische Erythroblasten, auch polychromatische Normoblasten genannt, die wiederum kleiner sind als die Vorläuferzellen (10 – 12 µm). Das Zytoplasma hat einen gräulichen Farbton, der von ab diesem Zeitpunkt verstärkt gebildetem Hämoglobin herrührt. Der kondensierte, nahezu reife Zellkern nimmt nur noch etwa 60 % der gesamten Zelle ein. Die letzte kernhaltige Entwicklungsstufe beschreibt das Stadium des orthochromatischen Normoblasten, der durch Reifung und nicht mehr durch Zellteilung entsteht. Der Zellkern ist kompakt und membranständig, da dessen Ausschleusung aus der Zelle kurz bevor steht. Das Zytoplasma entspricht dem reifer Zellen, d.h. es weist einem hohen Hämoglobingehalt auf. Retikulozyten sind ca. 8 µm große Zellen, die bereits kernlos sind und ein granuläres, retikuläres Zytoplasma aufweisen. Der Retikulozyt verliert nach etwa 1 – 2 Tagen seine Basophilie und wird zum reifen Erythrozyt.

1.2.2 Expression von Oberflächenantigenen

Zur Charakterisierung und Isolierung verschiedener Zellarten und Entwicklungsstadien werden neben morphologischen Merkmalen auch membranständig oder intrazellulär lokalisierte Antigene genutzt. Durch Methoden wie die Durchflusszytometrie oder Mikroskopie wird eine simultane Untersuchung mehrerer Antigene ermöglicht.

Eine umfassende Gruppe von Markern auf erythroiden Zellen wird durch die Blutgruppenantigene gebildet. Dabei handelt es sich um auf der Erythrozytenmembran lokalisierte Glykoproteine. Es sind ca. 60 Oberflächenproteine auf Erythrozyten bekannt, von denen das D-Antigen des Rhesus-Systems und die A- und B-Antigene des ABO-Systems in Bezug auf Inkompatibilität während der Schwangerschaft und in der Transfusionsmedizin die wichtigsten sind. Das Blutgruppenantigen i ist als Marker auf der Oberfläche erythroider Zellen im Blut von Neugeborenen bekannt. Die Erythrozyten von Erwachsenen bilden Antigen I. Die meisten Anti I- und Anti i-Antikörper sind Kälteagglutinine und reagieren besser bei 4 °C als bei Körpertemperatur, weshalb sie im adulten Organismus nicht reaktiv sind. Eine erhöhte Expression von Antigen i im adulten Organismus ist mit veränderter Erythropoese assoziiert. In manchen Fällen werden bei Patienten mit spezifischen hämatologischen Erkrankungen wie chronischer Leukämie

oder aplastischer Anämie Antigen i-spezifische Autoantikörper gebildet. Die bislang beschriebenen Antikörper gegen Antigen i sind hauptsächlich vom Isotyp IgM und werden als wenig spezifisch eingestuft (Reid und Lomas-Francis, 2004; Navenot et al., 1997).

Eines der bekanntesten Antigene auf erythroiden Zellen ist Glykophorin A, ein Sialoglykoprotein, das auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Glykophorin A, oder auch CD235a, gehört ebenfalls zur Gruppe der Blutgruppenantigene und Proteine der Zellmembran, deren hoher Sialinsäureanteil die negative Oberflächenladung der Erythrozytenmembran bewirkt und deren Kohlenhydratstruktur antigene Eigenschaften haben kann. Die Expression von Glykophorin A ist ab dem Entwicklungsstadium des Proerythroblasten bis zum Stadium des Retikulozyten und Erythrozyten sowohl in adulter als auch in fetaler Erythropoese beschrieben (Bianchi et al., 1993; Okumura et al., 1992). CD71, der Transferrin-Rezeptor, wird auf adulten und fetalen frühen NRBCs gebildet, ist aber zum Zeitpunkt der Reifung vom Retikulozyten zum Erythrozyten nicht mehr auf der Zelloberfläche nachweisbar. Das 190 kDa große Protein wird außerdem schwach auf ruhenden Lymphozyten und verstärkt auf aktivierten Lymphozyten und allen proliferierenden Zellen exprimiert. Neben Glykophorin A wurde dieser Marker häufig dafür verwendet, erythroide Vorläuferstadien zu isolieren oder deren Differenzierung zu charakterisieren (Al-Mufti et al., 2001; Gubin et al., 1999; Bianchi et al., 1993; Newman et al., 1982).

CD36, auch als Thrombospondin-Rezeptor oder Glykoprotein IV bekannt, ist ein stark glykosiliertes Transmembranprotein, das u.a. als Zell-Adhäsions-Molekül fungiert und bei der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen mitwirkt. Das Glykoprotein wird verstärkt auf Thrombozyten, Retikulozyten, reifen Monozyten und Makrophagen exprimiert, kommt aber auch auf Endothelzellen und dendritischen Zellen vor (Telen, 2000). Da CD36 auch auf Vorläuferzellen der erythroiden Reihe gebildet wird, dient dieser Marker, wie CD71 und Glykophorin A, zur Charakterisierung und Isolierung erythroider Zellen (Ziegler et al., 1999).

Auf der Oberfläche von Blutzellen werden Glykoproteine oder -lipide (Zuckerketten enthaltende Moleküle) gebildet, die eine bedeutsame Rolle bei der Zellerkennung spielen. Erythrozyten sind stark glykosyliert, aber auch reife myeloide und lymphoide Zellen tragen Oligosaccharide auf der Zellmembran. Diese Tatsache wurde genutzt, um sowohl reife, erythroide als auch reife myeloide und lymphoide Zellen mit Hilfe des Lektins SBA (*soybean agglutinin*) anzureichern oder zu depletieren (Nagler et al., 1999; Migliaccio et al., 1992). SBA ist ein Glykoprotein mit vier Bindungsstellen, das membranständige Galaktose spezifisch über terminales α - oder β -N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) bindet (Nagao et al., 1992). Da die Bildung membranständiger Galaktose eng mit Entwicklung

und Reifung erythroider Vorläuferzellen verbunden ist, wurde SBA auch zur Isolierung fetaler erythroider Vorläuferzellen aus Schwangerenblut genutzt (Kitagawa et al., 2002). Weitere Marker, die sich zur Identifizierung und Charakterisierung der Entwicklung erythroider Zellen sowie zur Unterscheidung fetaler und adulter erythroider Zellen eignen, sind die Hämoglobine (Mavrou et al., 2003; Choolani et al., 2001; Al-Mufti et al., 2001). Die Hämoglobinmoleküle des Menschen sind aus 4-paarigen Proteinketten, den Globinen, aufgebaut. Die Quartärstruktur von Hämoglobinen besteht grundsätzlich aus 4 Ketten, wobei jeweils 2 vom α -Typ (α , ζ) und 2 vom β -Typ (ϵ , γ , δ und β) homologe Paare bilden. Die Synthese embryonaler Globinmoleküle erfolgt in der 4. bis 6. Woche anfangs auch noch in der Leber (s. Abb.1), wird dann aber durch die Bildung des fetalen Hämoglobins abgelöst (6. Woche bis postnatal). Adultes Hämoglobin (HbA) ist bei der Geburt nur bis zu 30 % vorhanden, da die eigentliche Umstellung von HbF auf HbA erst nach der Geburt erfolgt (Sinowatz et al., 1999).

1.3 Isolierung und Identifizierung fetaler erythroider Zellen

Eine Isolierung und Identifizierung fetaler erythroider Zellen verschiedener Entwicklungsstadien des Fetus bzw. die Isolierung erythroider Zellen verschiedener Zellstadien innerhalb der fetalen Erythropoese ist allein anhand von Oberflächenmarkern häufig nicht möglich. Sehr frühe Entwicklungsstadien wie die Kolonien bildenden BFU-E können mit Hilfe von CD34, einem bekannten Stammzellmarker, aus fetalem und adultem Knochenmark, aber auch aus Nabelschnurblut isoliert werden (Belvedere et al., 1999). Zur Anreicherung und Identifizierung späterer Entwicklungsstadien fetaler erythroider Zellen werden die unter 1.2.2 beschriebenen erythroiden Oberflächenmarker und intrazellulär exprimierte Hämoglobine genutzt. Diese Antigene werden allerdings auch auf anderen fetalen und adulten Blutzellen wie Monozyten oder Erythrozyten gebildet. Statt dessen werden zur Isolierung und Beschreibung erythroider Vorläuferzellen auch morphologische Charakteristika verwendet (Fornas et al., 2002).

Seitdem Bianchi et al. (1990) erstmals CD71 zur Isolierung fetaler erythroider Zellen aus maternalem, peripherem Blut nutzten, ist der Transferrin-Rezeptor bis heute einer der am häufigsten verwendeten Selektionsmarker (Rodriguez De Alba et al., 2001; Al-Mufti et al., 2001; Cheung et al., 1996; Bianchi et al., 1990). Es werden mittlerweile zahlreiche Methoden, wie z.B. Zellsortierung über magnetische Partikel oder Durchflusszytometrie (Gänshirt et al., 1998; Lewis et al., 1996), Dichtegradientenzentrifugation (Jackson, 2003), selektive Zelllyse (Collarini et al., 2001) oder Depletion unerwünschter Zellpopulationen genutzt, um die seltenen, fetalen Zellen (ca. 1 – 8 fetale Erythroblasten in 2 mL maternalem Blut) anzureichern (Gänshirt et al., 1998). Eine der neueren Methoden ist die Identifizierung und Analyse einzelner Zellen mittels eines Laser-Scanning-Zytometers, bei dem Durchflusszytometrie und mikroskopische Analysen verbunden werden können

(Hennerbichler et al., 2002). Neben fetalen Erythroblasten werden vereinzelt auch Trophoblasten (Oudejans et al., 2003; Vona et al., 2002) oder im Blut der Mutter vorhandene, freie fetale DNA (Lo et al., 1998) zur Diagnostik verwendet.

Problematisch war bislang der Nachweis der fetalen Herkunft isolierter Zellen, denn keiner der aufgeführten Marker wird spezifisch auf fetalen erythroiden Zellen exprimiert (Huie et al., 2001). Eine Identifizierung fetaler männlicher Zellen bzw. von freier männlicher DNA im Blutplasma der Mutter erfolgt zurzeit z.B. über Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) von Y-Chromosom-spezifischen Sequenzen (Lo et al., 1998). Außerdem kann der fetale Ursprung isolierter männlicher Zellen anhand von X- und Y-Chromosomen durch Fluoreszenz In-situ Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden. Weitere Ansätze stellen eine Identifizierung fetaler Zellen mittels ϵ - und γ -Globin oder anhand des Vergleichs von DNA-Polymorphismen von Mutter und Kind über *short tandem repeats* (STR-Marker) dar (Lewis et al., 1996). Problematisch ist, dass der Nachweis des Y-Chromosoms die Untersuchung von Schwangerschaften mit einem weiblichen Fetus ausschließt. Eine Identifizierung fetaler Zellen über fetales Hämoglobin ist keine sichere Methode, da dieses bei bestimmten hämatologischen Erkrankungen und während der Schwangerschaft auch im adulten Organismus verstärkt gebildet wird. Darüber hinaus ist auch beim Einsatz von STR-Markern nicht in jedem Fall der Nachweis eines DNA-Polymorphismus zwischen Mutter und Kind gewährleistet (Chen et al., 2004).

Im Gegensatz sind Untersuchungen bekannt, bei denen zur einwandfreien Identifizierung fetaler erythroider Zellen ausschließlich eine morphologische Charakterisierung angestrebt wird (Cha et al., 2004). Eine Kombination aus morphologischer Beschreibung und Immunphänotypisierung scheint allerdings zur Isolierung, Charakterisierung und Identifizierung fetaler erythroider Zellen am besten geeignet zu sein (Chen et al., 2004).

1.4 Zielsetzung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war, dass zurzeit keine Oberflächenantigene bekannt sind, die spezifisch auf fetalen Erythroblasten exprimiert werden (Ho et al., 2003). Eine Charakterisierung von Vorläuferzellen des fetalen, des neugeborenen und des adulten Organismus sowie das Auffinden von Unterschieden bei der Antigenexpression auf fetalen und adulten Zellen sind für eine nähere Untersuchung der fetalen Erythropoese wichtig. Mittlerweile sind erythroide Zellen morphologisch ausreichend charakterisiert, so dass einzelne Entwicklungsstadien der Erythropoese nach entsprechender zytochemischer Färbung differenzierbar sind. Auch die Expression einer Anzahl von intrazellulären Markern und Oberflächeantigenen ist beschrieben und wird zur Isolierung und Charakterisierung fetaler erythroider Zellen genutzt. Dennoch sind die bislang beschriebenen morphologischen und antigenen Charakteristika nicht allein fetalen erythroiden Zellen vorbehalten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung

neuer Antikörper, die spezifisch fetale erythroide Zellen binden. Mit Hilfe diese Antikörper sollte eine Charakterisierung fetaler erythroider Zellen und eine Unterscheidung zwischen fetaler und adulter Antigenexpression im Verlauf der Erythropoese ermöglicht werden.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Diaphragm Vacuum Pump	KNF Laboport
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop IX50	Olympus
Kryostat Microm HM560	Mikron Instruments Inc.
Phasenkontrast-Mikroskop CK30	Olympus
Pipetten: Pipetman P-2, P-10, P-20, P-100, -1000	Gilson
Universalmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss
Zellkulturbank	Kojair Tech Oy
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge TJ-25 (mit Rotor TS-5.1-500)	Beckman-Coulter
Zyto-Zentrifuge (mit CFTR-2 Rotor)	StatSpin

2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (21 x 26 mm)	Marienfeld
EDTA-Monovetten	Sarstedt
Rotalibo-Aluminiumdosen	Roth
Kulturflaschen (25 cm ²)	Nalge Nunc International
Nunc Cryo Tube Vials (1,8 mL)	Nalge Nunc International
Objektträger Super Frost Plus	Menzel-Gläser
Flexi Strip (Spatel für Blutaustriebe)	BiWex N.V.
Transferpipetten (3,5 mL)	Sarstedt

2.3 Chemikalien und Lösungen

7-Actino-aminomycin D (7-AAD)	BD Pharmingen
Bovine serum albumin (BSA ; Fraktion V)	Sigma
Cellfix	BD Pharmingen
4'-6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)	Molecular Probes
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
DNase I	Roche
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec
Fetal calf serum (FCS)	Gibco
Ficoll-Paque TM Plus (1,077 g / mL)	Amersham Biosciences
Kaisers Glyceringelatine	Merck
LDS 751	Molecular Probes
Penicillin G / Streptomycin (5U / mL)	Invitrogen

Propidiumjodid (PI)	BD Pharmingen
Stabilisatorlösung (Konzentrat)	Meridian
Substrat-Chromogen AEC+	Dako Cytomation
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Sigma
Tween 20	Merck
Hemacolor®Färbelösung	Merck
IsoStrip (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit)	Roche Diagnostics
Universal APAAP (Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase) Kit	Dako Cytomation
UltraVision™Detection System HRP	LabVision Corporation

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Antigen	Markierung	Klon	Subtyp	Hersteller
CD71	-	DF1513	IgG1	DPC Biermann
CD36	-	CB38 (NL07)	IgM, k	BD Pharmingen
CD235a	-	GA-R2 (HIR2)	IgG2b, k	BD Pharmingen
CD45	-	HI30	IgG1, k	BD Pharmingen
CD34	FITC*	581	IgG1	Cymbus Biotechnology
CD34	R-PE*	581	IgG1	Cymbus Biotechnology
CD36	FITC	CB38 (NL07)	IgM	BD Pharmingen
CD45	APC*	HI30	IgG1, k	BD Pharmingen
CD71	FITC	SOM4D10	IgG2b	Diatec.com
CD71	R-PE	SOM4D10	IgG2b	Diatec.com
CD235a	FITC	GA-R2 (HIR2)	IgG2b	BD Pharmingen
SBA	Biotin	-	-	Vector Castra Laboratories

*Fluoreszenzfarbstoffe:

FITC: Fluoresceinthiocyanat

R-PE: Phycoerythrin

APC: Allophycocyanin

2.4.2 Sekundärantikörper und Tertiärreagenzien

Spezifität	Markierung	Ursprung	Hersteller
Maus IgG (H+L)	FITC	Ziege	Caltag Laboratories
Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	Ziege	Molecular Probes
Maus IgM (μ -Kette)	Alexa Fluor 594	Ziege	Molecular Probes
Streptavidin	DTAF*	-	Jackson ImmunoResearch

*DTAF: Dichlorotriazinylaminofluorescein

2.4.3 Isotypkontrollen

Subtyp	Markierung	Klon	Hersteller
Maus IgG1	-	MOPC-21	BD Pharmingen
Maus IgG2a	-	G155-178	BD Pharmingen
Maus IgG2b	-	C48-4	BD Pharmingen
Maus IgM	-	G155-228	BD Pharmingen
Maus IgG1	FITC	DD7	Cymbus Biotechnology
Maus IgG1	PE	DD7	Cymbus Biotechnology
Maus IgG1	APC	k.A.	Caltag Laboratories
Maus IgG2b	FITC	MPC-11	BD Pharmingen
Maus IgG2b	PE	DD311	Cymbus Biotechnology
Maus IgM	FITC	k.A.	Cymbus Biotechnology

k.A. = keine Angabe

2.5 Puffer und Medien

Phosphat-gepufferte Saline (PBS-Puffer, pH 7,2 – 7,4)	NaH ₂ PO ₄ (anhydriert)	1,9 mM
	Na ₂ HPO ₄ (anhydriert)	8,1 mM
	NaCl (Einstellen mit 1 M NaOH oder 1 M HCl)	154 mM
	H ₂ O	ad 1L
Tris-gepufferte Saline (TBS-Puffer, pH 7,5)	Tris-HCl	100 mM
	NaCl	154 mM
	0,05 % Tween	
	H ₂ O	ad 1L
Kulturmedium K-562 / KMOE-2	10 % FCS	20 mL
	2 % Penicillin G / Streptomycin	2 mL
	2 % Glutamat	2mL
	RPMI 1640 Medium	ad 200 mL
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (mit L-Glutamin, 25 mM HEPES Puffer)		Gibco
RPMI 1640 Medium (RPMI) (mit L-Glutamin, ohne Phenol Red)		Invitrogen

2.6 Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Gewebe untersucht:

Nabelschnurblut wurde von der Geburtsstation der Paracelsus-Klinik, Langenhagen, bereitgestellt; fetale Gewebe unterschiedlicher Schwangerschaftswochen stammten aus dem Universitätsklinikum Kiel; Blutproben gesunder adulter Spender stammten von der AdnaGen AG; Knochenmarkproben adulter gesunder Spender wurden von der Universität Heidelberg; dem Universitätsklinikum Kiel und der Medizinischen Hochschule Hannover bereitgestellt.

2.7 Zelllinien

K-562	DSMZ-Nr. ACC10 <i>Human chronic myeloid leukemia in blast crisis</i>
KMOE-2	DSMZ-Nr. ACC37 <i>Human acute erythremia</i>

3 METHODEN

3.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus Vollblut

Zur Isolierung mononukleärer Zellen (mononuclear cells, MNC) aus Nabelschnurblut, Knochenmark und adultem peripherem Blut wird eine Dichtegradientenzentrifugation benutzt. Mit Hilfe dieses Gradienten lassen sich Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten von Monozyten, Lymphozyten und erythroiden Vorläuferzellen trennen.

In 13 mL Rundbodenzentrifugenröhrchen (Fa. Falcon) werden 4 mL Ficoll-Paque (1,077 g / mL; Fa. Amersham Biosciences) vorgelegt. Je 2 mL Vollblut werden mit gleichem Volumen PBS verdünnt und durch behutsames Schwenken gründlich durchmischt. Ficoll-Paque wird mit 4 mL verdünntem Blut überschichtet und bei 400 x g für 25 min bei 20 °C zentrifugiert (Zentrifuge TJ-25 mit Rotor TS-5.1-500; Fa. Beckman-Coulter). Die Plasmaphase wird weitgehend über der Schicht der mononukleären Zellen abgesaugt (Diaphragm Vacuum Pumpe; Fa. KNF Laboport). Die mononukleären Zellen werden an der Interphase zwischen Ficoll-Paque und dem Blutplasma großzügig mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein 50 mL-Spitzbodenzentrifugenröhrchen (Fa. Falcon) überführt. Die Zellen werden mit 50 mL PBS / 0,05 % *bovine serum albumin* (BSA) gewaschen und bei 400 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen mit 1 mL PBS / 0,05 % BSA resuspendiert. Der beschriebene Waschschrift wird 2 x wiederholt. Nach dem dritten Waschen werden die Zellen mit 1 mL kaltem PBS / 0,05 % BSA resuspendiert, die Zellzahl bestimmt (s. 3.2) und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

Sofern die Zellen nicht direkt nach der Dichtegradientenzentrifugation verwendet werden, erfolgt eine Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff (s. 3.3). In diesem Fall werden die Zellen nach dem dritten Waschen in 1 mL *fetal calf serum* (FCS; Fa. Gibco) resuspendiert.

3.2 Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld). Die Vitalität mononukleärer Zellen wird mit dem Farbstoff Trypanblau überprüft, der für die Membran von toten Zellen durchlässig ist, von lebenden Zellen aber nicht aufgenommen wird. Nach der Isolierung mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut durch Dichtegradientenzentrifugation befinden sich zusätzlich auch kernlose Zellen wie Erythrozyten und Retikulozyten in der Zellsuspension, deren Anteil mittels 3 % Essigsäure bestimmt wird. Bei einer Endkonzentration von ca. 10^7 Zellen / mL werden Zellen in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß entweder mit Trypanblau oder 3 % Essigsäure 1:25 verdünnt und sorgfältig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei Raumtemperatur wird

mikroskopisch die Zellzahl aus 4 Großquadraten bestimmt, der Mittelwert gebildet und die Zellkonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl pro Großquadrat (Mittelwert)} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl / mL}$$

3.3 Kryokonservierung

Durch Dichtegradientenzentrifugation aus Nabelschnurblut, Knochenmark und adultem Vollblut isolierte mononukleäre Zellen werden in flüssigem Stickstoff gelagert. Es werden maximal 10^7 Zellen / mL Zellsuspension eingefroren.

Nach der Isolierung mit Ficoll-Paque werden die mononukleären Zellen in 1 mL FCS resuspendiert und auf Eis gehalten. Das verwendete Einfriermedium setzt sich aus 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) und 40 % FCS zusammen. Von dem auf 4 °C gekühlten Einfriermedium werden 500 µL in ein ebenfalls gekühltes 1,8 mL Kryoröhrchen (Fa. Nalge Nunc International) vorgelegt. Anschließend wird 1 mL Zellsuspension dazu gegeben und durch einmaliges Pipettieren mit dem Medium vermischt. Das Kryoröhrchen wird umgehend in eine auf 4 °C gekühlte Einfrierbox überführt und für 24 h bei -80 °C gehalten. Anschließend werden die Zellen zur Langzeitlagerung in einen Stickstoffbehälter überführt.

3.4 Auftauen mononukleärer Zellen

Zum Auftauen von Zellen werden zunächst Medium A (Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit 10 % FCS und 20 U / mL DNase I) und Medium B (Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit 10 % FCS) in einem 37 °C Wasserbad (Fa. GFL) erwärmt. Die Zugabe von DNase verhindert beim Auftauen ein Verklumpen von Zellen durch freie Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgt schnell im 37 °C warmen Wasserbad, wonach die Zellen umgehend in ein konisches 50 mL-Röhrchen überführt werden. Im Einfriergefäß verbliebene Zellen werden mit 1 mL Medium A gewaschen und ebenfalls in das 50 mL-Röhrchen überführt. Anschließend wird innerhalb von 3 min tropfenweise Medium A zu der Zellsuspension gegeben, bis das Endvolumen 5 mL beträgt. Das Röhrchen wird nach jeder Zugabe von Medium vorsichtig geschwenkt. Weiterhin wird innerhalb von 5 – 10 min Medium A tropfenweise bis zur Füllung des 50 mL-Röhrchens zugeben. Die langsame Zugabe des warmen Mediums gewährleistet eine schonende Behandlung der Zellen, sowie eine Verdünnung des für die Zellen toxischen DMSO. Die Zellsuspension wird im Anschluss bei 200 x g für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und in einem neuen 50 mL-Röhrchen zurückbehalten. Dieser Überstand wird bis zum Ende der Prozedur auf Eis gehalten, um durch eine wiederholte Zentrifugation möglicherweise verlorene Zellen zurück zu gewinnen. Über dem Zellpellet werden ca. 5 mL Überstand belassen, damit dieses nicht zerstört wird. Die im verbleibenden Medium befindlichen

Zellen werden vorsichtig resuspendiert und in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Das 50 mL-Röhrchen wird mit 5 mL Medium B (ohne DNase) gewaschen. Das Waschmedium sowie die restlichen 10 mL des Mediums B werden unter vorsichtigem Schwenken tropfenweise bis zur Füllung des 15 mL-Röhrchens zu der Zellsuspension gegeben. Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation der Zellsuspension bei 200 x g für 15 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wird mit einer Vakuumpumpe vorsichtig bis auf 2 mL abgenommen. Die Zellen werden im verbleibenden Medium vorsichtig resuspendiert und es erfolgt die Bestimmung der Zellzahl (s. 3.2).

Sofern die Zellzahl niedriger ist als erwartet, wird das nach der ersten Zentrifugation gesicherte Medium A bei 400 x g für 10 min bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 2 mL abgenommen und die Zellen vorsichtig in dem verbliebenen Medium resuspendiert. Es erfolgt eine Zellzahlbestimmung und gegebenenfalls ein Zusammenführen der Zellsuspensionen.

3.5 Kultivierung humaner Zellen

Anhand der leukämischen Zelllinie K-562 und der erythroiden Zelllinie KMOE-2 wird die Bindung neuer Antikörper und die Bindung der zum Vergleich dienenden, bekannten Antikörper (u.a. Glykophorin A, CD71, CD36, CD34) untersucht. Diese Zelllinien weisen frühe Entwicklungsstadien erythroider Zellen auf und wurden schon häufig für Untersuchungen von embryonalem, fetalem und adultem Hämoglobin verwendet (Fuhr et al., 1981).

Die Zelllinie K-562 stammt von einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) (Lozzio und Lozzio, 1975) und kann zur Synthese von embryonalen und fetalen Hämoglobinen induziert werden (Nakamura et al., 1985). Diese Zellen exprimieren laut Datenblatt der DSMZ u.a. die Marker CD45, CD71 und Glykophorin A (Andersson et al., 1979). Bei KMOE-2 handelt es sich um eine erythroide Zelllinie von einer Patientin mit akuter Erythrämie. Diese Zelllinie exprimiert zwar kein Glykophorin A oder CD71, kann aber mittels Hemin zur Bildung von adultem Hämoglobin induziert werden (Okano et al., 1981).

K-562 und KMOE-2 werden in RPMI 1640 (mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamat) kultiviert. Beide Zelllinien werden in 25 cm²-Kulturflaschen in einem CO₂-Inkubator (Sanyo) bei 37 °C mit 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Eine Subkultivierung der in Suspension wachsenden Zellen (Verdopplungszeit: 30 – 40 h) erfolgt alle 2 – 3 Tage. Nach einer Zellzahlbestimmung (s. 3.2) werden 0,3 – 0,5 x 10⁶ Zellen / mL in eine neue 75 cm²-Kulturflasche überführt und mit vorgewärmtem Kulturmedium auf 20 mL aufgefüllt.

3.6 Zellpräparationen

3.6.1 Herstellung von Blutausstrichen

Vollblut wird in EDTA-Monovetten (Fa. Sarstedt) abgenommen und durch Schwenken oder leichtes Vortexen gut durchmischt. Mit einer Pipette werden 2,5 µL Blut entnommen und als Tropfen im vorderen Drittel eines gereinigten Objektträgers aufgebracht. Ein Spatel (Flexi Strip, Fa. BiWex N.V.) wird in einem Winkel von 45° hinter dem Bluttropfen platziert und mit dessen Hilfe das Blut gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt. Die Ausstriche werden über Nacht an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Bearbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

3.6.2 Herstellung von Zytospinpräparaten

Je Zytospinpräparat werden maximal 5×10^4 mononukleäre Zellen (3.1, 3.4) in 100 µL PBS / 10 % BSA verdünnt und mittels einer Zyto-Zentrifuge (Fa. Statspin) auf beschriftete SuperFrostPlus-Objektträger (Fa. Menzel-Gläser) gebracht. Die Zentrifugation erfolgt bei 850 rpm für 4 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss werden die Präparate für mindestens 4 h, besser über Nacht, an einem trockenen Ort bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung werden die Präparate für Immunfluoreszenzfärbungen und immuncytochemische Färbungen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.6.3 Herstellung von Gefrierschnitten

Entnommene Gewebestücke werden in Rotallbo-Aluminiumdosen (Fa. Sarstedt) in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert. Zur Herstellung von Gefrierschnitten werden die Präparate in den Aluminiumbehältern ohne aufzutauen in den vorgekühlten Kryostaten überführt. Bei dem Kryostaten handelt es sich um ein Rotationsmikrotom (Microm HM560, Fa. Mikron Instruments Inc.). Das Gewebe wird zunächst auf einem separaten, schnell kühlenden Block in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Fa. Sakura Finetek Europe) eingebettet und anschließend auf einer im Kryostaten befindlichen, gekühlten Objekthalterung aufgebracht. Die optimalen Temperaturen für Gefrierkammer und Mikrotom richten sich nach dem zu untersuchenden Gewebe. Die Kammertemperatur betrug in diesem Fall $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$, die Block- bzw. Messertemperatur lag bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Schnittdicke der Präparate betrug 4 – 7 µm.

3.6.4 Stabilisierung von Erythrozyten

Die entwickelten monoklonalen Antikörper werden mit Hilfe von AB+ Erythrozyten hinsichtlich ihrer Bindung an Haupt-Blutgruppenantigene untersucht. Für die Stabilisierung von Erythrozyten wird 1 mL adultes Vollblut (AB+) in ein 15 mL-Röhrchen (Fa. Falcon)

überführt und mit 14 mL PBS gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 500 x g für 5 min bei 4 °C wird der Überstand abgezogen. Die Zellen werden mit 1 mL PBS resuspendiert und der Waschvorgang 2 x wiederholt. Die gewaschenen Zellen werden 1:1 mit unverdünnter Stabilisatorlösung (Fa. Meridian) versetzt und durch Invertieren des Röhrchens resuspendiert. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 1500 x g für 10 min bei 4 °C: Ist der Überstand im Anschluss daran hämolytisch, muss der oben beschriebene Stabilisierungsvorgang wiederholt werden. Sofern der Überstand klar ist, erfolgt die Bestimmung der Zellzahl (s. 3.2). Auf diese Weise stabilisierte Erythrozyten können für 7 – 10 Tage bei 4 °C gelagert werden.

3.7 Entwicklung monoklonaler Antikörper

3.7.1 Bereitstellung des Antigens und Immunisierung

Es wurden aus Nabelschnurblut Zellen bzw. deren Zellmembranen zur Immunisierung eingesetzt. Die Isolierung des Immunogens erfolgte bei der Fa. Genelab in Gelsenkirchen. Die Zellen wurden nach spezifischen Kriterien mit einem Durchflusszytometer isoliert, d.h. die Zellen exprimierten die Oberflächenmarker CD71 und Antigen i, waren aber CD3-/CD14-/CD19- und CD45-negativ. Die isolierten Nabelschnurblutzellen wurden gesammelt und nach Zellaufschluss die Membranen durch Zentrifugation von den Zellkernen abgetrennt. Es wurden fünf Mäuse immunisiert, wobei pro Immunisierungsansatz 10^6 Erythroblasten eingesetzt wurden. Die Immunisierung von fünf Mäusen wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt (Harlow und Lane, 1988). Nach der Immunisierung wurden die Milzzellen der Mäuse mit der Zelllinie NSO *mouse myeloma* fusioniert (Kohler und Milstein, 1975). Die fünf Fusionen wurden jeweils in 2 – 3 Portionen aufgeteilt und bis zur weiteren Untersuchung in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.7.2 Selektion von B-Zell-Hybridomen und Klonierung

Die Klonierung der B-Zell-Hybridome wurde bei der Fa. Labsoft AG in Halle / Saale, durchgeführt. Aus den Fusionsansätzen (s. 3.7.1) wurden die B-Zell-Hybridome selektioniert, die Antikörper gegen fetale erythroide Zellen produzierten. Für die Zellkultivierung wurden nacheinander einzelne Portionen der Fusionen aufgetaut und auf Mikrotiterplatten mit Nutridoma-CS (Medienzusatz) verteilt. Nach 10 – 14 Tagen der Kultivierung wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und zur Untersuchung zur AdnaGen AG, Langenhagen, verschickt. Die Selektion von Antikörper produzierenden Hybridoma-Klonen erfolgte mit einer dafür entwickelten durchflusszytometrischen Methode, die simultan die Beurteilung mehrerer Parameter erlaubt (s. 3.8.1).

Um monoklonale Antikörper herzustellen, wurden die selektionierten Hybridomaklone in zwei aufeinander folgenden Verdünnungsreihen von je 12 Stufen in Mikrotiterplatten

vereinzelte. Im Anschluss an die Überprüfung der Antikörperklone wurde für die zweite Klonierung der Hybridomaklon aus der letzten antikörper-positiven Verdünnungsstufe der 1. Klonierung genommen. Die B-Zell-Hybridome aus dieser Stufe wurden in der 2. Klonierung wieder in 12 Verdünnungsstufen vereinzelte und für etwa 10 Tage kultiviert. Die letzte laut durchflusszytometrischer Untersuchung antikörper-positiv Verdünnungsstufe, d.h. die Stufe mit der höchsten eingesetzten Zellverdünnung, enthält B-Zell-Hybridome, die monoklonale Antikörper produzieren. Die Überprüfung der Zellkulturüberstände der einzelnen Verdünnungen erfolgte durchflusszytometrisch mit einem FACSCalibur.

3.7.3 Reinigung und Markierung von Antikörpern

Die Reinigung und Markierung neuer Antikörperklone wurde ebenfalls bei der Fa. Labsoft AG, Halle/Saale, durchgeführt. Die antikörperhaltigen Zellkulturüberstände wurden über Protein G-Säulen gereinigt und anschließend mit Biotin markiert.

3.7.4 Isotypbestimmung

Die Bestimmung des Isotyps der monoklonalen Maus-Antikörper erfolgt mittels eines Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Fa. Roche Diagnostics). Die zu untersuchenden Zellkulturüberstände werden gemäß Herstellerangaben 1:50 mit PBS verdünnt. Von der verdünnten Antikörperlösung werden 150 µL in die dem Kit beigefügten Röhrchen gegeben und für 30 sec bei RT inkubiert. Die Röhrchen enthalten eine Substanz in Form einer Kugel, die sich in der Antikörpersuspension auflöst. Anschließend werden die Isotypstreifen in das Röhrchen gestellt. Nach 5 – 10 min können die Resultate abgelesen werden.

3.8 Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie

Durch die Kombination bekannter Oberflächenmarker auf Erythroblasten können sowohl erythroide Zellen als auch neue Antikörper mittels durchflusszytometrischer Mehrparameteranalyse charakterisiert werden. Zunächst wird eine Kombinationsfärbung bestehend aus drei Markern etabliert, durch die eine Differenzierung kernhaltiger erythroider Zellen von Leukozyten möglich ist. Aufbauend auf diesem System werden unterschiedliche durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Für durchflusszytometrische Untersuchungen werden sowohl kryokonservierte MNCs (s. 3.3) als auch frisch isolierte MNCs (s. 3.1) verwendet. In beiden Fällen werden direkt vor der Immunfluoreszenzfärbung Zellzahl und Vitalität ermittelt (s. 3.2). Bei jeder Färbung werden die Antikörper, die miteinander kombiniert eingesetzt werden, auch einzeln gefärbt. Dies ist zur Kompensation der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bei der FACS-Analyse notwendig. Für jeden Primär- und Sekundärantikörper sowie für Tertiärreagenzien und DNA-Farbstoffe wird zunächst die optimale Antikörperkonzentration für die Fluoreszenzfärbung durch Verdünnungsreihen ermittelt. Weiterhin wird für jeden verwendeten Antikörper eine entsprechende Negativkontrolle (Isotyp-Antikörper) mitgeführt.

3.8.1 Direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Zur durchflusszytometrischen Charakterisierung spezifischer Zellsubpopulationen werden die Streulichteigenschaften von Zellen genutzt. Weiterhin werden zur Identifizierung erythroider Zellen Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD71 und CD45 sowie der Kernfarbstoff LDS 751 als Basiskomponenten eingesetzt. Ein zusätzlicher fluoreszenzmarkierter Antikörper kann als variabler vierter Bestandteil des Systems eingesetzt werden. Auf diese Weise ist eine simultane Untersuchung distinkter Zellpopulationen mit Hilfe von sechs Parametern möglich: Charakterisierung der Streulichteigenschaften anhand von FSC (*forward scattered light*) und SSC (*side scattered light*) sowie die Detektion erythroider Zellen, Leukozyten und kernhaltiger Zellen durch die Analyse von vier verschiedenen fluoreszenzmarkierten Markern. Um unspezifische Bindungen der eingesetzten Antikörper an auf der Zelloberfläche lokalisierten Fc-Rezeptoren zu vermeiden, wird die Zellsuspension mit 1:10 verdünntem FcR Blocking Reagent (Fa. Miltenyi Biotec) versetzt. Je Ansatz werden 2×10^5 Zellen in 50 μ L PBS / 0,05 % BSA in einem 5 mL-Röhrchen (Falcon) vorgelegt. Nach Zugabe der entsprechend verdünnten Primärantikörper wird die Zellsuspension durch leichtes Vortexen sorgfältig gemischt und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen mit 3 mL PBS / 0,05 % BSA gewaschen und für 5 min bei $400 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Vakuumpumpe (Fa. KNF Laboport) bis auf

ca. 50 μL abgezogen und die Zellen im verbleibenden Puffer resuspendiert. Die Ansätze mit unmarkierten Primärantikörpern werden im zweiten Färbeschritt mit dem Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC versetzt. Der Ansatz mit Biotinmarkiertem SBA wird an dieser Stelle mit dem Tertiärreagenz SA-DTAF sowie mit den Antikörpern der Markerkombination, anti-CD45, anti-CD71 und LDS 751, versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT im Dunkeln werden die Zellen mit PBS / 0,05 % BSA gewaschen und anschließend resuspendiert. Im dritten Färbeschritt werden die Ansätze mit den unmarkierten Primärantikörpern mit den Antikörpern der Markerkombination versetzt, für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert und im Anschluss mit Puffer gewaschen. Bei sämtlichen Ansätzen werden die Zellen nach Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung in 300 μL 1 x Cellfix (Fa. BD Phamingen) resuspendiert. Gefärbte Zellen werden bis zur Analyse bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Analyse erfolgt mit einem FACSCalibur (s. 3.8.5), die Erhebung und Auswertung der Daten mit dem Programm CellQuestPro.

3.8.2 *Screening* von Hybridomaklonen

Zur Selektion von Antikörpern, die Oberflächenantigene auf fetalen erythroiden Zellen binden, wurde eine durchflusszytometrische Untersuchungsmethode entwickelt. Dieses System erlaubte die reproduzierbare Untersuchung umfangreicher Anzahlen von Antikörper produzierenden Überständen, die aus der Kultivierung von B-Zell-Hybridomen stammen. Mit Antikörpern gegen die Antigene CD71, CD45 sowie mit dem Kernfarbstoff LDS 751 wurden sowohl kernhaltige und kernlose erythroide Zellen detektiert als auch Leukozyten ausgeschlossen. Anhand der identifizierten erythroiden Zellen konnte die Bindung neuer unbekannter Antikörper ermittelt werden. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden an MNCs aus Nabelschnurblut durchgeführt. Um Ziel-Antikörper aus Zellkulturüberständen eindeutig detektieren zu können, wurden vorrangig Blutproben mit einem hohen Anteil erythroider Vorläuferzellen verwendet (s. 3.2) und, bei Bedarf hoher Zellzahlen, miteinander gemischt.

Es wurden je Ansatz 2×10^5 Zellen in 15 μL PBS / 0,05 % BSA in einem 5 mL-Röhrchen vorgelegt und mit FcR Blocking Reagent (1:10) versetzt. Die Zellsuspension wurde mit je 35 μL antikörperhaltigem Zellkulturüberstand versetzt, sorgfältig gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 mL PBS / 0,05 % BSA gewaschen und für 5 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe bis auf ca. 50 μL abgezogen und die Zellen im verbleibenden Puffer resuspendiert. Im zweiten Färbeschritt wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im dritten Schritt wurden die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Marker CD71, CD45 und mit dem Kernfarbstoff LDS 751 inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift

wurden die Zellen in 300 μL Cellfix resuspendiert und bis zur Analyse am Durchflusszytometer bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.8.3 Überprüfung einer Bindung an Haupt-Blutgruppenantigene

Die Bindung der Antikörperklone, die im einleitenden *Screening* erythroide Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut erkannten, an adulte Blutzellen ist unerwünscht. Ebenso sollen die neuen Antikörperklone keine Blutgruppenantigene, die auf adulten Erythrozyten lokalisiert sind, binden. Zur Überprüfung einer möglichen Bindung werden die antikörperhaltigen Zellkulturüberstände mit AB+ Erythrozyten inkubiert und anschließend an MNCs aus Nabelschnurblut untersucht. Als Positivkontrolle werden ein monoklonaler Antikörper gegen Glykophorin A, als Negativkontrolle ein monoklonaler Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor, CD71, mitgeführt.

Aus stabilisierten Erythrozyten (s. 3.6.4) werden mit PBS Verdünnungsreihen in Mikrotiterplatten (Fa. Eppendorf), die eigentlich für PCR (Polymerase Kettenreaktion) verwendet werden, hergestellt. Es werden neun verschiedene Konzentrationen an Erythrozyten eingesetzt: Aus 5×10^5 Erythrozyten / 100 μL PBS wird in jeweils 2-facher Verdünnung die Anzahl auf 1000 Erythrozyten / 100 μL PBS eingestellt. Anschließend wird bei 1500 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Überschüssiger Puffer wird abgezogen. Die Erythrozyten werden daraufhin mit 40 μL unverdünntem Zellkulturüberstand der zu untersuchenden Antikörper sowie mit den entsprechend verdünnten Kontrollantikörpern anti-CD71 und anti-Glykophorin A resuspendiert. Die Inkubation erfolgt für 1h unter leichtem Schütteln (Titramax 100; Fa. Heidolph) bei RT. Anschließend werden die Ansätze bei 1500 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Die Zellkulturüberstände und die Kontrollantikörper werden vorsichtig mit einer Pipette über dem lockeren Erythrozytenpellet abgezogen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Daraufhin wird mit den Antikörpern eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung an MNCs aus Nabelschnurblut durchgeführt (s. 3.8.1, ohne den dritten Färbeschritt), um zu untersuchen, welche der mit Erythrozyten inkubierten Antikörperklone sich noch in Lösung befinden und somit noch an Nabelschnurblutzellen binden können.

3.8.4 Konkurrenz von Antikörperklonen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird überprüft, ob die entwickelten Antikörper das gleiche Antigen erkennen. Dafür werden die zu testenden Antikörperklone im Verlauf einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung zusammen inkubiert, um eine gegenseitige Inhibition bei der Bindung an das entsprechende Antigen zu ermöglichen. Ein biotinylierter Antikörper wird so stark verdünnt eingesetzt, dass in einer Einzelfärbung eine Bindung an die Zielzellen gerade noch detektierbar ist. Der Vergleich der Antikörperbindung mit und ohne einen inhibierenden zweiten Antikörper ermöglicht letztlich eine Aussage. Als

Positivkontrolle wird ein Antikörper eingesetzt, bei dem eine Hemmung sichtbar ist. Das ist der Fall, wenn der identische, allerdings unmarkierte, Antikörperklon verwendet wird. Als Negativkontrolle wird anti-CD71, der ein anderes Antigen erkennt und somit seine Bindungsintensität beibehalten sollte, eingesetzt.

Die Untersuchungen werden an MNCs aus Nabelschnurblut durchgeführt. Es werden je Ansatz in einem 5 mL-Röhrchen 2×10^5 Zellen, die mit 1:10 FcR Blocking Reagent versetzt sind, in 50 μ L PBS / 0,05 % BSA vorgelegt. Im ersten Färbeschritt werden die zu testenden Antikörper, sowie anti-CD71 und anti-GPA für 10 min bei 4 °C mit MNCs inkubiert. Ohne die Zellen mit Puffer zu waschen, wird biotinylierter Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (220 μ g, 44 μ g, 22 μ g und 11 μ g) dazu gegeben. Es erfolgt eine gemeinsame Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 20 min bei 4 °C. Die Zellen werden anschließend mit 3 mL PBS / 0,05 % BSA gewaschen und bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen resuspendiert und für 10 min bei RT mit Streptavidin-DTAF inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen gewaschen und mit 300 μ L Cellfix versetzt. Bis zur Analyse am Durchflusszytometer werden die Proben bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt

3.8.5 Analyse gefärbter Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Analyse und Separation von einzelnen Zellen bzw. Partikeln, die sich in wässriger Suspension befinden. Es handelt sich um eine Kombination aus Flüssigkeitssystem, Optik und Detektionselektronik. Die Detektion von Streulicht erlaubt Aussagen über die Größe und Granularität von Zellen. Zusätzlich wird durch das Laserlicht eine spezifische Anregung verschiedener Fluorochrome und somit die gleichzeitige Analyse mehrerer Zellstrukturen ermöglicht. Dabei können sowohl Oberflächenantigene als auch intrazelluläre Strukturen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes erfolgt über Sperrfilter, welche das emittierte Licht zu definierten Detektoren leiten und eine qualitative Aussage über die untersuchte Eigenschaft der Zelle erlauben. Zur Analyse wurde ein FACSCalibur mit einem blauen Laser (488 nm) und einem roten Dioden-Laser (635 nm) verwendet. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Detektions-Bandpassfilter von 530/30 nm werden die Farbstoffe FITC, DTAF und Alexa 488 detektiert. Das Fluorochrom PE und der DNA-Farbstoff PI werden vom blauen Laser angeregt und mit einem Detektions-Langpassfilter von 585/42 nm gemessen. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Detektions-Langpassfilter von 670 nm werden der DNA-Farbstoff LDS 751 sowie das Fluorochrom Cy5 detektiert. Für die Detektion des Farbstoffs APC wird eine Anregungswellenlänge des roten Dioden-Lasers und ein Detektions-Bandpassfilter von 661/16 nm verwendet.

3.9 Färbungen für die Mikroskopie

Zum Nachweis der Spezifität der entwickelten Antikörper für fetale erythroide Zellen werden Zytospinpräparate mit mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut, Blutausstriche mit fetalem Blut und adultem Knochenmark sowie Gefrierpräparate mit Schnitten von fetaler und adulter Leber untersucht. Färbung und Analyse eines Teils der Präparate erfolgte durch Prof. R. Parwaresch am Institut für Hämatopathologie der Universität Kiel.

Für die Immunfluoreszenzanalysen werden ein Antikörper gegen Glykophorin A und der zu untersuchende Antikörperklon in Kombination mit dem DNA-Farbstoff (DAPI) eingesetzt. Glykophorin A bindet spezifisch Oberflächenantigene auf allen Zellen der erythroiden Reihe, d.h. sowohl frühe als auch späte erythroide Zellen und dient als Positivkontrolle. Mit Hilfe des DNA-Farbstoffs wird zwischen kernhaltigen Vorläuferzellen und kernlosen Retikulozyten und Erythrozyten unterschieden.

Es werden zytochemische Färbungen nach May Grünwald durchgeführt, um die Anzahl der in Nabelschnurblut befindlichen kernhaltigen Vorläuferzellen zu bestimmen. Die Immunfärbungen werden anhand von zwei verschiedenen enzymgekoppelten Nachweissystemen durchgeführt. Bei beiden Systemen kommt es aufgrund der Ausbildung von Enzymkomplexen zu einer Signalverstärkung und somit zu einem sensitiven Nachweis.

3.9.1 Zytochemische Färbung von Blutausstrichen zur Zelldifferenzierung

Die zytochemische Färbung von Blutausstrichen dient der Bestimmung des prozentualen Anteils erythroider Vorläuferzellen, die zusätzlich anhand zelltypischer morphologischer Charakteristika identifiziert werden. Durch spezifische Färbung des Zytoplasmas und des Zellkerns, aber auch anhand der Größe, Form und Granularität lassen sich Leukozytensubpopulationen und erythroide Vorläuferzellen voneinander unterscheiden.

Für die zytochemische Analyse von Zellen wird Hemacolor®Färbelösung (Fa. Merck) verwendet. Luftgetrocknete Blutausstriche werden zur Fixierung 5 x für jeweils 1 sec in Hemacolor Lösung 1 (Fixativ) getaucht. Anschließend wird überschüssige Lösung auf einem Papiertuch entfernt. Zur Färbung werden die Präparate für 1 sec in Hemacolor Lösung 2 getaucht und 6 x für jeweils 1 sec mit Hemacolor Lösung 3 behandelt. Danach werden die Objektträger 2 x mit Pufferlösung abgespült und an der Luft getrocknet. Bei der anschließenden mikroskopischen Analyse wird je Präparat der prozentuale Anteil erythroider Vorläuferzellen unter 100 Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) durch Auszählen ermittelt. Die Bestimmungen erfolgen an dem Mikroskop CK30 (Fa. Olympus).

3.9.2 Immunfärbungen mit der APAAP-Methode

Immunfärbungen werden mit der Alkalischen Phosphatase anti-Alkalischen Phosphatase Methode (APAAP; Universal APAAP Kit, Fa. Dako Cytomation) durchgeführt.

Die Präparate werden für 10 min mit Aceton fixiert und anschließend für 5 min getrocknet. Zunächst erfolgt die Inkubation mit dem zu untersuchenden Antikörper unverdünnt für 30 min bei RT. Nach einmaligem Spülen mit Tris gepufferter Kochsalzlösung (TBS, pH 7,4) werden die Präparate mit dem Sekundärantikörper Kaninchen gegen Maus IgM, 1:25 in 1 x TBS / 10 % HS, für 30 min bei RT inkubiert. Es wird mit TBS gewaschen und mit dem APAAP-Komplex, 1:50 in TBS / 10% humanes AB-Serum (HS) verdünnt, für 30 min inkubiert. Nach Waschen mit TBS werden die Inkubationen mit dem Sekundärantikörper und dem APAAP-Komplex je 2 x für 10 min wiederholt. Im Anschluss erfolgt die Entwicklung mit Neufuchsin Substratlösung für 10 – 20 min bei RT. Die Präparate werden danach mit Leitungswasser gespült und die Zellkerne mit Mayers Hämalaun für 2 min gegengefärbt. Das „Bläuen“ erfolgt für 10 min unter fließendem Leitungswasser. Anschließend werden die Präparate mit Kaisers Glyceringelatine (Fa. Merck) eingedeckt und an dem Universalmikroskop Axioplan 2 (Fa. Carl Zeiss) analysiert.

3.9.3 Immunzytochemische Färbung mit UltraVision

Zusätzlich wird für Immunfärbungen die UltraVision-HRP Methode (UltraVision™, Fa. LabVision Corporation) verwendet.

Gefrierpräparate werden vor der Färbung mindestens zwei Stunden an der Luft getrocknet und zunächst für 5 min mit Aceton bei RT fixiert. Endogene Peroxidasen werden für 10 min bei RT mit Peroxidase Blocking Reagent (Fa. Dako Cytomation) blockiert. Anschließend wird 2 x für 5 min mit TBS / 0,05 % Tween 20 gewaschen. Alle weiteren Inkubationsschritte werden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wird mit Ultra V Block / 20 % HS für 10 min inkubiert. Ohne zu Waschen wird der zu testende Antikörper unverdünnt für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS / 0,05 % Tween 20 wird biotinylierter Sekundärantikörper Ziege gegen Polyvalent für 10 min aufgetragen. Es wird 3 x mit Puffer gewaschen und anschließend mit Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) für 10 min inkubiert. Abschließend werden die Präparate für 3 – 5 min mit dem Substrat-Chromogen AEC+ (Fa. Dako Cytomation) entwickelt. Die Reaktion muss nach der Inkubation sofort mit A. dest gestoppt werden. Die Gegenfärbung erfolgt mit Mayers Hämalaun für 2 min, das „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser. Die Präparate werden mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt und analysiert.

3.9.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Die Präparate werden nach Fixierung für 10 min in Aceton für 5 min getrocknet. Anschließend erfolgt die Inkubation von anti-Glykophorin A, verdünnt in PBS / 1 % BSA, für 60 min bei RT. Nach Waschen mit PBS werden die Präparate mit dem in PBS verdünnten Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) für 60 min bei RT inkubiert. Die Präparate werden mit PBS gespült und mit dem zu testenden Antikörperklon, unverdünnt eingesetzt, für 60 min inkubiert. Nach dem Waschen wird mit dem Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgM Alexa 594 (Molecular Probes), verdünnt in PBS / 1 % BSA, für 60 min bei RT inkubiert. Es wird mit Waschpuffer gespült und die DNA-Färbung mit DAPI (Fa. Molecular Probes), verdünnt in PBS / 1 % BSA, für 3 min inkubiert. Nach einmaligem Waschen werden die Präparate mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt und bis zur Analyse bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Auswertung erfolgt am Universalmikroskop Axioplan 2 mit entsprechendem Filtersatz. Dokumentiert werden die Analysen mit dem digitalen Kamerasystem MetaFluor Imaging System (Fa. Visitron Systems GmbH).

3.9.5 Analyse gefärbter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Analyse von Blutzellen, die auf einem Objektträger fixiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt wurden. Nach Anregung der Fluorochrome durch eine Lichtquelle wird die Emission eines Fluoreszenzfarbstoffes über Sperrfilter sichtbar gemacht. Oberflächenantigene und intrazelluläre Strukturen, die von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gebunden werden, werden durch das Fluoreszenzsignal erkannt und können auf bzw. in der Zelle lokalisiert werden. Zur Analyse wurden das Fluoreszenzmikroskop IX50 sowie das Universalmikroskop Axioplan 2 mit einer Quecksilberdampf Lampe zur Erzeugung der Anregungsenergie verwendet. Für den Nachweis des Farbstoffes Alexa Fluor 488 wird eine Anregungswellenlänge von 450 – 490 nm und ein Detektions-Bandpassfilter von 510 - 530 nm verwendet. Das Fluorochrom Alexa Fluor 594 wird mit einer Wellenlänge von 530 – 585 angeregt und mit einem Langpasspassfilter von 615 nm detektiert. Für den Nachweis des DNA-Farbstoffs DAPI wird eine Anregungswellenlänge von 360 – 370 nm und ein Detektions-Langpassfilter von 420 nm verwendet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Spezifisches Expressionsprofil auf fetalen und adulten erythroiden Zellen

Zur Untersuchung der Expression von Oberflächenmarkern auf fetalen und adulten erythroiden Zellen wurden CD71 (Transferrin-Rezeptor), CD36 (Thrombospondin-Rezeptor) Glykophorin A (Sialoglykoprotein) und auf der Zelloberfläche exprimierte Galaktose, die mit dem Lektin SBA (*soybean agglutinin*) nachgewiesen wurde, eingesetzt. Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten an mononukleären Zellen (MNCs) aus Nabelschnurblut und adultem Blut. Beide Gewebe wurden mit anti-CD71, anti-CD45 in Kombination mit weiteren Markern gefärbt (s. 3.8.1). Zur Untersuchung von MNCs aus Nabelschnurblut wurde der DNA-Farbstoff LDS 751 zur Differenzierung kernhaltiger und kernloser Zellen, bei adultem Blut wurde 7-Actino-aminomycin D (7-AAD) Bestimmung der Vitalität eingesetzt. Die Ergebnisse der Analysen sind in der folgenden Auswertung exemplarisch dargestellt (s. Abb. 4).

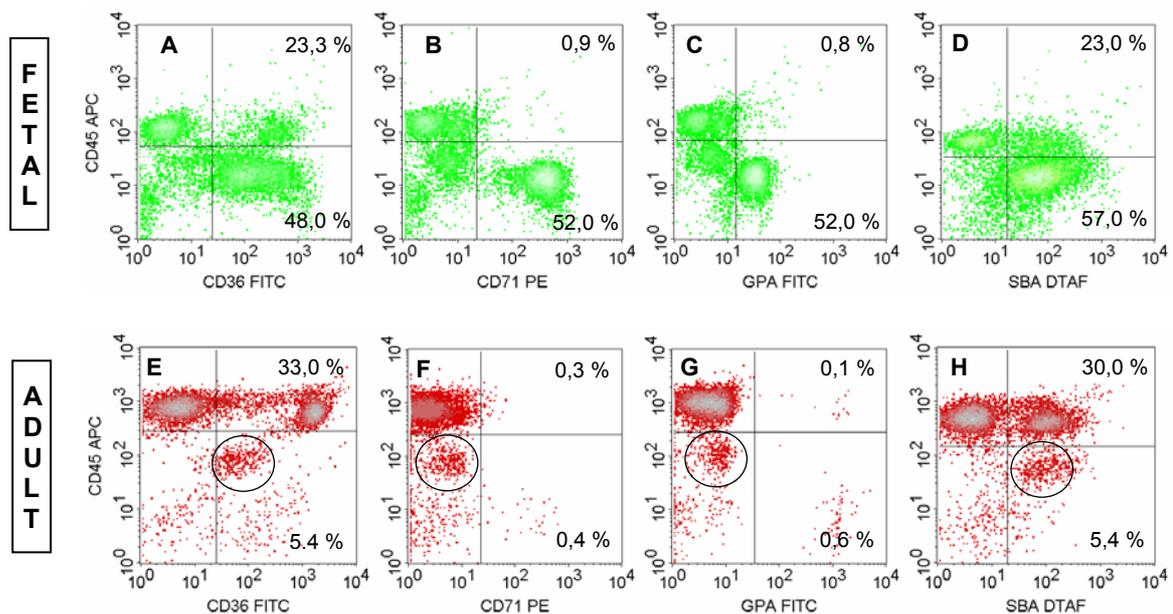


Abbildung 4: Expression von Oberflächenmarkern auf fetalen und adulten erythroiden Zellen

Untersuchung der Bindung von anti-CD71, anti-GPA (Glykophorin A), anti-CD36 und Galaktose-bindendem SBA (*soybean agglutinin*). Die vier Marker werden sowohl auf fetalen als auch auf adulten Zellen exprimiert. Tote Zellen, Zelltrümmer und Thrombozyten sind bei Analysen adulter MNCs beispielhaft durch Kreissymbole hervor gehoben. (A – D) Immunfluoreszenzfärbungen an MNCs aus Nabelschnurblut. (E – H) Färbungen an MNCs aus adultem Blut.

Bei dem untersuchten Nabelschnurblut handelte es sich um eine Probe aus der 38. Schwangerschaftswoche (SSW) mit einem mikroskopisch ermittelten Anteil (s. 3.2) von ca. 29% erythroiden Vorläuferzellen. Zusätzlich waren trotz der Isolierung mononukleärer Zellen mit einem Ficoll-Gradienten noch Erythrozyten vorhanden. Sowohl bei

Nabelschnurblut als auch bei adulten Blut wurden Thrombozyten und Debris, d.h. tote Zellen und Zelltrümmer, nachgewiesen (Kreissymbole). Der Anteil von Debris betrug bei MNCs aus Nabelschnurblut ca. 10 %, bei MNCs aus adultem Blut ca. 5 %. Bei den Analysen von CD36 und SBA war zu erkennen, dass Debris oder Thrombozyten von anti-CD36 bzw. SBA gebunden wurde (s. Abb. 4E, 4H), von anti-CD71 und anti-GPA dagegen nicht (s. Abb. 4F, 4G).

In diesem Nabelschnurblut wurde das Oberflächenantigen CD71 auf ca. 53 % aller Zellen nachgewiesen (s. Abb. 4B). Bei den Zellen, die gleichzeitig CD45-positiv waren, handelte es sich wahrscheinlich um aktivierte Lymphozyten und proliferierende Zellen. Bei 52 % aller CD71-positiven Zellen handelte es sich um erythroide Vorläuferzellen, die nicht den Marker CD45 exprimierten. GPA wurde ebenfalls auf insgesamt ca. 53 % aller Zellen nachgewiesen, von denen 0,8 % CD45-positiv waren (s. Abb. 4C). Da es sich aber bei GPA um einen Marker handelt, der ausschließlich auf erythroiden Zellen gebildet wird, sollten keine GPA und CD45 doppelt positiven Zellen auftreten. Es kann sich dabei um unspezifische Bindung an tote Zellen handeln, da diese bei der Untersuchung von MNCs aus Nabelschnurblut nicht ausgeschlossen wurden. Anti-CD36 erkannte ca. 71 % der Nabelschnurblutzellen (s. Abb. 4A). Bei CD45-negativen Zellen handelte es sich um erythroide Zellen und Thrombozyten. Die CD45-positiven Zellen repräsentieren die Population der Monozyten. CD36 ist als Oberflächenprotein auf Monozyten und Thrombozyten beschrieben. SBA hat in Nabelschnurblut ca. 23,0 % der CD45-positiven und ca. 57 % der CD45-negativen erythroiden Zellen und Thrombozyten gebunden (s. Abb. 4D). Bei den Zellen, die SBA und CD45 doppelt positiv waren, handelt es sich um Monozyten.

Die Analyse von adulten MNCs zeigte, dass insgesamt nur 0,7 % der Zellen durch anti-CD71 gebunden (s. Abb.4F) wurden. Bei CD45-positiven Zellen handelte es sich wahrscheinlich um proliferierende Zellen, die den Transferrin-Rezeptor exprimieren. Da im adulten Blut keine erythroiden Vorläuferzellen zu erwarten sind, handelt es sich bei CD71-positiven, CD45-negativen Zellen wahrscheinlich um Retikulozyten. Der Marker GPA wurde, wie CD71, auf ca. 0,7 % aller adulten MNCs exprimiert, von denen allerdings 0,6 % CD45-negativ waren (s. Abb.4G). Dabei handelte es sich um kernlose Retikulozyten und Erythrozyten, die nach der Isolierung der mononukleären Zellen noch in der MNC-Fraktion vorhanden waren. Anti-CD36 und SBA haben 38,4 % bzw. 35,4 % aller MNCs aus adultem Blut gebunden (s. Abb.4E und 4H). Anti-CD36 und SBA erkannten auch im adulten Blut Monozyten, die CD45-positiv sind. Etwa 5 % der CD45-negativen Zellen waren CD36- bzw. SBA-positive erythroide Zellen und Thrombozyten.

Tabelle 1 zeigt die Expression von Glykophorin A, CD71, CD36 und SBA-Ligand an 11 Nabelschnurblutproben und an 4 adulten Blutproben. Die Zellen, die für einen der Marker positiv waren, wurden zusätzlich in CD45-positive und CD45-negative Zellen unterschieden.

Tabelle 1: Antigenexpression auf MNCs aus Nabelschnurblut und adultem Blut

MNCs aus Nabelschnurblut (Mittelwerte, n = 11)			
Antigen	Summe % positiv	% CD45-positiv	% CD45-negativ
CD71	30,25	0,6	29,7
Glykophorin A	25,5	0,3	25,2
CD36	64,9	28,9	36,0
GalNAc*	70,6	32,9	37,7
MNCs aus adultem Blut (Mittelwerte, n = 4)			
Antigen	Summe % positiv	% CD45-positiv	% CD45-negativ
CD71	0,5	0,3	0,2
Glykophorin A	0,8	0,1	0,7
CD36	25,4	25,1	0,3
GalNAc*	35,2	34,6	0,6

*GalNAc: terminales α - oder β -N-Acetylgalaktosamin (Nachweis durch SBA)

In Nabelschnurblut wurden durchschnittlich 29,7 % CD71-positive und 25,2 % GPA-positive Zellen nachgewiesen, die CD45-negativ waren. Dem gegenüber waren nur 0,6 % und 0,3 % CD45-positiv. Anti-CD36 und SBA markierten ca. 64,9 % bzw. 70,6 % aller Zellen. Durchschnittlich 28,9 bzw. 32,9 % waren CD45-positive Zellen, vermutlich Monozyten. In adultem Blut wurden die Marker CD71 und GPA nur auf wenigen mononukleären Zellen exprimiert. Alle vier Marker wurden durchschnittlich auf 0,5 % der CD45-negativen Zellen nachgewiesen, da im adulten Blut die Anzahl erythroider Vorläuferzellen erwartungsgemäß niedrig ist. Anti-CD71 und anti-GPA haben 0,3 bzw. 0,1 % der CD45-positiven Zellen gebunden, anti-CD36 und SBA dagegen ca. 25 % bzw. 35 %.

Der direkte Vergleich der Expression von CD71, GPA, CD36 und die Bindung von SBA an Zuckerketten auf mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut und adultem Blut zeigte Unterschiede auf. In den hier untersuchten Nabelschnurblutproben wurden von den Antikörpern zum Teil weit über 30 % erythroide Zellen gebunden. Im Vergleich dazu wurden in adultem Blut nur unter 1 % CD45-negative Zellen erkannt. In beiden Geweben haben CD71 und GPA nur wenig bzw. keine Leukozyten gebunden, anti-CD36 und SBA haben Monozyten gebunden.

4.2 Selektion von Antikörper produzierenden Hybridomaklonen

Zurzeit ist kein Antikörper bekannt, der spezifisch fetale erythroide Zellen erkennt und somit eine Charakterisierung dieser Zellen sowie eine Differenzierung fetaler und adulter erythroider Zellen ermöglicht. Die Entwicklung eines Antikörpers, der ein Antigen bindet, das ausschließlich auf fetalen erythroiden Zellen gebildet wird, erfolgte durch Immunisierung von Mäusen mit fetalen erythroiden Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut.

4.2.1 Etablierung des Selektionsverfahrens

Die Selektionierung von Hybridomazellen nach Antikörpern, die die gewünschten Zellen binden, erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dafür wurde Nabelschnurblut eingesetzt, das mindestens 8 % erythroide Vorläuferzellen enthielt, um eine ausreichende Anzahl an Zielzellen für die Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Weiterhin wurden eine DNA-Färbung über LDS 751 sowie Antikörper gegen die Marker CD45 und CD71, die eine Unterscheidung von Leukozyten und erythroiden Zellen ermöglichen, miteinander kombiniert. Diese Mehrparameteranalyse ermöglichte eine Detektion von antikörperhaltigen Zellkulturüberständen.

4.2.1.1 Bestimmung des Anteils an Erythroblasten in Nabelschnurblut

Zur Untersuchung Antikörper produzierender Kulturüberstände, zur Charakterisierung der entwickelten Antikörper und zur Charakterisierung fetaler erythroider Zellen wurden MNCs von 150 Nabelschnurblutproben bearbeitet. Die Proben wurden sowohl einzeln als auch miteinander gemischt verwendet. Zur Bestimmung des Anteils an Erythroblasten wurden von jeder Probe Blutausrichungen angefertigt und mit Hemacolor gefärbt. Die Bestimmung des Anteils an Erythroblasten / 100 Leukozyten erfolgte mikroskopisch. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Bestimmung des prozentualen Anteils an erythroiden Vorläuferzellen (*nucleated red blood cells*, NRBCs) in Nabelschnurblut dargestellt.

Tabelle 2: Prozentualer Anteil an Erythroblasten in Nabelschnurblut

Nabelschnurblutproben (38. – 40. SSW), n = 150		
% NRBCs / Blutprobe	Anzahl Blutproben	% Anteil Blutproben
< 5 % NRBCs	72	48,0 %
5 – 10 % NRBCs	43	28,6 %
10 – 20 % NRBCs	22	14,6 %
20 – 30 % NRBCs	9	6,0 %
> 30 % NRBCs	4	2,6 %
Durchschnitt: 7,9 % NRBCs / Blutprobe		

In 150 Nabelschnurblutproben der 38.–40. SSW wurden durchschnittlich 7,9 % Erythroblasten nachgewiesen. In 48 % aller untersuchten Blutproben waren es weniger als 5 %. In 43 von 150 Blutproben (28,6 %) wurde ein Anteil von 5 – 10 % Erythroblasten ermittelt. Größere Mengen an NRBCs, 10 – 30 %, wurden in ca. 20 % der bearbeiteten Proben ermittelt. In nur 2,6 % der Proben wurde ein Anteil von mehr als 30 % Erythroblasten nachgewiesen.

4.2.1.2 Differenzierung kernhaltiger und kernloser Zellen mittels LDS 751

Der DNA-Farbstoff LDS 751 wurde zur Differenzierung von kernlosen Erythrozyten und Retikulozyten, Lymphozyten und Monozyten bzw. Granulozyten eingesetzt. Eine Unterscheidung dieser Populationen wurde anhand der Inokulation von Erythrozyten in MNCs aus Nabelschnurblut überprüft (s. Abb.5).

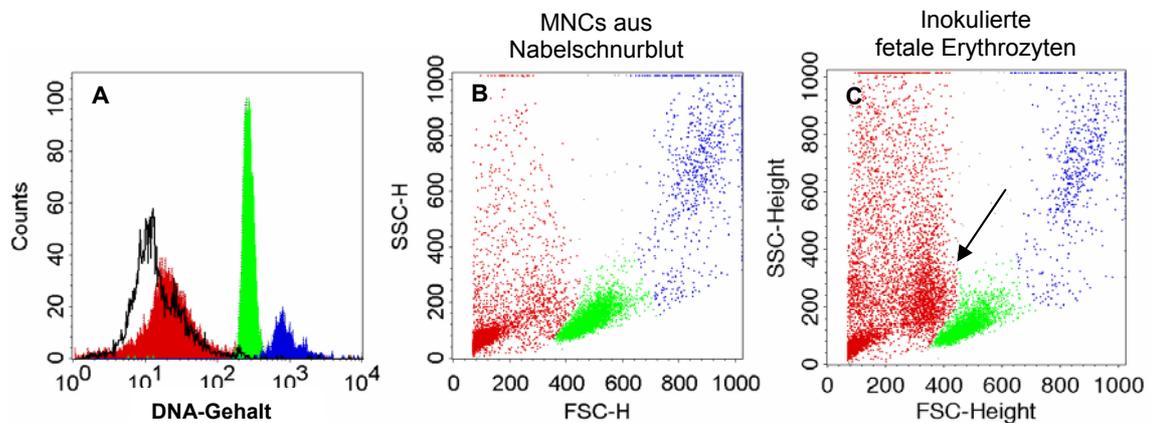


Abbildung 5: Unterscheidung kernhaltiger und kernloser Zellen mittels LDS 751

Analyse von DNA-Färbungen mit LDS 751 an MNCs und Erythrozyten aus Nabelschnurblut. (A) DNA-Gehalt von MNC-Subpopulationen als ausgefülltes Histogramm und der Nachweis inokulierter Erythrozyten als schwarze Linie. (B) und (C) Verteilung der im Histogramm farblich dargestellten Subpopulationen im Streulichtbild. Dabei ist in der Graphik C die Zunahme von kernlosen inokulierten Erythrozyten zu sehen. Kernlose Zellen sind rot, Lymphozyten sind grün, Monozyten und Granulozyten sind blau dargestellt.

Das Histogramm (s. Abb.5A) zeigt die Verteilung kernloser und kernhaltiger Zellen mit und ohne inokulierte Erythrozyten. Die Abbildungen 5B und 5C veranschaulichen die Verteilung der über LDS 751 differenzierten Populationen kernloser und mononukleärer Zellen im Streulichtbild anhand von FSC und SSC. Die Parameter Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht erlauben Aussagen über die Größe bzw. die Granularität von Zellen.

Bei den rot dargestellten Zellen handelt es sich um kernlose Erythrozyten, Retikulozyten und Debris (tote Zellen und Zelltrümmer). Bei den grün dargestellten Zellen handelt es sich um die Population der Lymphozyten, die blau gefärbte Population repräsentiert Monozyten sowie nach Dichtegradientenzentrifugation verbliebene Granulozyten. Die Population kernloser Zellen nach der Inokulation von Erythrozyten ist als schwarze Linie dargestellt.

Der Vergleich der Streulichtbilder verdeutlicht die Zunahme an kernlosen Zellen nach der Inokulation von Erythrozyten. Kernhaltige und kernlose Zellen sind anhand der DNA-Färbung differenzierbar.

4.2.1.3 Unterscheidung von Leukozytensubpopulationen über CD45

Für die Identifizierung von Leukozytensubpopulationen wurde die Expression des Markers CD45 auf weißen Blutzellen genutzt. Dieses Oberflächenprotein wird auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten exprimiert. In Abbildung 6 ist eine Analyse CD45-positiver Zellen exemplarisch dargestellt.

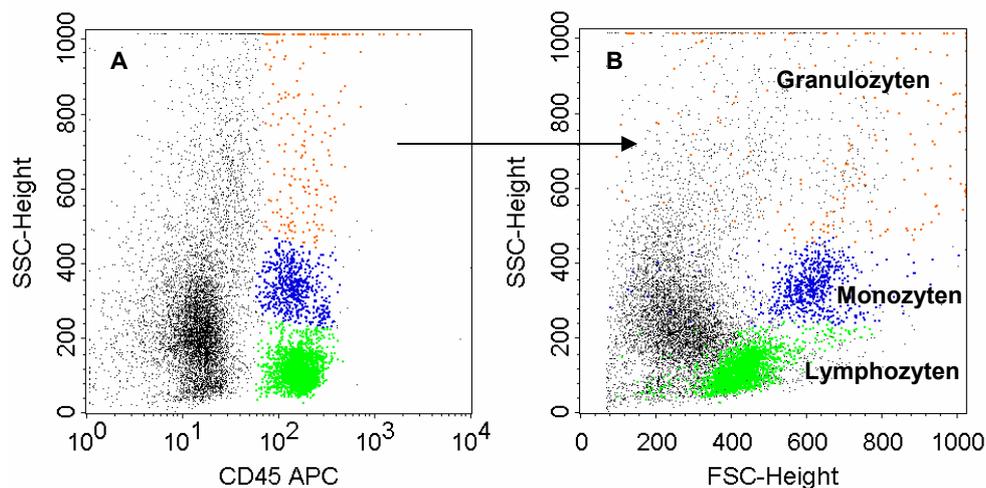


Abbildung 6: Verteilung von Leukozytensubpopulationen in Nabelschnurblut

Verteilung CD45-positiver, mononukleärer Zellen im Streulichtbild. **(A)** Färbung mit anti-CD45-APC: Die Subpopulation der Lymphozyten ist grün dargestellt, Monozyten blau und nach Dichtegradientenzentrifugation verbliebene Granulozyten sind orange dargestellt. **(B)** Verteilung der in A gezeigten Subpopulationen im Streulichtbild.

Mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch das CD45-Antigen erkennt, konnten Leukozytensubpopulationen detektiert und voneinander differenziert werden. Abbildung 6A zeigt eine Färbung mit anti-CD45-APC dargestellt. Abbildung 6B zeigt die spezifische Verteilung von Leukozytensubpopulationen nach Größe und Granularität im Streulichtbild. Die Population der relativ kleinen Lymphozyten ist grün dargestellt, Monozyten sind blau hervor gehoben. Nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation verbliebene Granulozyten sind orange dargestellt. Leukozytensubpopulationen lassen sich mit Hilfe eines Antikörpers gegen das CD45-Antigen differenzieren.

4.2.1.4 Identifizierung erythroider Vorläuferzellen mittels CD71

Zur Bestimmung erythroider Vorläuferzellen wurde der in der Literatur am häufigsten verwendete Selektionsmarker, CD71 (Transferrin-Rezeptor), eingesetzt. Dieser Marker wird auf kernhaltigen erythroiden Vorläuferzellen sowie auf kernlosen Erythrozyten und

Retikulozyten exprimiert. Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Expression von CD71 sowie die Verteilung kernhaltiger und kernloser CD71-positiver Zellen in Nabelschnurblut.

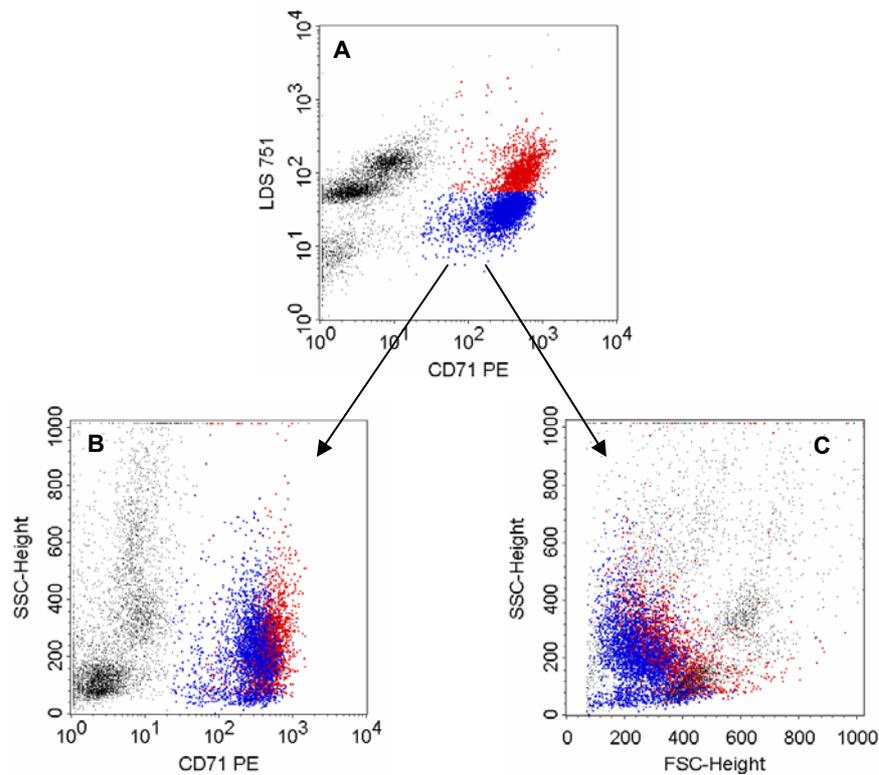


Abbildung 7: Identifizierung erythroider Vorläuferzellen in Nabelschnurblut

Die Diagramme zeigen die Expression von CD71 und die Verteilung erythroider Zellen im Streulichtbild sowie den DNA-Gehalt dieser Zellen. **(A)** Differenzierung von kernhaltigen und kernlosen CD71-positiven Zellen mittels LDS 751. **(B und C)** Streulichteigenschaften der mittels anti-CD71 markierten erythroiden Zellen. Kernlose CD71-positive Zellen sind blau, kernhaltige CD71-positive Vorläuferzellen sind rot dargestellt.

Die beiden in Abbildung 7A dargestellten CD71-positiven Populationen waren mit Hilfe des DNA-Farbstoffs LDS 751 unterscheidbar. CD71-positive kernlose Zellen sind blau, CD71-positive kernhaltige Zellen sind rot dargestellt. Zusätzlich unterschieden sich diese Zellen bezüglich der Stärke der Immunfluoreszenzfärbung mit anti-CD71 (s. Abb.7B). CD71 und LDS 751 doppelt positive Zellen waren in der Fluoreszenzintensität gegenüber den CD71-positiven und LDS 751-negativen Zellen stärker. Dies deutet auf eine stärkere Expression des CD71-Antigens auf kernhaltigen Vorläuferstadien hin. Die Abbildung 7C zeigt die Lage erythroider Zellen im Streulichtbild. In dieser Graphik ist zu sehen, dass kernhaltige CD71-positive Zellen größer sind als kernlose CD71-positive Zellen.

Der Transferrin-Rezeptor wird auf kernhaltigen erythroiden Vorläuferzellen und kernlosen Retikulozyten exprimiert. Die Population erythroider Zellen in Nabelschnurblut wurde mittels anti-CD71 identifiziert.

4.2.1.5 Multi-Parameter-Analyse zur Selektion von Antikörperklonen

Um bei einem hohen Probendurchsatz nur Klone mit geeigneter Spezifität zu selektionieren, wurde ein durchflusszytometrisches Verfahren entwickelt, das die simultane Beurteilung von mehreren Parametern pro untersuchter Zelle ermöglichte. Durch Kombination der etablierten Kern-, CD71- und CD45-Färbung und der Nutzung der Streulichteigenschaften von Zellen wurden erythroide Vorläuferzellen und geeignete Klone gleichzeitig identifiziert. Die Strategie der durchflusszytometrischen Multi-Parameter-Analyse ist in Abbildung 8 dargestellt.

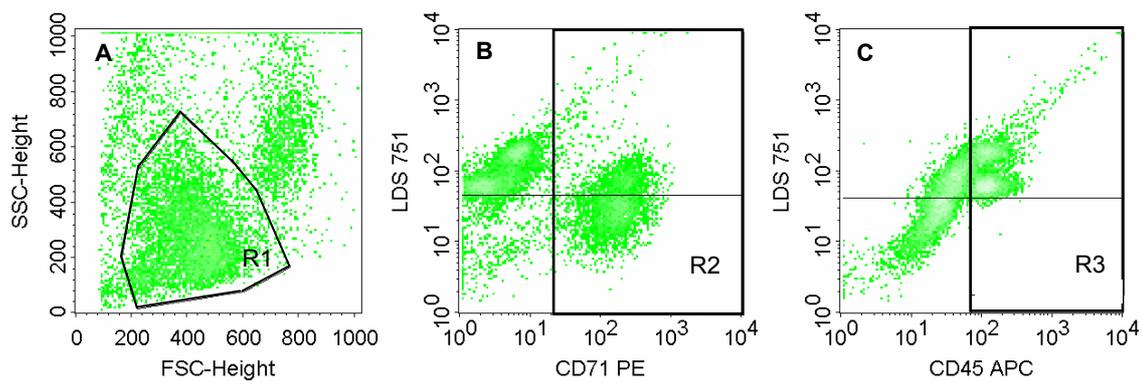


Abbildung 8: Präselektionierung erythroider Zellen zum Antikörper-Screening

(A) Streulichteigenschaften von Zellen anhand von FSC und SSC. R1 grenzt die Population der Lymphozyten und erythroiden Vorläuferzellen ein. (B) Fluoreszenzen von anti-CD71 PE und dem DNA-Farbstoff LDS 751. R2 schließt CD71-positive Zellen ein. (C) CD45-positive Zellen werden mit die R3 erfasst und ausgeschlossen.

Die Streulichteigenschaften von Zellen unterschiedlicher Größe (FSC) und Granularität (SSC) wurden genutzt, um den Bereich der Zielzellen einzugrenzen (s. Abb.8A, Region R1). Im vorherigen Kapitel (4.2.1.4) wurde gezeigt, dass die Größe erythroider Vorläuferzellen im Bereich der Größe von Lymphozyten einzuordnen ist. Die Zielzellen sollten außerdem den Marker CD71 exprimieren (s. Abb.8B, Region R2) und damit die Population erythroider Zellen anzeigen. Leukozyten wurden über den Marker CD45 ausgeschlossen (s. Abb.8C, Region R3). Mit Hilfe des DNA-Farbstoffs LDS 751 wurde zwischen kernhaltigen Vorläuferstadien und kernlosen reifen Erythrozyten unterschieden (s. Abb.8B und 8C). Durch die logische Verknüpfung $R1 + R2 - R3$ wurden die Zielzellen, NRBCs, identifiziert.

4.2.2 Screening von Antikörper produzierenden Hybridomaklonen

Bei der Analyse von 690 Zellkulturüberständen aus vier Immunisierungen wurden in drei Zellkulturüberständen Antikörper detektiert, die spezifisch erythroide Zellen aus Nabelschnurblut binden. Der Anteil von NRBCs wurde vor dem Mischen der Zellen verschiedener Blutproben bestimmt. Die Proben wurden so gewählt, dass ca. 10 % der Zellen NRBCs waren, um Zielzellen in ausreichender Menge detektieren zu können: Die Ergebnisse der ersten Untersuchung der Zellkulturüberstände sind in Abbildung 9 dargestellt.

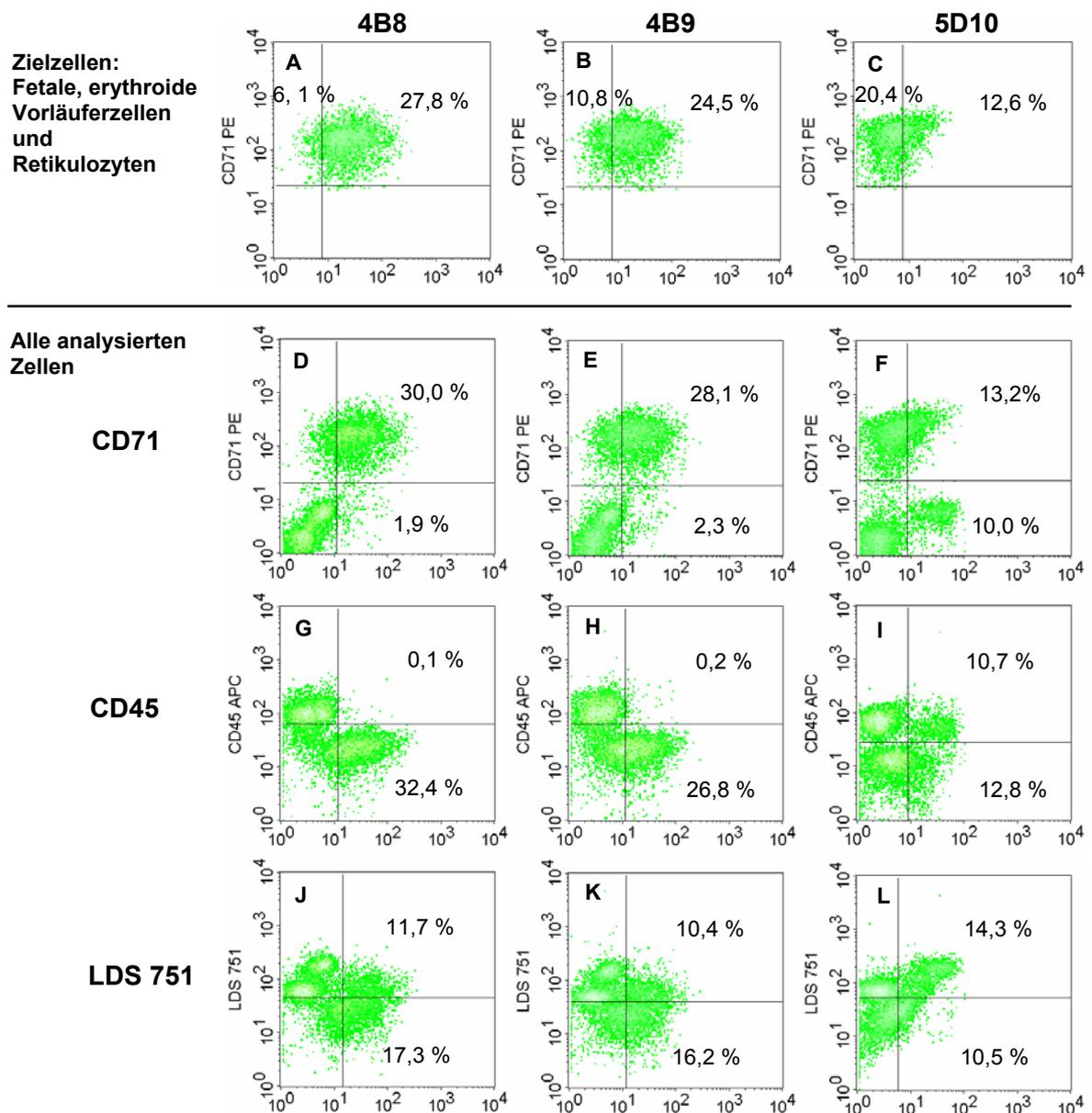


Abbildung 9: Antikörper produzierende Hybridomaklone 4B8, 4B9, 5D10

Die Darstellung ist in drei Spalten mit je vier Diagrammen aufgeteilt. Jede Spalte zeigt die Analyse eines Klon (4B8, 4B9, 5D10), der mit Hilfe der beschriebenen Multi-Parameter-Analyse selektiert wurde. (A – C) Identifizierung der Zellkulturüberstände 4B8, 4B9 und 5D10, dargestellt gegen anti-CD71. Es werden nur erythroide Vorläuferzellen gezeigt. In den Reihen 2 - 4 werden alle Zellen gezeigt. (D – F) Hybridomaklone gegen CD71. (G – I) Hybridomaklone gegen CD45. (J – L) Hybridomaklone gegen LDS 751.

Die Antikörper produzierenden Hybridomklone 4B8, 4B9 und 5D10 wurden mit Hilfe der durchflusszytometrischen Mehr-Parameter-Analyse identifiziert (s. Abb.9A – 9C). 4B8, 4B9 und 5D10 binden Zellen, die sowohl CD71-positiv und kernhaltig als auch CD45-negativ sind (oberer rechter Quadrant). Nicht alle CD71-positiven Zellen sind auch positiv für die Hybridomklone. 4B8 und 4B9 haben in diesem Blutgemisch ca. 72 - 82 % der CD71-positiven Zellen gebunden, 5D10 nur etwa 35 %.

Die Diagramme 9D – 9L (Reihen 2 – 4) zeigen die Ergebnisse der Selektionierung ohne einschränkende Regionen, d.h. es werden sämtliche analysierten Zellen berücksichtigt. Es ist zu sehen, dass dadurch die Anzahl CD71-positiver Zellen angestiegen ist, und dass weitere Zellpopulationen nachweisbar waren. Es wurde die Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an Zellen einer weiteren Blutzellpopulationen, die CD71-negativ war, deutlich (s. Abb.9D, 9E und 9F). Die Graphiken G – I zeigen die Hybridomklone gegen den Nachweis von CD45, den Leukozytenmarker. Bei 5D10 (s. Abb.9I) wurde nachgewiesen, dass es sich bei der zuvor CD71-negativen Population erwartungsgemäß um den gleichen Anteil CD45-positiver Zellen handelte. Die Population der zuvor CD71-positiven Zellen zeigte sich im unteren rechten Quadranten als CD45-negative Population. 4B9 und 4B9 zeigten eine schwache Bindung an 0,1 – 0,2 % CD45-positiver Zellen (s. Abb.9G und 9H). Die Diagramme J – L stellen die Zellkulturüberstände gegen LDS 751, den DNA-Farbstoff dar. Dabei zeigte sich, dass 4B8 und 4B9 sowohl kernhaltige als auch kernlose erythroide Zellen gebunden haben. Die beiden Populationen ergaben zusammen ungefähr die Anzahl an CD71-positiven Zellen (Vgl. Abb. 9A und 9B). Da bekannt ist, auf welchen Zellen CD71 exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den 4B8- und 4B9-positiven Zellen um eine Subpopulation von NRBCs und Retikulozyten handelt. 5D10 wird ebenfalls auf einer Subpopulation von NRBCs exprimiert. Weiterhin legt das Ergebnis der Analyse von 5D10 gegen LDS 751 nahe, dass 5D10 fetale Monozyten gebunden hat (s. Abb.10).

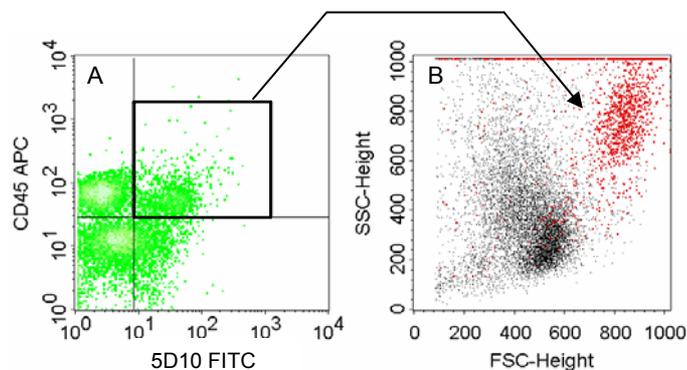


Abbildung 10: Identifizierung der 5D10-positiven Leukozytensubpopulation

(A) Darstellung von CD45 gegen 5D10. Die zu untersuchende 5D10-positiv Leukozytensubpopulation ist durch den Rahmen hervorgehoben. (B) Das Streulichtbild zeigt eine Population von Lymphozyten und eine Population von Monozyten in Nabelschnurblut. Monozyten sind 5D10-positiv (rot dargestellt).

Eine Analyse der 5D10- und CD45-positiven Population im Streulichtbild bestätigte die Annahme. Bei den rot hervorgehobenen Zellen handelt es sich um 5D10-positive Monozyten.

Die anschließende Klonierung von 4B8, 4B9 und 5D10 erfolgte in zwei aufeinander folgenden Verdünnungsreihen (s. 3.7.2). Nach jeder Klonierung wurden die Funktionalität und Spezifität der Antikörper an mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut überprüft (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.3 Charakterisierung der neuen Antikörperklone 4B8, 4B9 und 5D10

Das Ziel war die Entwicklung monoklonaler Antikörper, die spezifisch fetale erythroide Zellen binden. Aus diesem Grund wurden die selektierten Zellkulturüberstände 4B8, 4B9 und 5D10 weiter untersucht, um die Bindung dieser Antikörper an fetale Leukozyten sowie adulte Erythrozyten auszuschließen. In einem weiteren Ansatz wurde geprüft, ob die drei Antikörper möglicherweise das gleiche Antigen erkennen.

4.3.1 Isotypisierung

Die Bestimmung des Isotyps der entwickelten Antikörper 4B8, 4B9 und 5D10 erfolgte mit Hilfe eines *Mouse Isotyping Kits* (3.7.4) (s. Abb.11).

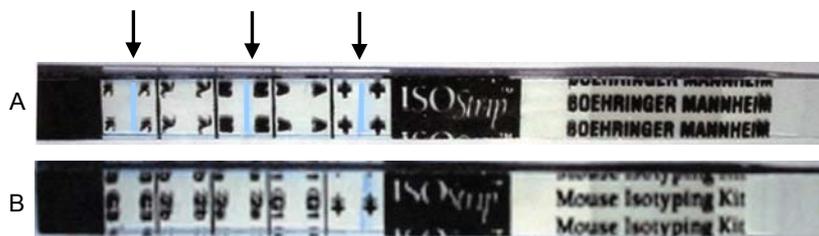


Abbildung 11: Ermittlung des Isotyps für 4B8, 4B9 und 5D10

(A) Aufteilung in die Subklassen IgA und IgM. (B) Identifizierung der Subklassen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3.

Für 4B8, 4B9 und 5D10 wurde der Isotyp IgM ermittelt.

4.3.2 Untersuchung der Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an Haupt-Blutgruppenantigene

Eine mögliche Bindung der antikörperhaltigen Zellkulturüberstände 4B8, 4B9 und 5D10 an Haupt-Blutgruppenantigene (AB0) wurde an adulten AB-positiven Erythrozyten überprüft (3.8.3). Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Die zu untersuchenden Antikörper wurden mit adulten Erythrozyten inkubiert und anschließend mit den im Kulturüberstand verbliebenen, nicht an Erythrozyten gebundenen Antikörpern MNCs aus Nabelschnurblut gefärbt. Als Kontrollen dienten anti-CD71 und anti-Glykophorin A.

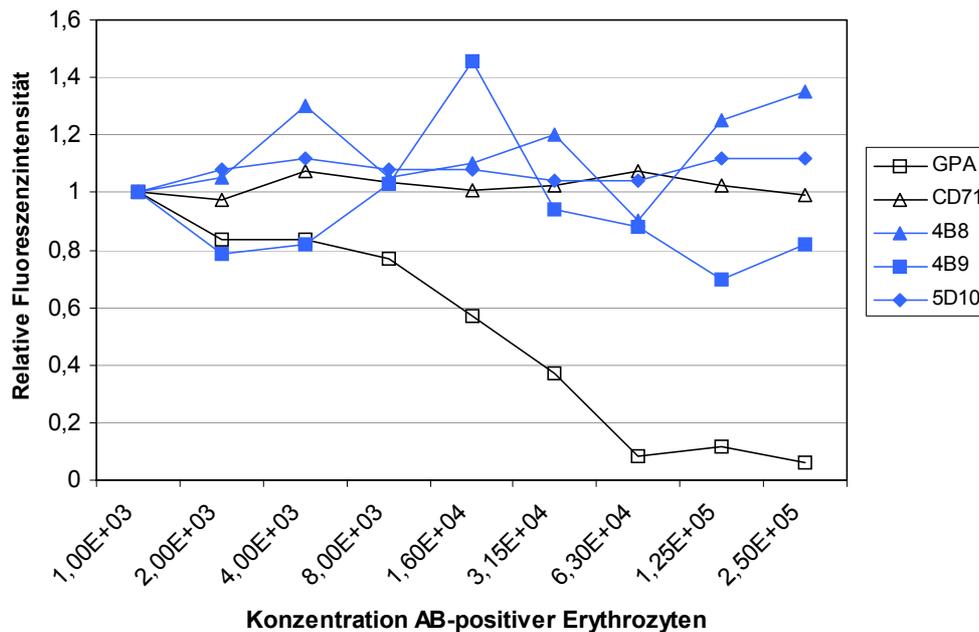


Abbildung 12: Untersuchung der Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an Blutgruppenantigene

In diesem Diagramm ist die Konzentration an AB-positiven Erythrozyten gegen die relative Fluoreszenzintensität aufgetragen. Alle Werte beziehen sich auf die Fluoreszenzintensität von Inkubationen mit 10^3 Erythrozyten. Die Bindung der Antikörper anti-4B8, anti-4B9 und anti-5D10 an Zellen aus Nabelschnurblut sind als blaue Kurven, die Kontrollen Glykophorin A und CD71 sind als schwarze Kurven dargestellt.

Die Fluoreszenzintensität des Glykophorin A Antikörpers hat mit steigender Konzentration von AB-positiven Erythrozyten stark abgenommen. Antikörper gegen Glykophorin A, die mit mehr als $6,3 \times 10^4$ Erythrozyten inkubiert wurden, konnten in der anschließenden Färbung an Nabelschnurblut keine Zellen mehr binden (\square). Es ist bekannt, dass GPA in hoher Dichte auf der Erythrozytenmembran exprimiert wird (Okumura et al., 1992). Erwartungsgemäß wurde durch Inkubation mit Erythrozyten der Anteil freier GPA-Antikörper in Lösung reduziert. Der als Negativkontrolle dienende CD71-Antikörper dagegen hat nicht an adulte Erythrozyten gebunden (\triangle). CD71 wird nur bis zum Retikulozytenstadium auf erythroiden Zellen exprimiert. Die zu untersuchenden Antikörper 4B8, 4B9 und 5D10 haben, wie CD71, nicht an AB-positive Erythrozyten gebunden (blaue Linien).

4.3.3 Überprüfung der Bindung an Zelllinien mit erythroiden Merkmalen

Die Zelllinien K-562 und KMOE-2 weisen definierte Entwicklungsstadien erythroider Zellen und somit ein bestimmtes Expressionsmuster auf (3.5). Mit Hilfe dieser Zelllinien sollte die Bindung der neuen Antikörper 4B8, 4B9 und 5D10 im Vergleich zu Antikörpern, die bekannte Oberflächenstrukturen auf erythroiden Zellen binden (CD71, CD36, Glykophorin A, Galaktose) überprüft werden. Zusätzlich wurden Antikörper gegen das Leukozytenantigen CD45 und den Marker CD34 untersucht. Eine CD34-Expression ist

vorrangig auf Stammzellen, aber auch dem sehr frühen erythroiden, Kolonien bildenden Stadium BFU – E beschrieben.

4.3.3.1 Leukämische Zelllinie K-562

Die Bindung der Antikörper 4B8 und 4B9 wurde im Vergleich zu weiteren Antikörpern an der leukämischen Zelllinie K-562 untersucht. K-562-Zellen weisen phänotypisch ähnliche Eigenschaften wie embryonische erythroide Zellen auf (Fuhr et al., 1981; Lozzio und Lozzio, 1975). Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen CD71, Glykophorin A, CD36, CD45, CD34 (nicht dargestellt) sowie mit SBA durchgeführt. Mit Hilfe einer Vitalitätsfärbung wurde eine Bindung an tote Zellen ausgeschlossen. MNCs aus Nabelschnurblut dienten als Positivkontrolle für die untersuchten Antikörper (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Ergebnisse werden in Abbildung 13 gezeigt.

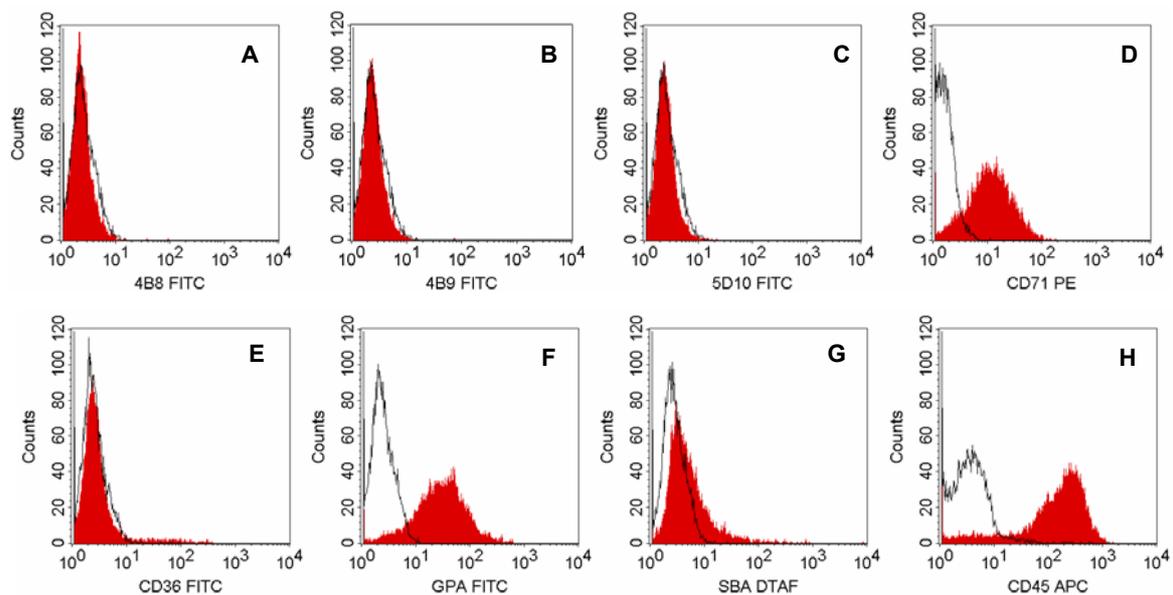


Abbildung 13: Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an K-562

Die Histogramme zeigen die Untersuchung der Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an der erythroiden Zelllinie K-562. Negativkontrollen sind als schwarze Linien dargestellt. (A, B, C, E) Die Antikörperklone 4B8, 4B9, 5D10 sowie anti-CD36 binden nicht an K-562. (G) SBA zeigt nur eine schwache Bindung an den Zellkulturzellen. (D, F, H) Die Antigene CD71, Glykophorin A und CD45 werden auf K-562 exprimiert.

Die Antikörper gegen CD71, Glykophorin A und CD45 zeigten erwartungsgemäß eine Bindung an K-562 (s. Abb.13D, 13F, 13H). Die Analyse von SBA zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle eine leichte Verschiebung der gesamten Zellpopulation, wobei nur etwa ein Drittel aller Zellen SBA-positiv war (s. Abb. 13G). Zusätzlich wurde auch die Expression von CD34, dem Stammzellmarker, untersucht. Antikörper, die dieses Antigen erkennen, haben nicht an K-562 gebunden (Daten nicht gezeigt). Die Antikörperklone 4B8, 4B9 und 5D10 sowie der Antikörper gegen CD36 haben nicht an K-562 gebunden (s. Abb.13A, 13B, 13C und 13E).

4.3.3.2 Erythroide Zelllinie KMOE-2

Die Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 wurde an der erythroiden Zelllinie KMOE-2 untersucht. Bei KMOE-2 handelt es sich um eine humane erythroide Zelllinie, die von einem Patienten mit akuter Erythrämie stammt (Okano et al., 1981). Bei dieser nach Art einer Leukämie verlaufenden Erkrankung kommt es besonders im Knochenmark zur symptomatischen Vermehrung reifer und unreifer roter Blutzellen. Es lassen sich atypische unreife Erythroblasten sowie Hämozytoblasten (primitive Erythroblasten aus der Embryonalphase) nachweisen. Es wurden Antikörper gegen die Antigene CD71, CD36, Glykophorin A, CD45, CD34 (nicht dargestellt) sowie die Bindung von SBA untersucht. Als Positivkontrolle für die Funktionalität der Antikörper wurden alle Antikörper parallel an MNCs aus Nabelschnurblut untersucht (nicht dargestellt). Die Ergebnisse werden in Abbildung 14 gezeigt.

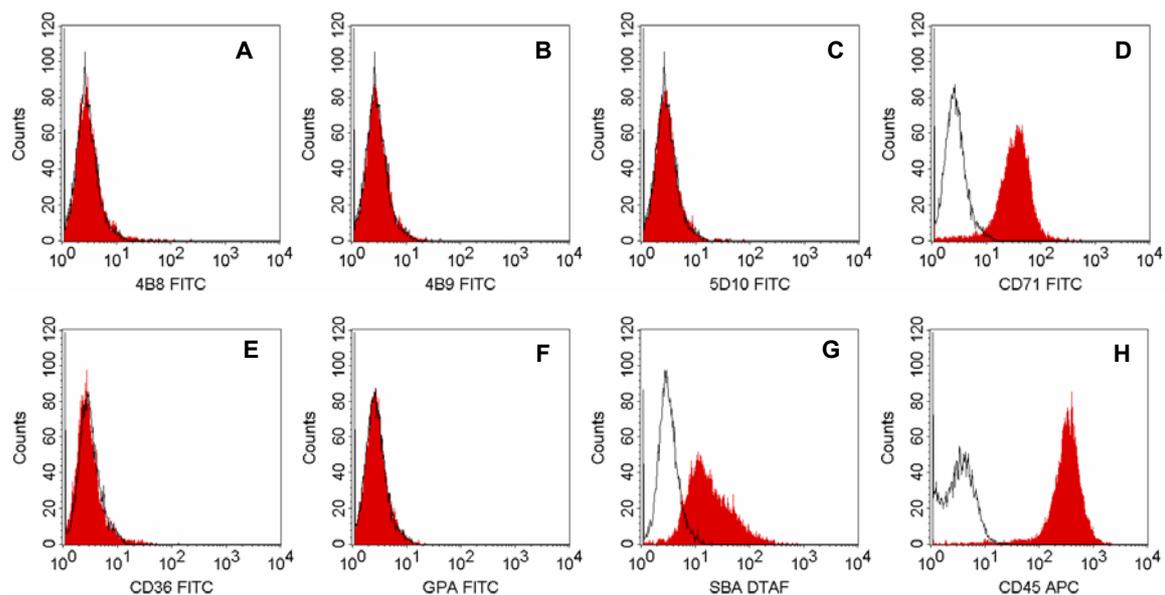


Abbildung 14: Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an KMOE-2

Die Histogramme zeigen Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen an KMOE-2 (rot). Negativkontrollen sind als schwarze Linie dargestellt. Es werden nur lebende Zellen gezeigt. **(A, B, C, E, F)** 4B8, 4B9, 5D10, anti-CD36 und anti-Glykophorin A haben keine Zellen gebunden. CD34 war ebenfalls negativ für diese Zelllinie (nicht dargestellt). **(D, G, H)** Anti-CD71, SBA und anti-CD45 zeigen eine Bindung an KMOE-2-Zellen.

Für anti-CD71, anti-CD45 und SBA war eine Bindung an KMOE-2 nachweisbar (s. Abb.14D, 14G, 14H). Anti-Glykophorin A, anti-CD36 und anti-CD34 (nicht dargestellt) zeigten keine Reaktion mit den KMOE-2-Zellen (s. Abb.14E und 14F). Die Zelllinie KMOE-2 war ebenfalls für 4B8, 4B9 und 5D10 negativ (s. Abb.14A, 14B und 14C).

4.3.4 Analyse einer kompetitiven Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10

Mit einem weiteren durchflusszytometrischen Ansatz wurde überprüft, ob die Antikörper 4B8, 4B9 und 5D10 möglicherweise das gleiche Antigen bzw. Epitop erkennen (s. 3.8.4). Für diesen Ansatz wurde sowohl unmarkierter als auch biotinylierter 4B8-Antikörper verwendet. Die Ergebnisse der Analyse von fünf verschiedenen Nabelschnurblutproben sind in Abbildung 15 exemplarisch dargestellt.

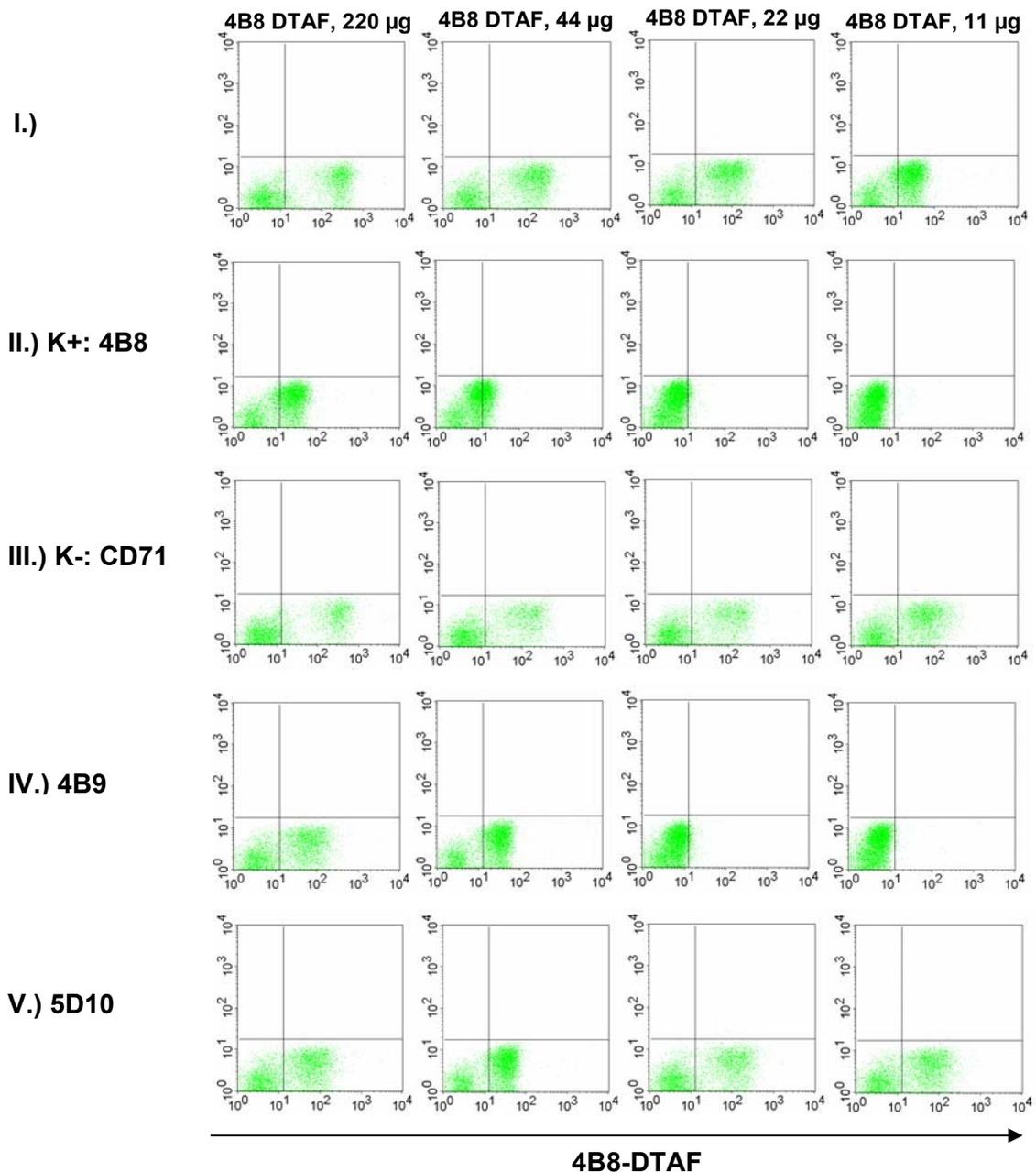


Abbildung 15: Kompetitive Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 zur Antigencharakterisierung

Die Punktdiagramme zeigen Immunfluoreszenzfärbungen mit 4B8 DTAF. In jeder Reihe ist die Färbung von 4B8 DTAF von links nach rechts in sinkender Konzentration [220 µg / mL, 44 µg / mL, 22 µg / mL / 11 µg / mL] zu sehen. Reihe I zeigt die Analyse der Einzelfärbung von 4B8 DTAF. Die Reihen II und III zeigen die Positivkontrolle (K+) und Negativkontrolle (K-) mit 4B8 bzw. anti-CD71, die zusammen mit 4B8 DTAF inkubiert wurden. Die Reihen IV und V zeigen die Analysen von Färbungen mit 4B9 und 5D10, die jeweils zur Untersuchung einer möglichen Konkurrenz zusammen mit 4B8 DTAF inkubiert wurden.

Reihe I zeigt eine Einzelfärbung von 4B8 DTAF in sinkender Antikörperkonzentration an MNCs aus Nabelschnurblut. Die Fluoreszenzintensität dieses 4B8-Signals diente den anderen Ansätzen als Referenz. Die Reihen II bis V zeigen die Positiv- und Negativkontrolle mit 4B8 bzw. anti-CD71, sowie die untersuchten Antikörper 4B9 und 5D10. Pro Spalte wurde 4B8 in sinkender Konzentration eingesetzt (s. Beschriftung über den Abbildungen).

Zur Kontrolle für die Konkurrenz wurden 4B8 (unmarkiert) und 4B8 Biotin / SA-DTAF zusammen inkubiert. Die Abbildungen der Reihe II zeigen, dass die Intensität des 4B8 DTAF-Signals mit steigender Verdünnung abnahm, so dass bei einer Antikörperkonzentration von 11 µg / mL keine Zellen mehr positiv waren. Im Vergleich dazu war das DTAF-Signal der Einzelfärbung bei 11 µg 4B8 DTAF noch positiv. Das Antigen CD71 wurde, wie unter 4.2.2 gezeigt, nicht von 4B8 gebunden. Aus diesem Grund diente ein Antikörper gegen CD71 als Negativkontrolle und wurde zusammen mit 4B8 Biotin / SA-DTAF inkubiert (Reihe III). Die anschließende Färbung von MNCs aus Nabelschnurblut zeigte, dass 4B8 DTAF nicht von anti-CD71 an der Bindung an Zielzellen gehindert wurde. Reihe IV zeigt die Ergebnisse der Inkubation von 4B9 mit 4B8 Biotin / SA-DTAF. In den ersten beiden Verdünnungsstufen (220 µg und 44 µg) war die Konzentration von 4B8 DTAF noch hoch genug, um Zellen zu binden. Die Fluoreszenzintensität war jedoch im Vergleich zu den entsprechenden Einzelfärbungen von 4B8 DTAF schon geringer. Bei Antikörperkonzentrationen von 22 µg / mL und 11 µg / mL war kein 4B8 DTAF-Signal mehr detektierbar. Eine gemeinsame Inkubation von 5D10 und 4B8-DTAF hatte keine Änderung des 4B8-Signals zur Folge (Reihe V).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass 4B8 und 4B9 das gleiche Antigen erkennen. 5D10 blieb bei Kombination mit 4B8 in seiner Bindungseigenschaft unbeeinflusst. Vermutlich handelt es sich bei dem 5D10-Antigen um eine andere Oberflächenstruktur. Weiterhin zeigt 4B8 keine Bindungsaffinität zum Epitop des anti-CD71-Klons.

4.4 Charakterisierung der Bindung von 4B9 und 5D10 an Zellen aus adulten Geweben

Die Antikörperklone 4B8, 4B9 und 5D10 wurden durch ihre Bindung an MNCs aus Nabelschnurblut selektioniert und anhand von adulten Erythrozyten sowie zwei erythroiden Zelllinien näher charakterisiert. Aufgrund der Tatsache, dass 4B8 und 4B9 das gleiche Antigen erkennen, wird für weitere Analysen nur noch einer der beiden Antikörper verwendet. Die Bindung der Antikörper 4B8 / 4B9 und 5D10 wurde wie folgt an MNCs aus adultem Blut und adultem Knochenmark untersucht.

4.4.1 Untersuchung der Bindung an MNCs aus adultem Blut

Es wurde die Bindung der entwickelten Antikörper an adulte Blutzellpopulationen untersucht. Dafür wurden mononukleäre Zellen von fünf gesunden Spendern mit 4B9 und 5D10 sowie anti-CD71, anti-CD36, anti-Glykophorin A und SBA gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte in Kombination mit Antikörpern gegen die Marker CD71 und CD45 sowie einer DNA-Färbung zur Identifizierung toter Zellen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind exemplarisch in Abbildung 16 dargestellt.

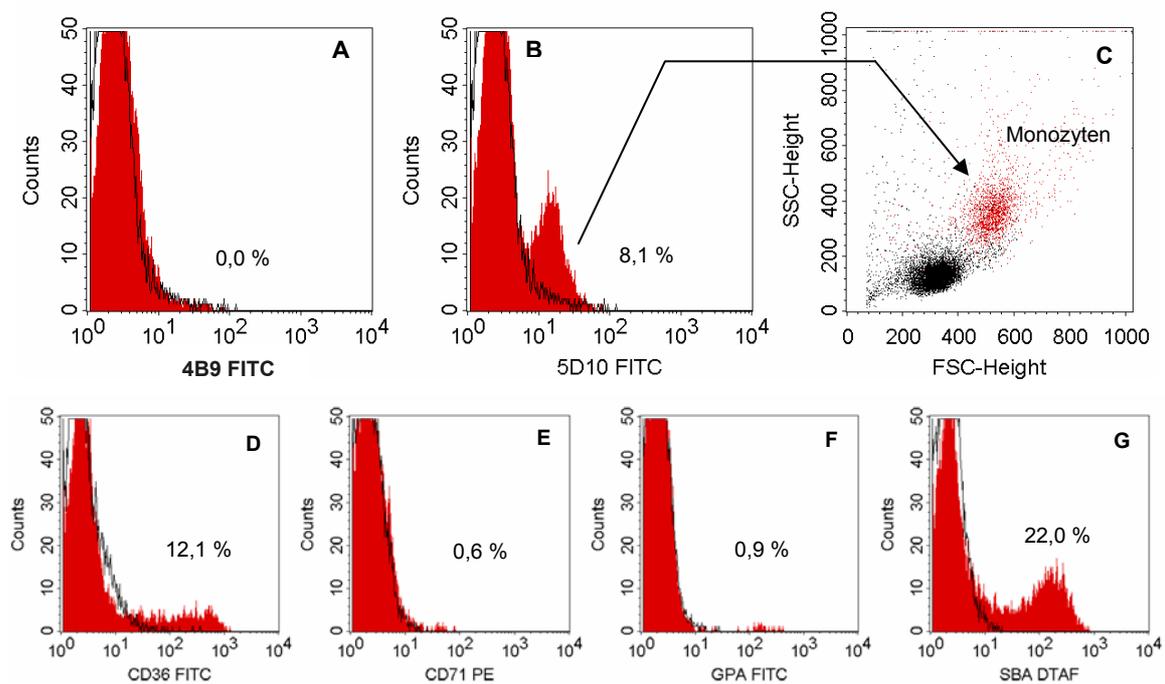


Abbildung 16: Analyse der Bindung von 4B9 und 5D10 an adulte Leukozyten

Diese Abbildungen zeigen Immunfluoreszenzfärbungen an adulten MNCs. Es werden nur lebende Zellen gezeigt. Die entsprechende Isotypkontrolle ist jeweils als schwarze Linie abgebildet. **(A)** 4B9 (rot dargestellt) bindet keine adultem Blutzellen. **(B)** 5D10-positive Population. **(C)** Das Streulichtbild zeigt, dass es sich bei den 5D10-positiven Zellen um Monozyten handelt (rot dargestellte Population). **(D – G)** Bindung der Antikörper gegen die Marker CD36, CD71 und GPA sowie die Bindung von SBA an membranständige Galaktose.

Der monoklonale Antikörper 4B9 hat keine adulten Blutzellen gebunden (s. Abb.16A). Der Zellkulturüberstand 5D10 dagegen zeigte eine Bindung an ca. 8 % der analysierten Zellen, die sich von den negativen Zellen der Isotypkontrolle absetzten (s. Abb.16B). Bei der Betrachtung von 5D10 im Streulichtbild zeigte sich, dass es sich bei den adulten Zellen um Monozyten handelte (Abbildung 16C, rote Population). 5D10 war in allen fünf untersuchten adulten Blutproben positiv für Monozyten und bindet somit nicht ausschließlich fetale erythroide Zellen. Die zur Kontrolle der Bindung der entwickelten Antikörper mitgeführten Vergleichsantikörper anti-CD71, anti-CD36 und anti-Glykophorin A sowie Galaktose-spezifisches SBA sind in den Abbildungen 16D – 16G dargestellt. Für CD71 waren nur 0,6 % positive Zellen nachweisbar. Dagegen wurden ca. 12 % CD36-positive Zellen nachgewiesen. Dabei handelte es sich um Monozyten und Thrombozyten. Den Marker GPA exprimierten ca. 0,9 % der Zellen, bei denen es sich um Erythrozyten und Retikulozyten handeln muss, da im adulten Blut gesunder Spender keine erythroiden Vorläuferzellen nachweisbar sind. SBA hat ca. 22 % der adulten MNCs gebunden. Dabei handelte es sich um Monozyten und wenige Erythrozyten. Die Werte aus Messungen an vier adulten Blutproben sind in der folgenden Graphik (s. Abb.17) dargestellt.

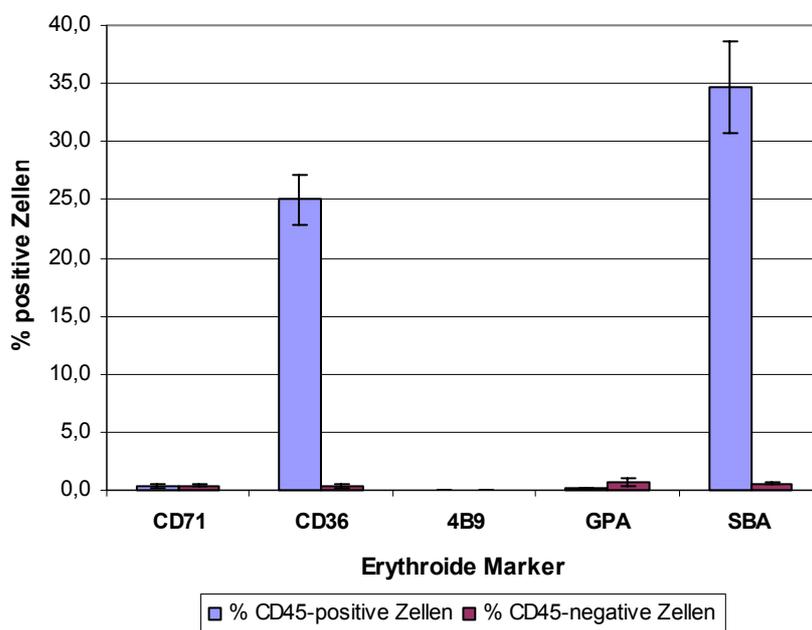


Abbildung 17: Expression erythroider Marker auf vitalen MNCs aus adultem Blut.

Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der Bindung bekannter Marker an mononukleäre Zellen aus adultem Blut. Dargestellt ist der Mittelwert aus $n=4$ Proben. Es wurde die Expression der Marker CD71, CD36, 4B9, GPA und die Bindung von SBA untersucht.

Anti-CD36 und SBA haben durchschnittlich 25,4 % bzw. 35,2 % der Blutzellen (Monozyten, Thrombozyten, Erythrozyten und Retikulozyten) gebunden, von denen 25,1 % bzw. 34,6 % der Zellen CD45-positiv waren. Der CD71-Antikörper hat insgesamt nur 0,7 % der lebenden Zellen gebunden. Glykophorin A wurde auf ca. 0,8 % der analysierten Zellen exprimiert. Es handelte sich dabei wahrscheinlich um nach MNC-

Isolierung verbliebene Erythrozyten und Retikulozyten. Der neue Antikörper 4B9 hat keine Zellen aus adultem Blut gebunden.

4.4.2 Überprüfung der Bindung an Zellen aus adultem Knochenmark

Zur Überprüfung der Bindung von 4B9 und 5D10 an adulte erythroide oder myeloide Vorläuferzellen, wurden mononukleäre Zellen aus fünf Knochenmarkproben gesunder Spender mit 4B9 untersucht. Zum Vergleich wurden Antikörper gegen die Marker CD71, CD36 und Glykophorin A sowie membranständige Galaktose durch die Bindung von SBA untersucht. An MNCs aus Knochenmark wurde zusätzlich die Expression des Stammzellmarkers CD34 untersucht.

4.4.2.1 Charakterisierung von adultem Knochenmark mittels bekannter Marker und dem 4B9-Antigen

Die Analyse der Bildung bekannter erythroider Marker sowie 4B9 und 5D10 erfolgte in Kombination mit anti-CD71, anti-CD45 und dem Farbstoff 7-AAD. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 18 exemplarisch dargestellt.

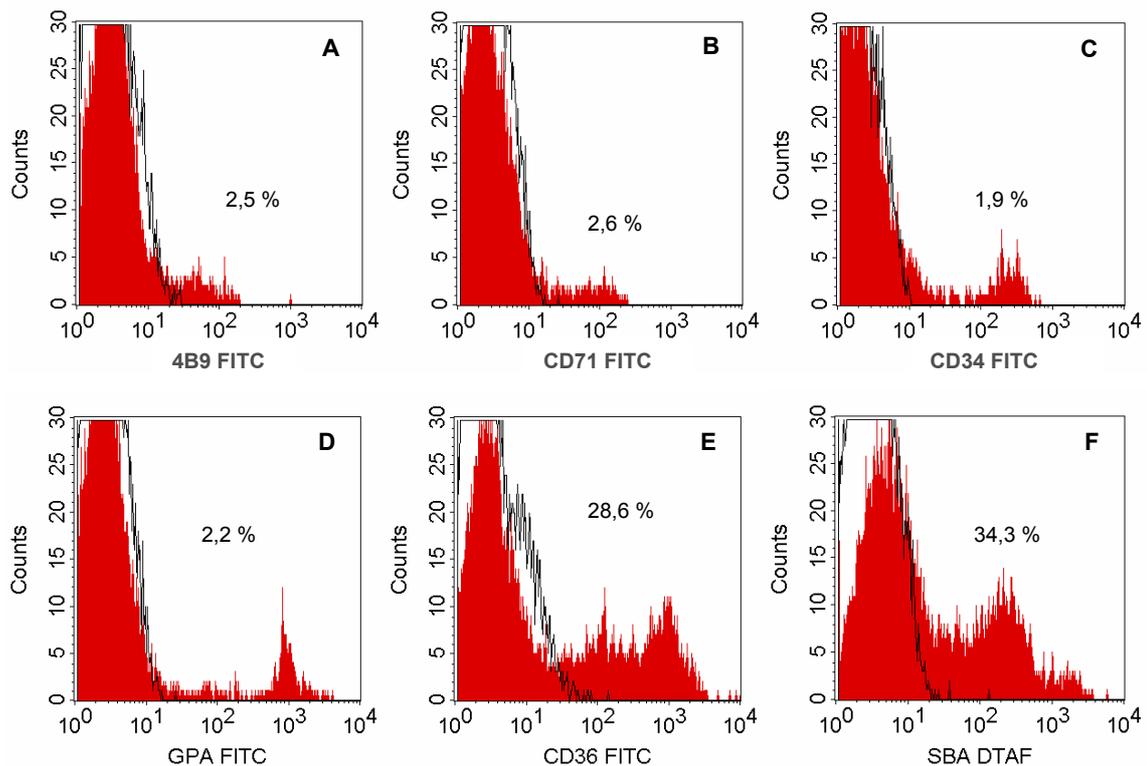


Abbildung 18: Bindung von 4B9 an Knochenmarkzellen

Die Histogramme zeigen die Bindung von 4B9 im Vergleich zur Bindung von Antikörpern gegen CD34, CD71, Glykophorin A, CD36 und zur Bindung von Galaktose-spezifischem SBA an adulte Knochenmarkzellen. Es werden nur lebende Zellen dargestellt. Die entsprechenden Isotypkontrollen sind als schwarze Linien dargestellt. **(A – C)** Bindung von 4B9, anti-CD71 und anti-CD34 an MNCs aus Knochenmark. **(D – F)** Die Marker CD36, Glykophorin A und Galaktose-spezifisches SBA sind auf MNCs in adultem Knochenmark nachweisbar.

In dieser Probe wurden 2,5 % der adulten Knochenmarkszellen von 4B9 gebunden. Die hier gezeigte Bindung von 4B9 konnte auch bei drei weiteren Knochenmarkproben nachgewiesen werden, womit 4 von 5 Proben (80 %) 4B9-positiv waren. Der zum Vergleich dienende Nachweis der Marker CD71, CD34, CD36, Glykophorin A und Galaktose zeigten ebenfalls eine Expression auf adulten Knochenmarkszellen. Die Expression von CD34, CD36, GPA, CD71, Galaktose und 4B9 wurde an fünf Knochenmarkproben gesunder Spender untersucht und die erhaltenen Werte gemittelt (s. Abb.19).

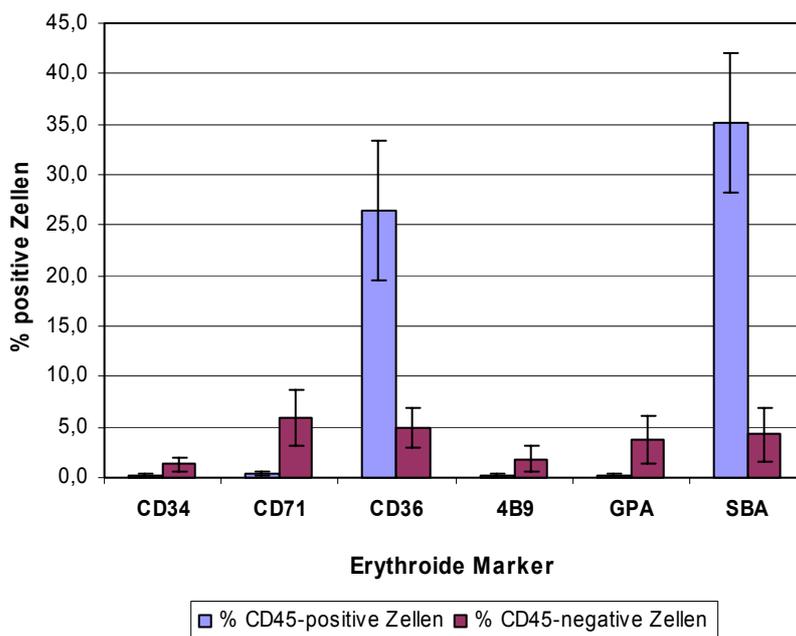


Abbildung 19: Expression erythroider Marker auf MNCs aus adultem Knochenmark

Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der Bindung erythroider Marker an mononukleäre Zellen aus Knochenmark. Dargestellt ist die Mittelwertbildung der Bindung an Zellen aus 5 Proben. Es wurden die Marker CD71, CD36, 4B9, GPA und das Lektin SBA bzw. dessen Bindung an membranständige Galaktose nachgewiesen.

Der CD36-Antikörper und SBA haben durchschnittlich 31 % bzw. 39 % der Knochenmarkszellen gebunden. Davon waren für den Marker CD36 etwa 26,5 % der Zellen und bei SBA ca. 35% der Zellen Monozyten. Etwa 4,9 % der CD36-positiven und 5,2 % der SBA-positiven Zellen waren erythroiden Ursprungs. Anti-CD34 hat nur 0,15 % der CD45-positiven, wahrscheinlich durch unspezifische Bindung an verbliebene tote Zellen, aber ca. 1,3 % der CD45-negativen Zellen, wahrscheinlich Stammzellen, gebunden. Der CD71-Antikörper hat ca. 6,4 % aller lebenden Zellen gebunden. Davon waren 0,4 % CD45-positiv, wahrscheinlich aktivierte oder proliferierende Zellen, und ca. 6 % waren CD45-negative erythroide Vorläuferzellen. Etwa 4 % der Knochenmarkszellen waren erythroide Zellen, die über GPA nachgewiesen wurden. Der neue Antikörper 4B9 hat im Durchschnitt 1,9 % der Zellen gebunden. Bezogen auf den durchschnittlichen Anteil CD71-, CD36- und GPA-positiver Erythroblasten im Knochenmark (4,8 %), waren ca. 40 % aller erythroiden Zellen 4B9-positiv.

4.4.2.2 Charakterisierung 4B9-positiver Knochenmarkzellen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass 4B9 Zellen aus gesundem adulten Knochenmark erkannt hat. Um welche Zellen es sich bei den 4B9-positiven Zellen handelte, wird in Abbildung 20 veranschaulicht.

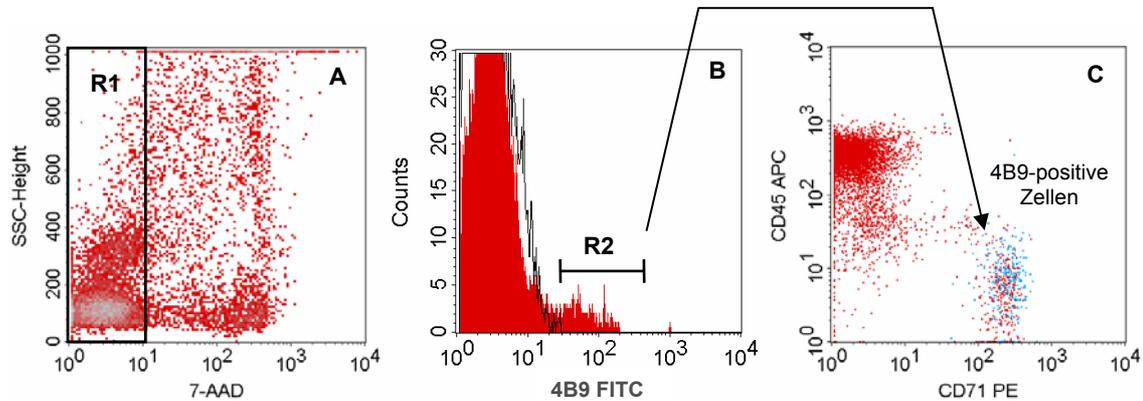


Abbildung 20: Analyse der in adultem Knochenmark 4B9-positiven Population

(A) Ausschluss 7-AAD-positiver toter Zellen durch Anlegen von Region R1. In B und C wurde die Region R1 angelegt, d.h. es wurden nur lebende Zellen betrachtet. (B) 4B9-positiv, lebende Zellen (R2), die wiederum in (C) blau dargestellt sind. Hier sind die Daten der Marker CD45 und CD71 gegeneinander aufgetragen.

Zur Analyse der 4B9-positiven Population wurden 7-AAD-positive tote Zellen ausgeschlossen (s. Abb.20A). Das Histogramm zeigt eine Färbung mit 4B9 an adulten Knochenmarkzellen. Die 4B9-positiven Zellen sind in der Abbildung 20C, in der die Marker CD45 und CD71 gegeneinander aufgetragen sind, dargestellt. 4B9 bindet hauptsächlich CD71-positive erythroide Vorläuferzellen in adultem Knochenmark.

4.4.2.3 Mikroskopische Analyse adulter Knochenmarkzellen

Für Immunfluoreszenzfärbungen von Knochenmarkausstrichen gesunder Spender wurden anti-Glykophorin A, unverdünnter 4B9-Zellkulturüberstand und eine Kernfärbung (DAPI) miteinander kombiniert. Für immunzytochemische Färbungen mit APAAP wurden das 4B9-Antigen sowie Glykophorin A nachgewiesen. Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaun blau gefärbt. Ergebnisse von immunzytochemischen Färbungen sind in Abbildung 21 beispielhaft dargestellt.

Alle Abbildungen zeigen APAAP-gefärbte adulte Knochenmarkzellen gesunder Spender. Entsprechend mitgeführte Maus IgG bzw. IgM Isotypkontrollen waren negativ (Daten nicht gezeigt) Die Positivkontrolle anti-Glykophorin A ermöglichte die Detektion erythroider Zellen, wobei zwischen kernhaltigen Vorläuferzellen (durchgezogener Pfeil) und reifen Erythrozyten (gestrichelte Pfeile) unterschieden werden konnte (s. Abb.21A, 21B).

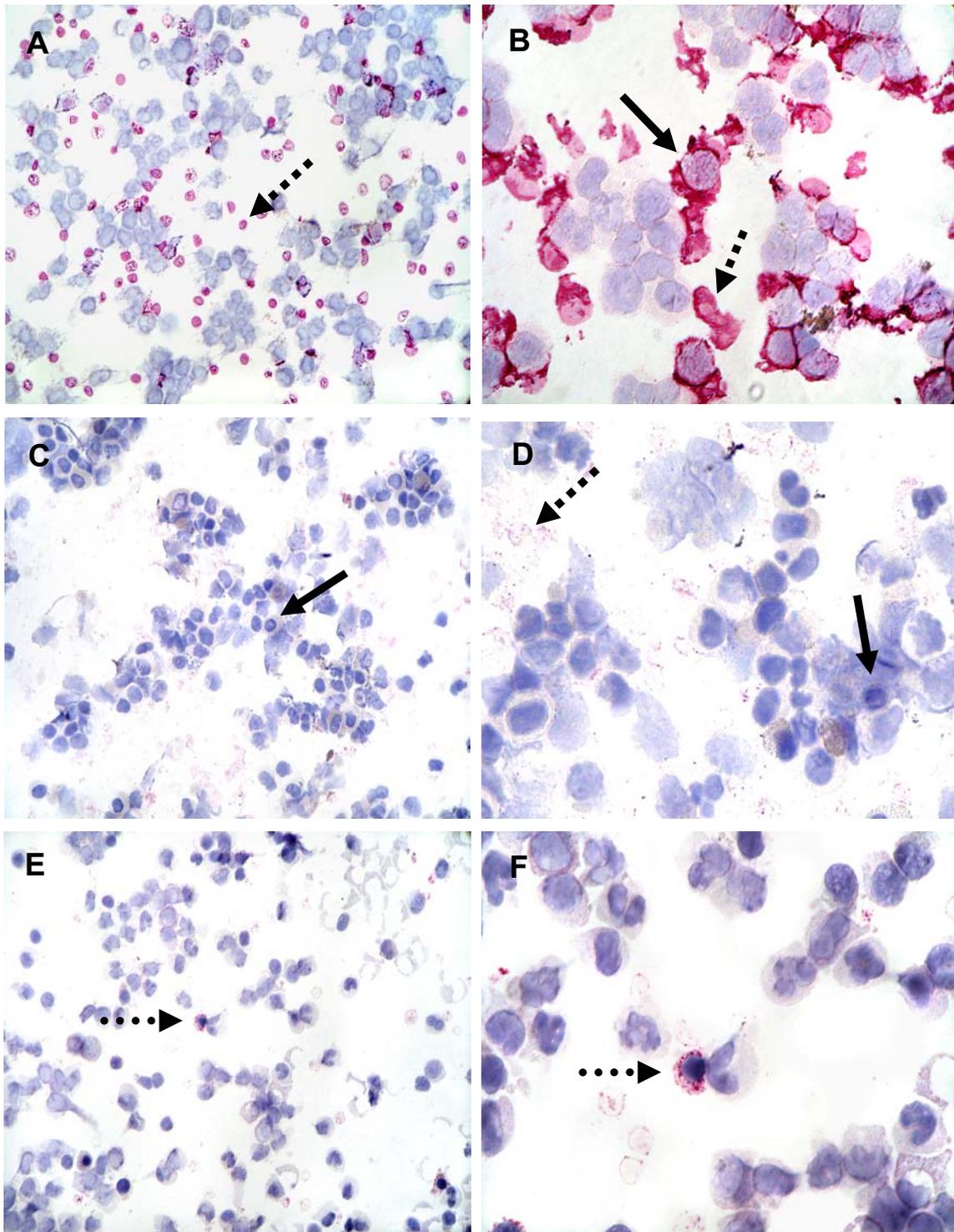


Abbildung 21: Immunzytochemische Analyse von 4B9 an adulten Knochenmarkzellen

Bei den immunzytochemischen Analysen handelt es sich um APAAP-Färbungen (rot) mit 4B9 und anti-Glykophorin A an adulten Knochenmarkausstrichen. Die Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaun (blau) gefärbt. Die gestrichelten Pfeile deuten auf kernlose Erythrozyten oder Retikulozyten, die durchgezogenen Pfeile deuten auf kernhaltige Erythroblasten.

(A) (200 x), (B) (400 x) NRBCs und reife Erythrozyten bzw. Retikulozyten positiv für den Marker Glykophorin A (rote Färbung). (C) (200 x), (D) (400 x) 4B9-Zellkulturüberstand ist negativ für adulte erythroide Knochenmarkzellen und Leukozyten. (E) (200 x), (F) (400 x) zeigen eine Reaktion für 4B9 an adulten Knochenmarkzellen. In der Bildmitte ist eine 4B9-positive Zelle mit einer zytoplasmatischen Färbung zu sehen.

Wie in den Abbildungen 21C und 21D zu sehen ist, hat der unverdünnt eingesetzte Zellkulturüberstand 4B9 in dieser Knochenmarkprobe weder Erythrozyten oder Retikulozyten (gestrichelter Pfeile), noch NRBCs (durchgezogener Pfeil) erkannt. Auch Monozyten und Granulozyten, größere Zellen, die einen helleren Zellkern aufwiesen, exprimierten das 4B9-Antigen nicht (s. Abb.21C). Die Abbildungen 21E und 21F dagegen zeigen beispielhaft, dass vereinzelt eine granuläre Expression im Zytoplasma einiger Zellen nachweisbar war (gepunktete Pfeile). Dabei handelte es sich um frühe erythroide Vorläuferstadien, so genannte Makroblasten oder basophile Erythroblasten, die vom Proerythroblasten abstammen. Aber auch kleinere Zellen mit dunklem Kern, die als späte Erythroblastenstadien (Normoblasten) identifiziert wurden, haben 4B9 schwach gebunden (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich dazu waren in den gleichen Probanden alle erythroiden Zellen für den Kontrollantikörper Glykophorin A stark positiv (s. Abb.21A, 21B).

Die mikroskopische Untersuchung adulter Knochenmarkzellen zeigte bei 97 % der analysierten Proben (31 / 32) keine Reaktion für 4B9. In einer der untersuchten Proben (3 %) wurde eine Expression von 4B9 an ca. 5 – 10% der Erythroblasten nachgewiesen. Dabei handelte es sich allerdings nicht um die Bindung an membranständige Antigene, sondern um eine Bindung an zytoplasmatische Strukturen verschiedener Erythroblastenstadien. Zellen der myeloopoetischen Entwicklungsreihe exprimierten das 4B9-Antigen nicht.

4.4.3 Untersuchung von adultem hämolymphatischem Gewebe

Zur Überprüfung einer Bindung von 4B9 an adulte Zellen lymphatischen Ursprungs wurden Gefrierschnitte von Lymphknotengewebe immunhistochemisch (APAAP) untersucht. Es wurden 4B9 sowie eine entsprechende Isotypkontrolle analysiert. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gefärbt. An Zellen aus lymphatischen Geweben wurde keine Reaktion des monoklonalen Antikörpers 4B9 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

4.5 Vergleich der 4B9-Expression auf Zellen aus Nabelschnurblut und adultem Blut

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bildung des 4B9-Antigens sind im Vergleich zur Expression der Marker CD71, CD36, GPA, CD34 und Galaktose, die durch SBA nachgewiesen wird, als Übersicht in Abbildung 22 dargestellt.

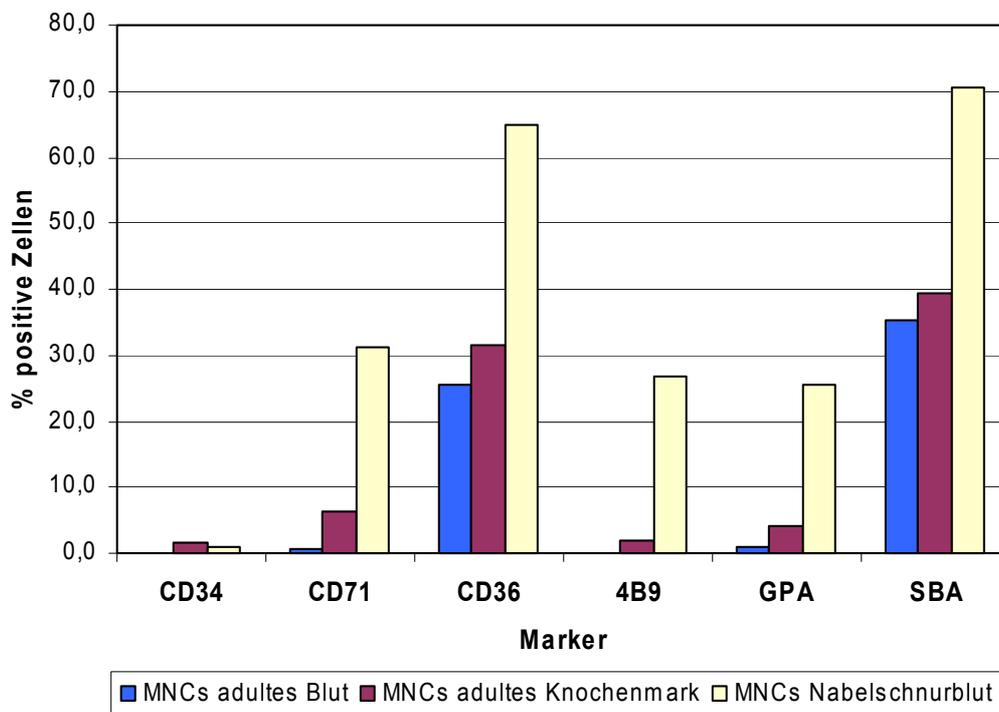


Abbildung 22: Vergleich der Bindung erythroider Marker auf fetalen und adulten Zellen

In dieser Graphik ist die Expression der Oberflächenmarker CD34, CD71, CD36, GPA, des 4B9-Antigens und von Galaktose (gebunden durch SBA) an Zellen aus Nabelschnurblut, adultem Blut und adultem Knochenmark im Vergleich dargestellt. Gezeigt wird der prozentuale Anteil positiver Zellen (Mittelwert) pro Marker im entsprechenden Blutgewebe.

CD71 und Glykophorin A haben im Durchschnitt etwa die gleiche Anzahl an Zellen in Nabelschnurblut gebunden wie 4B9 (ca. 25,2 – 30,5 %). In adultem Knochenmark wurden die Marker CD71 und GPA auf 3,8 – 5,9 % der Zellen exprimiert, für das 4B9-Antigen konnte nur auf ca. 1,8 % der Zellen eine Expression nachgewiesen werden. Die Analysen von Zellen aus adultem Blut dagegen zeigten, dass CD71 und GPA nur auf ca. 0,4 - 0,7 % der Zellen nachweisbar waren, das 4B9-Antigen dagegen auf keinen Zellen aus adultem peripherem Blut gebildet wurde. Anti-CD36 und SBA haben sowohl in Nabelschnurblut als auch in adultem Blut bzw. Knochenmark zusätzlich zu erythroiden Vorläuferzellen die Leukozytensubpopulation der Monozyten gebunden.

Das 4B9-Antigen war, im Gegensatz zur Expression der bekannten Marker, vorrangig auf NRBCs in Nabelschnurblut, nur auf wenigen NRBCs im adulten Knochenmark und auf keinen Zellen in adultem Blut nachweisbar.

4.6 Charakterisierung der Bindung von 4B9 an Zellen aus fetalen Geweben

Nach der Überprüfung der Bindungseigenschaften von 4B8 bzw. 4B9 und 5D10 an Zellen adulter Gewebe, wurde zur weiteren Charakterisierung nur noch der 4B9-Zellkulturüberstand an fetalen Geweben untersucht, da es sich bei 5D10 nicht um einen Antikörperklon handelte, der ausschließlich fetale erythroide Zellen erkennt.

Es standen Präparate von fetaler Leber, fetalem Knochenmark und fetalem Blut aus Feten der 6., 8., 20. und 30. SSW sowie Nabelschnurblut aus der 38. – 40. SSW zur Verfügung. Anhand von Zellen dieser Gewebe sollte überprüft werden, in welcher Phase der fetalen Erythropoese erythroide Zellen durch 4B9 erkannt werden. Außerdem wurde das 4B9-Antigen im Vergleich zu den bekannten Antikörpern an Nabelschnurblut untersucht.

4.6.1 Nachweis der Bindung von 4B9 an embryonale Zellen aus Dottersackgewebe

Die embryonale Blutbildung beginnt mit der Entstehung von Hämangioblasten (15. – 18. Tag), deren Tochterzellen zu Hämozytoblasten, den Stammzellen des Blutes und zu Angioblasten (Endothelzellen) differenzieren. Die Expression des 4B9-Antigens wurde mittels histochemischer Färbung an Gefrierschnitten von Dottersack-Präparaten der 6. und 8. Woche untersucht. Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaun blau gefärbt (s. Abb.23).

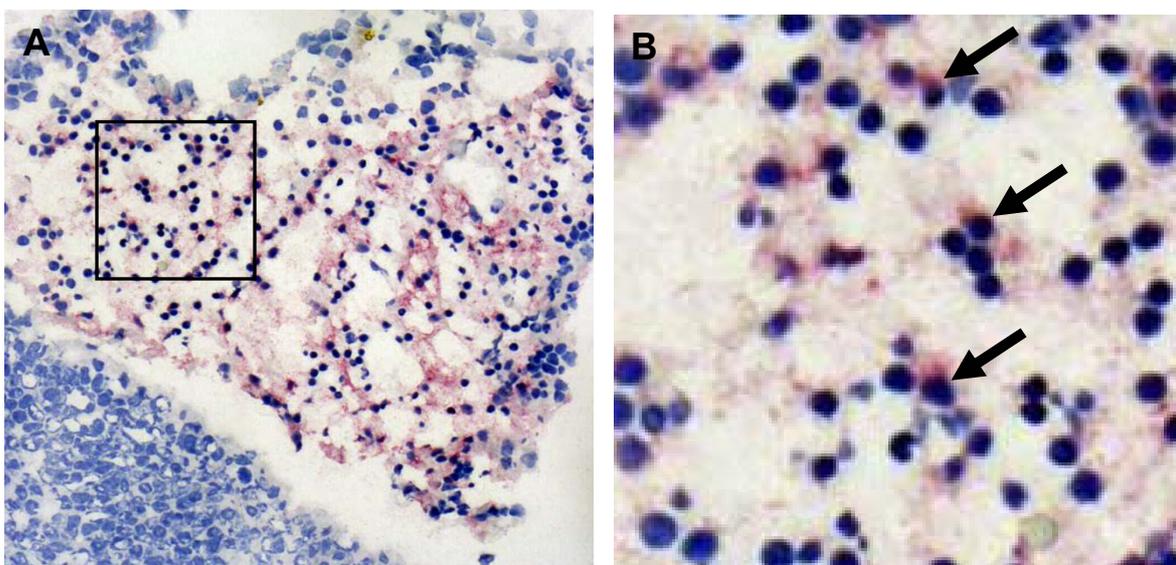


Abbildung 23: 4B9-Expression in einer Blutinsel auf dem Dottersack

(A) Extraembryonale Entwicklung einer Blutinsel (100x). Zentral sind 4B9-positive primitive Erythroblasten (rot) nachweisbar. In der unteren linken Bildecke befinden sich kernhaltige, 4B9-negative, undifferenzierte Mesenchymzellen. (B) Vergrößerter Bildausschnitt, der 4B9-positive Erythroblasten zeigt (Pfeile).

Die Abbildungen zeigen Blut bildendes Gewebe auf dem Dottersack. Aufgrund der Qualität des Gefrierschnittes sind nicht alle zellulären Strukturen eindeutig identifizierbar. Abbildung 23A zeigt 4B9-positive Zellen im Zentrum einer Blutinsel. Dabei handelt es sich um embryonale primitive Erythroblasten. Bei den 4B9-negativen Zellen in der linken Bildecke handelt es sich um undifferenzierte Mesenchymzellen. Auf dem vergrößerten Bildausschnitt sind 4B9-positive Erythroblasten zu sehen (s. Abb.23B). In der unteren, linken Bildecke befinden sich größere, kernhaltige Zellen, die das 4B9-Antigen nicht exprimieren. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Hämoytoblasten. Embryonale Erythroblasten waren im Blut bildenden Gewebe des Dottersacks aller Präparate 4B9-positiv.

4.6.2 Untersuchung der 4B9-Expression auf Zellen aus fetaler Leber

Ab der 4. SSW, d.h. im Anschluss an die frühe außerembryonale Blutbildung im Dottersack, findet die Blutbildung in der fetalen Leber und der fetalen Milz statt. Zur Untersuchung einer frühen Expression des 4B9-Antigens in der Fetalentwicklung wurden Blutzellen fetaler Leberpräparate der 6., 8., 20. und 30. Schwangerschaftswochen analysiert. Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen und immunhistochemische Färbungen (APAAP) an Gefrierschnitten durchgeführt. Für die Immunhistochemie wurden 4B9 und anti-Glykophorin A gefärbt. Für die Immunfluoreszenz wurden einerseits 4B9 (Alexa 594, rote Fluoreszenz), anti-Glykophorin A (Alexa 488, grüne Fluoreszenz) und eine DNA-Färbung (DAPI, blaue Fluoreszenz) miteinander kombiniert. Zusätzlich wurden Präparate mit 4B9 (Alexa 594), anti-Albumin (Alexa 488) und einer DNA-Färbung untersucht. Mit Hilfe der Albumin-Färbung wurden Hepatozyten (Leberzellen) nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung beispielhaft aufgeführt (s. Abb.24).

Die Abbildung zeigt Zellen von Gefrierschnitten fetaler Leber der 20. und 30. SSW. Abbildung 24A zeigt Zellen fetaler Leber aus der 20. SSW. Hier war eine Reaktion von anti-GPA (rot) mit Zellen, die einen dunkelblau gefärbten Zellkern besitzen, zu erkennen. Zellen mit hellem Kern exprimierten das 4B9-Antigen nicht. Bei Ansammlungen GPA-positiver Zellen handelt es sich um Blutbildungsherde mit erythroiden Vorläuferzellen, die GPA-negativen Bereiche werden von Leberzellen gebildet. Abbildung 24B zeigt einen Gefrierschnitt fetaler Leber der 20. SSW. Die Untersuchungen zeigten, dass 4B9-positive kernhaltige Zellen (rot) auch den erythroiden Marker Glykophorin A exprimierten (grün; durchgezogener Pfeil). Weiterhin wurden kernhaltige Zellen nachgewiesen, die keines der beiden Antigene tragen (gestrichelter Pfeil). Bei diesen Zellen handelt es sich um Leberzellen (Hepatozyten), wie in den Abbildungen 24C und 24D zu erkennen ist. Fetale Erythroblasten waren in allen untersuchten Präparaten der verschiedenen Schwangerschaftswochen 4B9-positiv (Daten der 6. und 8. SSW nicht gezeigt).

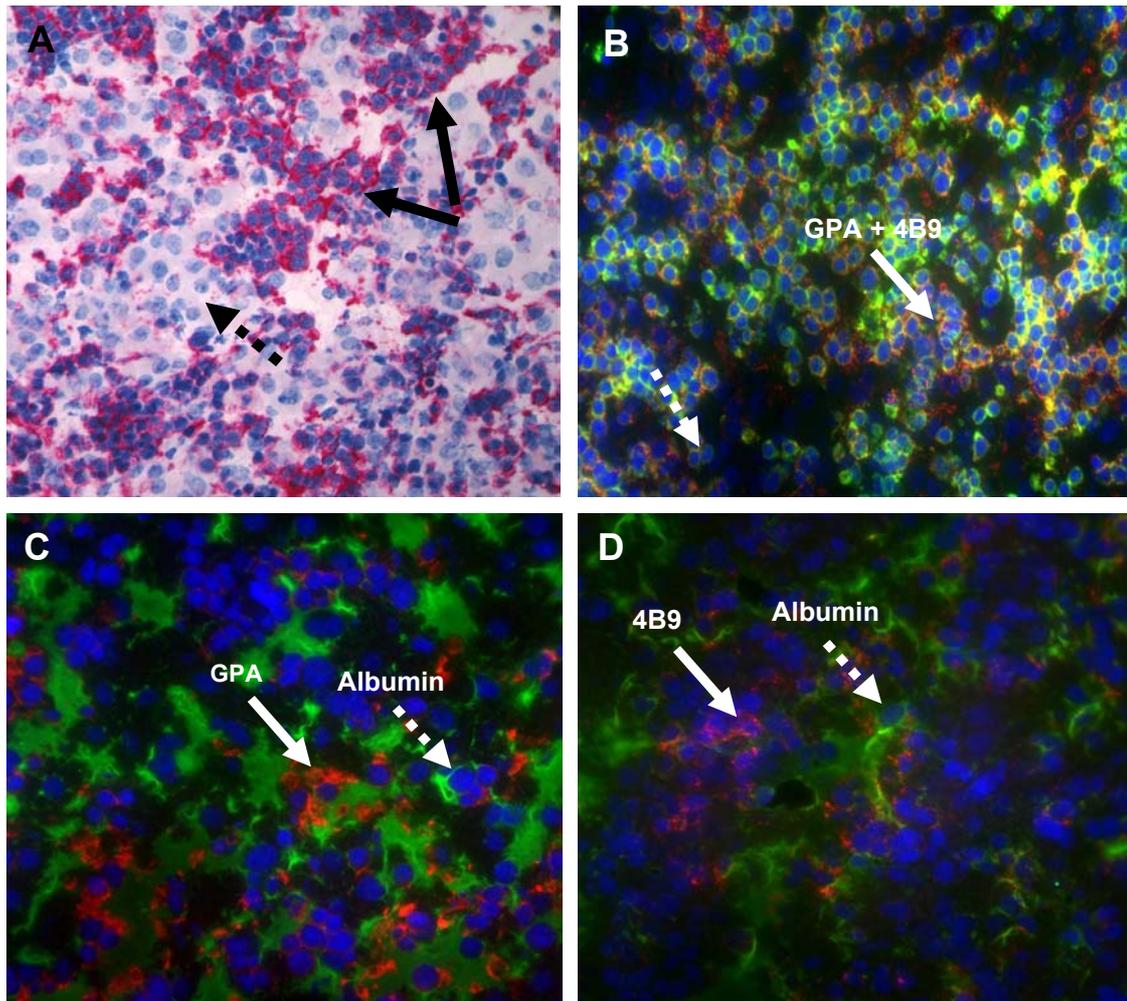


Abbildung 24: Bindung von 4B9 an NRBCs aus fetaler Leber

Immunhistochemische Färbung (A: 20. SSW, 40 x) und Immunfluoreszenzfärbungen (B: 20. SSW, 40 x; C und D: 30. SSW, 40 x) an Gefrierschnitten fetaler Leber. **(A)** Anti-GPA (rot) und Zellkern (blau). Durchgezogene Pfeile deuten auf Ansammlungen kernhaltiger erythroider Zellen, die GPA-positiv sind (Blutbildungsherde in der Leber). Der gestrichelte Pfeil deutet auf einen Bereich mit Hepatozyten (Leberzellen). **(B)** Der durchgezogene Pfeil markiert positive Zellen für anti-GPA (grün), 4B9 (rot) und DAPI (blau). Der gestrichelte Pfeil deutet auf einen Bereich mit Hepatozyten, die keinen der beiden Marker exprimiert. **(C)** GPA (rot), anti-Albumin (grün) und Zellkern (blau). **(D)** 4B9 (rot), anti-Albumin (grün) und Zellkern (blau). Mit Hilfe des Nachweises von Albumin lassen sich 4B9-positive bzw. GPA-positive erythroide Zellen und albuminhaltige Hepatozyten differenzieren.

4.6.3 Bindung von 4B9 an fetale Knochenmarkszellen

Die hepatolienale Blutbildung (in Leber und Milz) und die Entwicklung fetaler erythroider Zellen im Knochenmark finden etwa ab der 18. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt parallel statt, wobei die Erythropoese im Knochenmark schon ab der 10. SSW beginnt. Die Knochenmarksausstriche wurden immunzytologisch (APAAP) mit unverdünntem 4B9-Zellkulturüberstand und anti-Glykophorin A gefärbt. Zellkerne wurden im Anschluss an die Antikörperfärbung mit Hämalaun blau gefärbt. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 25 dargestellt.

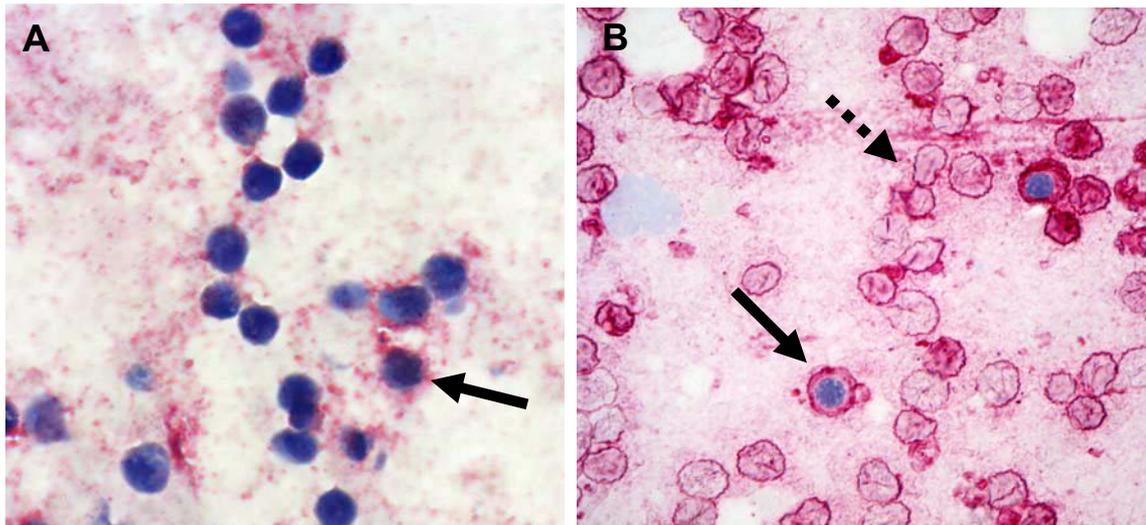


Abbildung 25: Bindung von 4B9 an Zellen fetalen Knochenmarks

Immunzytochemische Färbung und Immunfluoreszenzfärbung von fetalen Knochenmarkszellen aus der 20. SSW. **(A)** 4B9-positiver orthochromatischer Erythroblast und kernloser Erythrozyt (100 x). **(B)** Glykophorin A an kernhaltigen erythroiden Vorläuferstadien (durchgezogener Pfeil) und kernlosen Erythrozyten (gestrichelter Pfeil, 100 x).

Die Bildausschnitte zeigen hauptsächlich erythroide kernhaltige Zellen (dunkelblau gefärbte Kerne) sowie wenige Leukozyten (hellblau gefärbte Kerne) in fetalem Knochenmarksgewebe aus der 20. SSW. 4B9 reagiert mit erythroiden NRBCs (s. Abb.25A, durchgezogener Pfeil). Größere Zellen mit hellerem Zellkern, Leukozyten, waren negativ für das 4B9-Antigen. Der als Positivkontrolle für erythroide Zellen dienende Antikörper gegen Glykophorin A hat die gleichen Zellen gebunden wie 4B9, d.h. frühe Erythroblastenstadien sowie reife kernlose Erythrozyten (s. Abb.25B). Die Expression von 4B9 auf der Zelloberfläche findet nur partiell statt und erscheint körnig bzw. punktiert. Die Expression von GPA dagegen ist vergleichsweise stärker und gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt. Die entsprechenden Isotypkontrollen waren negativ (nicht dargestellt).

4.6.4 Untersuchung der 4B9-Expression auf Zellen aus fetalem Blut

Zur weiteren Charakterisierung der Expression des 4B9-Antigens wurde auch fetales Blut verschiedener Schwangerschaftswochen untersucht. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden 4B9 (Alexa 594, rote Fluoreszenz), anti-Glykophorin A (Alexa Fluor 488, grüne Fluoreszenz) und eine DNA-Färbung (DAPI) miteinander kombiniert. Entsprechende Isotypantikörper wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Die immunzytologischen Färbungen an Blutausstrichen wurden mit APAAP angefertigt. Die Ergebnisse der Untersuchung von 14 Proben sind exemplarisch in Abbildung 26 dargestellt.

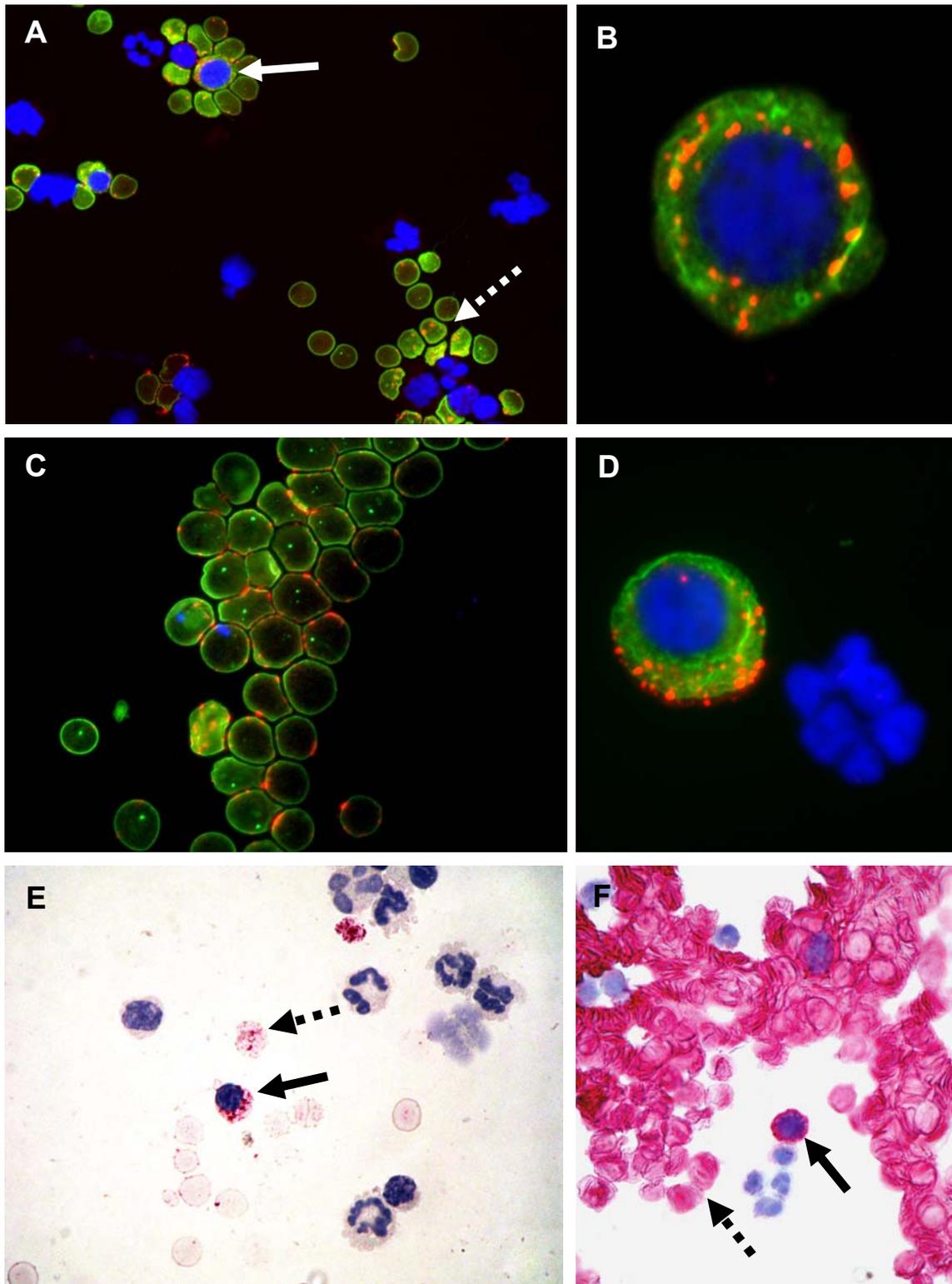


Abbildung 26: Analyse von Zellen aus fetalem peripherem Blut

Die Abbildungen zeigen Immunfluoreszenzfärbungen (A – D) und immunzytochemische Färbungen (E und F) von Zellen aus fetalem Blut. (A) (100 x) und (C) (400 x, Ausschnittvergrößerung) zeigen vorrangig GPA-positive kernlose Erythrozyten und Retikulozyten (grüne Fluoreszenz, gestrichelte Pfeile). Die meisten der GPA-positiven Zellen sind auch 4B9-positiv (rote Fluoreszenz). In A) sind zusätzlich kernhaltige DAPI-positive Zellen (blaue Fluoreszenz) zu sehen, von denen zwei Zellen GPA und 4B9 exprimieren (durchgezogener Pfeil). (B) und (D) GPA- und 4B9-positiv kernhaltige erythroide Vorläuferzellen (Ausschnittvergrößerungen aus 100 x). (E) Immunzytologische Färbung mit 4B9 (200 x). Kernlose Erythrozyten und kernhaltige erythroide Vorläuferzellen sind 4B9-positiv. (F) Färbung mit anti-GPA (200 x). Sowohl kernlose Erythrozyten als auch kernhaltige erythroide Zellen sind GPA-positiv.

Die Abbildungen zeigen Immunfluoreszenz- und immunzytochemische Färbungen von 4B9 und anti-GPA an Ausstrichen mit fetalen Blutzellen. Entsprechende Isotypkontrollen waren negativ (nicht dargestellt). Die Abbildungen 26A – 26D zeigen, dass anti-GPA und 4B9 größtenteils auf den gleichen Zellen exprimiert wurden. Dabei handelte es sich um kernlose Erythrozyten und Retikulozyten (gestrichelte Pfeile, Abb. 26A und 26C) sowie um kernhaltige erythroide Vorläuferzellen (durchgezogener Pfeil, Abb. 26A, 26B und 26D). In Abbildung 26C konnten Retikulozyten anhand von DNA- bzw. Kernresten (blau) von Erythrozyten unterschieden werden. In Abbildung 26A wurden auch DAPI-positive, also kernhaltige Zellen nachgewiesen, die weder das 4B9-Antigen noch Glykophorin A tragen. Dabei handelt es sich um Leukozyten, die anhand der Fluoreszenzfärbung nicht eindeutig identifiziert werden können. Die Abbildungen 26B und 26D zeigen Ausschnittsvergrößerungen von Immunfluoreszenzfärbungen kernhaltiger erythroider Vorläuferstadien, die für beide Oberflächenantigene, Glykophorin A und 4B9, positiv sind. Es handelt sich dabei um poly- und orthochromatische Normoblasten. Abbildung 26D zeigt zusätzlich einen kernhaltigen, für beide Marker negativen Leukozyten. Abbildung 26E zeigt eine immunzytochemische Färbung 4B9-positiver kernloser Erythrozyten (gestrichelter Pfeil) und einer kernhaltigen erythroiden Vorläuferzellen (durchgezogener Pfeil). Bei dieser Zelle handelt es sich um einen orthochromatischen Erythroblasten, der kurz vor der Ausstoßung des Zellkerns steht. Im oberen rechten Bildausschnitt sind 4B9-negative Granulozyten, unten rechts ein 4B9-negativer Lymphozyt zu sehen. Abbildung 26F zeigt eine Färbung mit der Positivkontrolle anti-Glykophorin A an Erythrozyten (gestrichelter Pfeil) und einer kernhaltigen erythroiden Vorläuferzelle (durchgezogener Pfeil) zu sehen. Darunter liegend sind kernhaltige Leukozyten zu sehen, die das GPA-Antigen nicht exprimieren.

4.6.5 Verteilung des 4B9-Antigens auf MNCs aus Nabelschnurblut

Mit Hilfe von mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut wurde nach Antikörpern gesucht, die spezifisch erythroide Zellen erkennen. Demnach ist bereits aus durchflusszytometrischen Analysen bekannt, dass das 4B9-Antigen auf erythroiden Zellen der späten Fetalentwicklung, d.h. auf erythroiden Zellen im Blut von Neugeborenen, gebildet wird. Für eine immunzytochemischen Charakterisierung wurde das 4B9-Antigen an Zytospinpräparaten mit mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut untersucht. Es wurde eine Färbung mit UltraVision (3.9.3) mit unverdünntem 4B9-Zellkulturüberstand und einer Kernfärbung durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse von fünf Nabelschnurblutproben (38. – 40. SSW) sind in Abbildung 27 exemplarisch dargestellt.

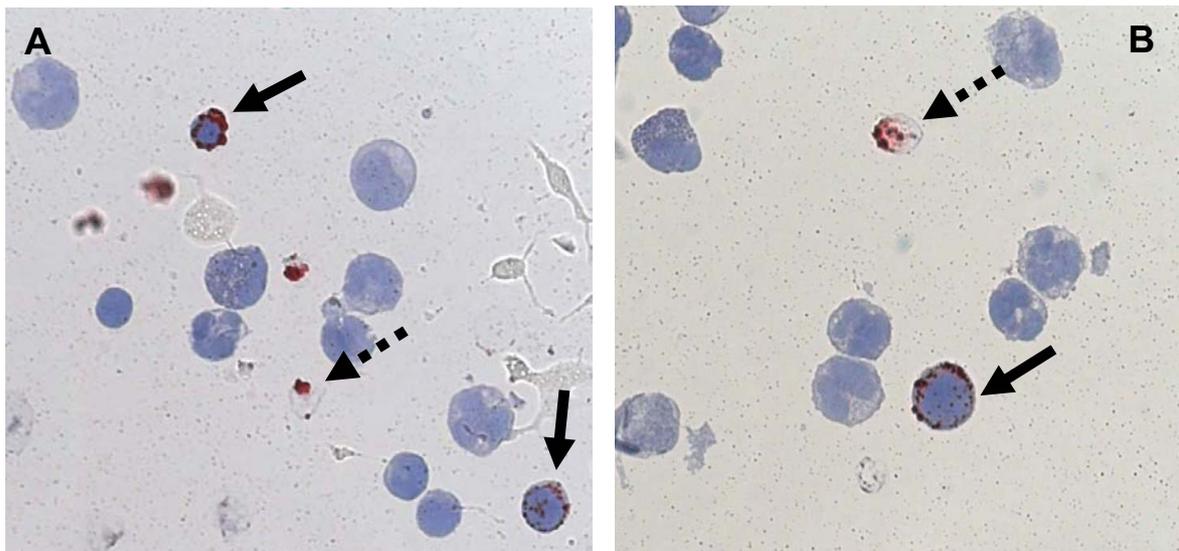


Abbildung 27: Untersuchung der Bindung von 4B9 an MNCs aus Nabelschnurblut

4B9-Expression auf mononukleären Zellen sowie Erythrozyten und Retikulozyten aus Nabelschnurblut (40. SSW). **(A)** und **(B)** 4B9-positive orthochromatische Normoblasten bzw. Zellkerne mit Membranresten (durchgezogene Pfeile) und die Expression des 4B9-Antigens auf kernlosen Erythrozyten oder Retikulozyten (gestrichelte Pfeile). Zusätzlich sind Leukozyten zu sehen, die das 4B9-Antigen nicht exprimieren.

Die Untersuchung von mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut ergab, dass das 4B9-Antigen sowohl auf erythroiden kernhaltigen Vorläuferstadien (durchgezogene Pfeile) als auch auf kernlosen reifen Erythrozyten (gestrichelte Pfeile) exprimiert wird. Es handelt sich um eine tröpfchenartige Expression, die auf die Zellmembran beschränkt ist. Abbildung 27A zeigt zwei 4B9-positive Zellen bzw. wahrscheinlich bereits ausgestoßene Zellkerne, auf denen Membranreste zurück geblieben sind, die das 4B9-Antigen tragen. 4B9 bindet alle Vorläuferstadien, d.h. vom Proerythroblasten bis zum letzten kernhaltigen Stadium, dem orthochromatischen Normoblasten. Auf kernhaltigen erythroiden Vorläuferzellen erscheint die 4B9-Expression allerdings stärker als auf kernlosen reifen Erythrozyten. Zusätzlich wurde festgestellt, dass nicht alle Erythrozyten oder Retikulozyten das 4B9-Antigen exprimieren, d.h. ca. 30 – 40 % aller kernlosen erythroiden Zellen sind 4B9-negativ.

4.6.6 Überprüfung einer Bindung von 4B9 auf fetalen lymphoiden Zellen

Zur Untersuchung der Bindung von 4B9 an Zellen fetalen Lymphknotengewebes wurden Gefrierschnitte immunhistologisch untersucht. Es erfolgten Färbungen mit 4B9-Zellkulturüberstand und einer entsprechenden Isotypkontrolle. Die Untersuchung von fetalem Lymphknotengewebe zeigte keine Reaktivität des 4B9-Antigens mit Zellen lymphatischen Ursprungs. Makrophagen, dendritische Zellen, T- und B-Lymphozyten waren 4B9-negativ (Daten nicht gezeigt).

4.7 Übersicht: Ergebnisse histologischer und zytologischer Analysen

Die Ergebnisse der immunhistologischen und immunzytologischen Untersuchungen der Bindung von 4B9 an fetale und adulte Zellen verschiedener Gewebe sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Übersicht der Untersuchung fetaler und adulter Gewebe

ADULT	NRBCs	Reti / Ery	Leukozyten / andere Zellen
Knochenmark (n = 32)	+ ¹	-	-
Blut (n=5)	-	-	-
lymphatische Gewebe (n = 8)	-	-	-
EMBRYONAL / FETAL	NRBCs	Reti / Ery	Leukozyten / andere Zellen
Dottersack (n = 4)	++	-	-
Leber (n = 8)	++	(+)	-
Knochenmark (n = 4)	++	(+)	-
Blut (n = 14)	++	(+)	-
Nabelschnurblut (n = 35)	++	(+)	-
lymphatische Gewebe (n = 14)	-	-	-

¹ In einer Knochenmarkprobe (3 %) waren ca. 5 – 10 % der Erythroblasten 4B9-positiv; (+) Eine 4B9-Expression war zwar in allen untersuchten Proben nachweisbar, aber nur ein Teil der Zellen innerhalb einer Subpopulation war positiv; ++/+ Stärke der Expression; NRBCs: nucleated red blood cells; Reti: Retikulozyten; Ery: Erythrozyten

4.8 Immunphänotypisierung erythroider Zellen aus Nabelschnurblut

In vorherigen Abschnitten wurde die Bindung von 4B9 an Zellen fetaler und adulter Gewebe überprüft. Im folgenden Teil wurde die Expression des 4B9-Antigens mit den bekannten Expressionsprofilen der Marker Glykophorin A, CD36 und membranständigen Oligosacchariden (gebunden durch SBA) in Kombination mit CD34 zur Detektion früher Vorläuferzellen bzw. mit CD71 zur Identifizierung später erythroider Vorläuferzellen verglichen. Die Untersuchungen wurden an jeweils 5 Nabelschnurblutproben mit einem hohen Anteil erythroider Vorläuferzellen (ca. 10 %) untersucht, um einen deutlichen Nachweis von NRBCs führen zu können. Abbildung 28 zeigt die Expression von CD36, Glykophorin A und membranständigen Oligosacchariden auf MNCs aus Nabelschnurblut gegen den Stammzellmarker CD34 im direkten Vergleich gegen den erythroiden Marker CD71. Dargestellt sind nur erythroide Zellen und Lymphozyten, d.h. Monozyten und Debris wurden ausgeschlossen.

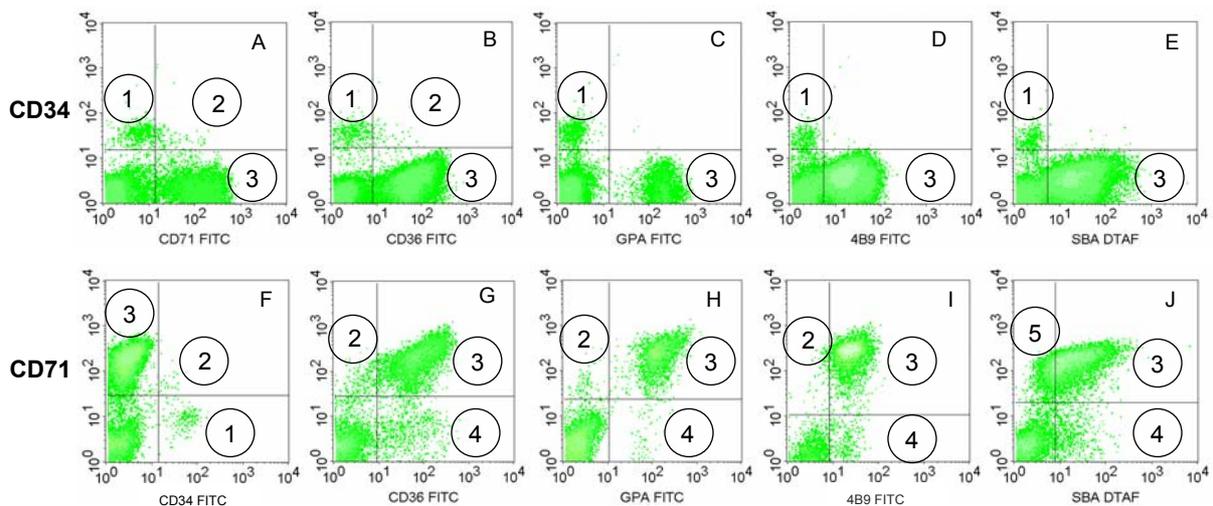


Abbildung 28: Phänotypisierung fetaler erythroider Zellen

Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-CD34 bzw. anti-CD71, anti-CD36, anti-Glykophorin A, Galaktose-spezifischem SBA und 4B9. Differenzierung I.) früher CD34-positiver und II.) später CD71-positiver Entwicklungsstadien fetaler erythroider Zellen aus Nabelschnurblut. (A) CD34, (F) CD71, (B, G) CD36, (C, H) GPA, (D, I) 4B9, (E, J) SBA.

Die fünf Graphiken in der oberen Reihe der Darstellung zeigen die Expression von CD34 und CD71 (A), CD36 (B), GPA (C), das 4B9-Antigen (D) und Oligosacchariden, die über SBA (E) nachgewiesen wurden. Es wurden CD36 und CD34 doppelt positive sowie CD71 und CD34 doppelt positive Zellen nachgewiesen (Population 2). Ca. 95 % der CD34-positiven Zellen exprimierten jedoch keinen der anderen Marker (Population 1). GPA, 4B9 und membranständige Galaktose wurden nicht auf CD34-positiven Zellen exprimiert. Der 2. Teil der Darstellung zeigt die Expression von CD71 sowie die Bindung von CD34, CD36, GPA, dem 4B9-Antigen und membranständigen Oligosacchariden. In

Abbildung 28F ist die Verteilung von Zellen aus Nabelschnurblut nach einer Färbung von CD71 und CD34 dargestellt (s. Abb. 28A). Es waren CD71 und CD34 doppelt positive Zellen nachweisbar (Population 2). GPA, Oligosaccharide sowie 4B9 wurden auf der gleichen Subpopulation erythroider Zellen exprimiert wie CD71 (s. Abb. 28G - 28J; Population 3). Zusätzlich waren die drei Marker auch auf Zellen zu finden, die nicht CD71 trugen (Population 4). Dagegen wurde CD71 auch auf Zellen nachgewiesen, die keinen der drei Marker exprimierten (Population 2).

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse zur Veranschaulichung der Expression bekannter Marker im Vergleich zu 4B9 auf MNCs aus Nabelschnurblut. Es waren 5 Populationen mit verschiedenen Expressionsmustern nachweisbar.

Tabelle 4: Vergleich der Expression von bekannten Markern und 4B9 auf Nabelschnurblutzellen

MNCs aus Nabelschnurblut (n = 5 für CD34, n = 5 für CD71)						
Zellpopulation	Expressionsprofil bekannter Marker					Neuer Marker
1	CD34 ⁺⁺	CD71 ⁻	CD36 ⁻	GPA ⁻	GalNAc*	4B9 ⁻
2	CD34 ⁺	CD71 ⁺	CD36 ⁺	GPA ⁻	GalNAc*	4B9 ⁻
3	CD34 ⁻	CD71 ⁺⁺	CD36 ⁺⁺	GPA ⁺	GalNAc*	4B9 ⁺⁺
4	CD34 ⁻	CD71 ⁻	CD36 ⁺	GPA ⁺	GalNAc*	4B9 ⁺
5	CD34 ⁻	CD71 ⁺⁺	CD36 ⁺⁺	GPA ⁺⁺	GalNAc*	4B9 ⁺

*GalNAc: terminales α - oder β -N-Acetylgalaktosamin (Nachweis durch SBA)

5 DISKUSSION

Die Identifizierung und Charakterisierung fetaler erythroider Zellen ist aufgrund der Tatsache, dass keine Oberflächenantigene bekannt sind, die ausschließlich auf diesen Zellen exprimiert werden, erschwert. Die dafür am häufigsten verwendeten Antikörper erkennen Glykophorin A oder den Transferrin-Rezeptor. Außerdem werden Antikörper gegen den Thrombospondin-Rezeptor genutzt, die allerdings zusätzlich zu erythroiden Vorläuferzellen auch Leukozyten binden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung monoklonaler Antikörper, die spezifisch Oberflächenantigene auf fetalen erythroiden Zellen erkennen und damit eine eindeutige Charakterisierung dieser Zellen ermöglichen.

5.1 Das 4B9-Antigen wird auf differenzierten Zellen der embryonalen und fetalen Erythropoese exprimiert

Die selektionierten Hybridomklone 4B8, 4B9 und 5D10 wurden zunächst dahingehend untersucht, ob die Antikörper verschiedene Antigene bzw. Epitope erkennen (s. Abb.9). Die Untersuchung einer gegenseitigen Inhibition von 4B8 und 4B9 bzw. 5D10 zeigte, dass 4B8 und 4B9 das gleiche Antigen erkennen. Das Bindungsverhalten des Zellkulturüberstands 5D10 blieb durch 4B8 unbeeinflusst, wodurch belegt wurde, dass dieser ein anderes Epitop erkennt. 5D10 zeigte zusätzlich zur Bindung an erythroide Zellen eine Reaktion mit einer Subpopulation CD45-positiver Zellen, bei der es sich um Monozyten handelte (s. Abb.10). Die Entwicklung von Antikörpern gegen fetale erythroide Zellen resultierte demnach in nur einem geeigneten Klon, der den Anforderungen an einen spezifischen erythroiden Markers entsprach.

Der direkte Vergleich der Expression der Oberflächenmarker CD34, CD36, CD71, Glykophorin A und membranständiger Galaktose mit der Bildung des 4B9-Antigens sowie histo- und zytochemische Untersuchungen dienten der Charakterisierung der Expression des 4B9-Antigens auf verschiedenen Entwicklungsstadien erythropoetischer Zellen aus Nabelschnurblut (s. Tab. 5). Das 4B9-Antigen wurde in Nabelschnurblut auf Proerythroblasten und kernhaltigen erythroiden Vorläuferzellen nachgewiesen. In diesem Entwicklungsstadium und den darauf folgenden Stadien von NRBCs werden auch CD71 und CD36 verstärkt gebildet. Auf dem kernlosen Retikulozytenstadium sind diese Marker, wie auch das 4B9-Antigen, nur noch schwach exprimiert (Alter, 1994). Auf Erythrozyten werden CD36 und CD71 nicht mehr gebildet (Telen, 2000; Loken et al., 1987). Für das 4B9-Antigen war dagegen eine schwache Expression auf 60 - 70 % der fetalen Erythrozyten nachweisbar. Die Expression von Glykophorin A und membranständiger Galaktose sind dem des 4B9-Antigens auf fetalen erythroiden Zellen am ähnlichsten. GPA wird ebenfalls auf Proerythroblasten, später stärker auf NRBCs, Retikulozyten und

Erythrozyten gebildet (Nagler et al., 1999; Migliaccio et al., 1992). GPA, membranständige Galaktose und das 4B9-Antigen werden nicht auf Stammzellen bzw. den frühen Vorläuferzellen, den BFU-E und CFU-E, exprimiert. Dagegen ist in der Literatur die Expression von CD71 häufig schon auf BFU-E, und die Bildung von CD36 auf dem Stadium der CFU-E beschrieben (Alter et al., 1994).

Mit Hilfe von CD34 und CD71 sowie mittels der in der Literatur beschriebenen Marker CD36, GPA und Galaktose wurden Subpopulationen früher und später erythroider Zellen in Nabelschnurblut charakterisiert (s. 4.8). Anhand dieser Ergebnisse wurde die Expression des 4B9-Antigens beschrieben und im Vergleich zu anderen Markern in verschiedene Stadien der Entwicklung erythroider Zellen eingeordnet.

Tabelle 5: Expression des 4B9-Antigens in der fetalen Erythropoese zum Zeitpunkt der Geburt im Vergleich zu beschriebenen Antigenen.

Marker	SZ	BFU-E	CFU-E	NRBC	Reti	RBC
CD34	+++	++				
CD71		+?	+	++	++	
CD36			+?	++	++	
Glykophorin A				+++	+++	+++
GalNAc*				++	++	+++
4B9				++	++	(+)

(verändert aus Alter, B.P., 1994)

BFU-E: burst-forming unit – erythroid; CFU-E: colony-forming unit – erythroid; NRBCs: nucleated red blood cells (alle kernhaltigen erythroiden Vorläufer); RBC: red blood cells (Erythrozyten); Reti: Retikulozyten; SZ: Stammzellen; (+) Expression nur auf einem Teil der Zellen; +? unterschiedliche bzw. keine Angaben i.d. Literatur; +++/++/+ Expressionsstärke des Antigens; *GalNAc: terminales α - oder β -N-Acetylgalaktosamin (Nachweis durch SBA)

Bei dem 4B9-Antigen handelt es sich um eine Oberflächenstruktur, die auf Zellen aller morphologisch identifizierbaren Stadien der fetalen Erythropoese nachweisbar war. Wie auch die bekannten Marker eignet sich das 4B9-Antigen somit zur Charakterisierung der fetalen Erythropoese.

5.2 Charakterisierung der Bindung von 4B9 im Verlauf der Ontogenese

Die Ergebnisse der Analysen von MNCs aus Nabelschnurblut zeigten, dass das 4B9-Antigen vom Proerythroblasten bis zum Erythrozyten, d.h. auf allen Entwicklungsstadien erythroider, fetaler Zellen gebildet wird. An Nabelschnurblut lässt sich die Erythropoese des späten Fetus charakterisieren (s. 5.1).

Die Expression des 4B9-Antigens wurde in der embryonalen und der fetalen Erythropoese anhand der für die Blutbildung verantwortlichen Organe untersucht (s. Tab. 3). Das Maximum der Blutbildung im Dottersack, dem ersten hämatopoetisch aktiven Gewebe in der humanen Ontogenese, liegt etwa in der 4. Woche der Embryonalentwicklung, und ist ab der 10. Woche nicht mehr nachweisbar. Auf dem Dottersack findet ausschließlich die Bildung erythroider, kernhaltiger Zellen statt (Hann, 1994b). Es wurde eine Bindung von 4B9 an kernhaltige erythroide Zellen, den primitiven Erythroblasten, in Blutinseln des Dottersacks nachgewiesen (s. Abb.23). Auf den Stammzellen der embryonalen Erythropoese, den Hämocytoplasten, war keine Reaktion mit 4B9 nachweisbar. Die Identifizierung erythroider Zellen erfolgte anhand der Expression von GPA. Laut Literatur und anhand der eigenen Ergebnisse wird GPA ebenfalls schon früh in der Entwicklung des Fetus auf allen Erythroblastenstadien gebildet. Choolani et al. (2003), haben fetales Blut aus dem 1. Trimester untersucht, und dabei die Expressionsmuster primitiver Erythroblasten aus dem Dottersack und definitiver Erythroblasten aus der hepatolienalen Blutbildung unterschieden (Choolani et al., 2003). Das Expressionsmuster primitiver Erythroblasten entsprach dem adulter, reifer Erythrozyten. GPA wurde demnach auf primitiven und definitiven Erythroblasten nahezu gleich stark gebildet. Eine Expression von CD36 auf primitiven Erythroblasten wurde nicht nachgewiesen. CD71 wurde schwach und nur auf 68 % der primitiven Erythroblasten, dagegen auf 100 % der definitiven Erythroblasten exprimiert (Choolani et al., 2003; Zheng et al., 1997). Eine Expression des 4B9-Antigens wurde auf allen Erythroblastenstadien der embryonalen Blutbildung im Dottersack nachgewiesen.

Weiterhin wurden Präparate mit Zellen aus fetaler Leber (s. 4.6.2), fetalem Knochenmark (s. 4.6.3) und fetalem Blut (s. 4.6.4) verschiedener Schwangerschaftswochen untersucht. Die Erythropoese in der fetalen Leber beginnt ab der 4. Woche, während die Blutbildung im fetalen Knochenmark etwa ab der 10. Woche parallel einsetzt. Zu diesem Zeitpunkt tritt die embryonale Erythropoese im Dottersack in den Hintergrund (Tavassoli, 1991). Die Identifizierung erythropoetischer Zellen erfolgte mittels GPA, das auf allen erythroiden Zellen in der Leber gebildet wird (Timens und Kamps, 1997). Das 4B9-Antigen wird in beiden Abschnitten der fetalen Erythropoese auf allen Erythroblastenstadien, d.h. auf Proerythroblasten, reifenden Erythroblasten sowie auf Retikulozyten und schwach auf Erythrozyten exprimiert (s. Abb.24 und 25).

Die Ergebnisse der Untersuchung fetaler Gewebe zeigen, dass das 4B9-Antigen innerhalb der Erythropoese auf allen kernhaltigen erythroiden Zellstadien und schwach auf 60 – 70 % der Erythrozyten gebildet wird. Es war keine Reaktion mit Zellen des fetalen, hämolymphatischen Systems oder mit fetalen myeloiden Zellen nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass es sich beim 4B9-Antigen, wie bei Glykophorin A, um einen spezifischen erythroiden Marker handelt. Außerdem wurde gezeigt, dass 4B9 an erythroide Zellen in allen Entwicklungsstufen der embryonalen bzw. der fetalen Ontogenese bindet.

Zur Überprüfung der Spezifität der 4B9-Bindung wurden adulte Blut- und Knochenmarkproben gesunder Spender untersucht. Die immunzytochemische Untersuchung adulter Knochenmarkzellen zeigte bei 97 % der analysierten Proben keine Reaktion für 4B9. In 1 von 32 untersuchten Proben wurde bei 5 – 10% der Erythroblasten eine Bindung von 4B9 an zytoplasmatische Strukturen nachgewiesen (s. Abb.21). Darüber hinaus wurde in keiner der Proben eine Bindung von 4B9 an Vorläuferstadien oder an reifen Zellen der Granulozytopoese, Thrombozytopoese und Lymphozytopoese nachgewiesen. Die durchflusszytometrischen Analysen von MNCs aus Knochenmark bestätigten die mikroskopischen Untersuchungen insofern, als dass ca. 2 % aller Zellen 4B9-positiv waren. Bezogen auf den durchschnittlichen Anteil von 4,8 % CD71-, CD36- und GPA-positiver Erythroblasten im Knochenmark waren ca. 40 % aller erythroiden Zellen 4B9-positiv. Dabei handelte es sich ausschließlich um CD71-positive und CD45-negative, d.h. erythroide Vorläuferzellen (s. Abb.19 und 20). Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten ebenfalls, dass 4B9 keine CD45-positiven Zellen gebunden hat. Allerdings zeigten 80 % der durchflusszytometrisch analysierten Proben, im Gegensatz zu 3 % der mikroskopischen untersuchten Proben, eine Bindung von 4B9 an erythroide Vorläuferzellen. Aufgrund der höheren Probenzahl und des besseren Untersuchungsmaterials sind die Ergebnisse der histologischen Analysen jedoch aussagekräftiger als die der durchflusszytometrischen Analysen. In adultem peripherem Blut gesunder Spender wurden CD71, GPA, CD36 und Galaktose auf durchschnittlich 0,7 % aller Zellen exprimiert. Dies entspricht ungefähr dem Anteil von bis zu 1 % erythroider Vorläuferzellen, die im peripheren Blut nachweisbar sind (Fornas et al., 2002). Das 4B9-Antigen wurde weder auf NRBCs, noch auf Erythrozyten in adultem Blut nachgewiesen. Weiterhin hat 4B9 keine reifen myeloiden oder lymphoiden Zellen gebunden.

Die erhobenen Daten zur Charakterisierung der Expression des 4B9-Antigens belegen, dass diese Oberflächenstruktur eng mit der Entwicklung des Blut bildenden Systems im Organismus verbunden ist (s. Tab. 6). Das Antigen wird bereits im Embryo gebildet, weiterhin ist es in der fetalen Leber, im Knochenmark und auch zur Geburt im

Nabelschnurblut auf allen erythroiden Entwicklungsstadien nachweisbar. Im adulten Organismus ist das 4B9-Antigen nur bei einem Probanden in erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet worden, war dagegen in peripherem adultem Blut nicht nachweisbar. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei der einmaligen Expression des 4B9-Antigens in adulten NRBCs nicht um membranständige, sondern um zytoplasmatische Strukturen handelte.

Tabelle 6: Expression des 4B9-Antigens im Verlauf der Ontogenese

	Embryonale Erythropoese	Fetale Erythropoese		Adulte Erythropoese
	Dottersack „primitive“ NRBCs	Fetale Leber NRBCs	Fetales KM NRBCs	Adultes KM NRBCs
CD34	?	++	++	++
CD71	(+)	++	++	++
CD36	-	++	++	++
Glykophorin A	+++	+++	+++	+++
GalNAc*	?	++	++	++
4B9	++	++	++	[+]

(+) Expression nicht auf allen Zellen nachweisbar; [+] Expression nicht auf allen Zellen und bei nur einem Probanden nachweisbar; ? keine Angaben i.d. Literatur; +++/++/+ Expressionsstärke des Antigens; * GalNAc: terminales α - oder β -N-Acetylgalaktosamin (Nachweis durch SBA)

Innerhalb der embryonalen, der fetalen und der adulten Erythropoese sind kennzeichnende Charakteristika bekannt, die mit Hilfe der Beschreibung der antigenen Eigenschaften sich entwickelnder erythroider Zellen in dieser Arbeit veranschaulicht wurden. Gleichzeitig wurde auch deutlich, dass es immunphänotypische Unterschiede in den einzelnen Phasen der Ontogenese gibt (s. Tab. 6). Dass die einzelnen Abschnitte der Erythropoese im Verlauf der Ontogenese spezifische Charakteristika aufweisen, ist auch in der Literatur anhand von Zellkulturexperimenten nachgewiesen worden. Dabei wurden z.B. Unterschiede hinsichtlich der Teilungs- und Wachstumsgeschwindigkeit der Kolonien bildenden fetalen, neugeborenen und adulten Vorläuferzellen beobachtet. Weiterhin konnte eine Änderung der Sensitivität erythroider Zellen in Bezug auf Erythropoetin (EPO) im Verlauf der Ontogenese festgestellt werden. Zusätzlich war eine unterschiedliche Produktion von γ -Globin auffällig (Weinberg et al., 1992).

Alle Untersuchungen und Vergleiche sprechen dafür, dass es sich bei dem 4B9-Antigen um einen neuen Marker handelt, der aufgrund seiner spezifischen Expression als weiteres

Kriterium die embryonale bzw. fetale und adulte Erythropoese zu unterscheiden und zu charakterisieren hilft.

5.3 Vergleich der Expression des 4B9-Antigens mit der Bildung von bekannten Oberflächenmarkern auf erythroiden Zellen

Es ist nicht bekannt, welche Oberflächenstruktur auf fetalen erythroiden Zellen von 4B9 gebunden wird. Anhand der durchgeführten durchflusszytometrischen und mikroskopischen Vergleiche mit anderen Antigenen konnten jedoch einige der bekannten Strukturen als Antigene ausgeschlossen werden. Zunächst wurde anhand von Adsorptionsversuchen überprüft, ob es sich bei 4B9 um einen Antikörper handelt, der gegen Blutgruppenantigene gerichtet ist (s. Abb.12). 4B9 hat keine Oberflächenstrukturen, die auf adulten Erythrozyten exprimiert werden, gebunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem 4B9-Antigen wahrscheinlich nicht um eines der adulten Haupt-Blutgruppenantigene handelt. Dennoch wurden einige Blutgruppenantigene, die als 4B9-Antigen in Frage kommen, gesondert überprüft.

Als eines von ca. 60 Blutgruppenantigenen kann mit Hilfe dieser Ergebnisse wahrscheinlich auch das Blutgruppenantigen I als mögliches Oberflächenantigen ausgeschlossen werden, das wie GPA auf adulten Erythrozyten exprimiert wird (Winters und Howard, 2001; Navenot et al., 1997). Möglicherweise erkennt 4B9 jedoch das Blutgruppenantigen i, das im Gegensatz zu Antigen I nur auf fetalen Zellen zu finden ist. Die Bildung von Antigen i ist in der Embryonalentwicklung beschrieben, weshalb eine Verbindung zu 4B9 möglich erscheint. Allerdings ist die Expression der Antigene I und i nicht auf Erythrozyten beschränkt, sondern findet auch auf anderen Blutzellen und Geweben, sowie in Sekreten und anderen Körperflüssigkeiten statt (Reid und Lomas-Francis, 2004). Diese Tatsache, sowie der Punkt, dass das 4B9-Antigen mit zunehmender Zellreifung schwächer exprimiert wird und nur noch auf 60 – 70 % der fetalen Erythrozyten nachzuweisen ist, sind Hinweis gebend dafür, dass Antigen i und das 4B9-Antigen nicht identisch sind.

Bei Glykophorin A handelt es sich um ein Glykoprotein, das in hoher Dichte auf Erythrozyten exprimiert wird. Immunfluoreszenz- sowie immunzytochemische Färbungen erythroider Zellen mit anti-GPA zeigten, im Gegensatz zu der charakteristischen tröpfchenförmigen Bildung des 4B9-Antigens (s. Abb.27B), die homogene Verteilung des Sialoglykoproteins auf der Oberfläche erythroider Zellen (s. Abb.25B). Außerdem wird Glykophorin A sowohl auf fetalen als auch auf adulten erythroiden Vorläuferzellen gebunden, 4B9 dagegen ausschließlich auf fetalen NRBCs. Außerdem konnte Glykophorin A als mögliches Antigen durch die Analyse der erythroiden Zelllinie K-562 ausgeschlossen werden, da GPA auf dieser Zelllinie exprimiert wird, das 4B9-Antigen dagegen nicht.

Auch membranständige Galaktoseketten, die in dieser Arbeit über die Bindung von SBA an terminalem α - oder β -N-Acetylgalaktosamin nachgewiesen wurden, können aufgrund der Analyse adulter Erythrozyten als mögliches 4B9-Antigen ausgeschlossen werden, da Erythrozyten stark glykosyliert sind und 4B9 nicht an diese Zellen gebunden hat. Diese Annahme lässt sich zusätzlich mit Hilfe der Analysen von MNCs aus Nabelschnurblut und adultem Blut, belegen. Galaktose-spezifisches SBA hat neben erythroiden Vorläufern und reifen Erythrozyten auch fetale und adulte Monozyten gebunden, die auf der Zelloberfläche Galaktose bilden (Migliaccio et al., 1992). Zusätzlich zeigte die Untersuchung der Zelllinie KMOE eine Reaktion von SBA, aber keine Bindung von 4B9.

CD36, der Thrombospondin-Rezeptor, scheidet als mögliches 4B9-Antigen ebenfalls aus, da 4B9 weder auf fetalen, noch auf adulten Monozyten exprimiert wird. An dieser Stelle ist allerdings ein Vergleich des Bindungsverhaltens von 5D10, dem zweiten entwickelten Antikörper, und CD36 nahe liegend. Beide Antikörper erkennen erythroide Vorläuferzellen und beide binden Monozyten in adultem und fetalem Blut. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten ist es möglich, dass das 5D10-Antigen und das CD36-Antigen identisch sind.

Die Ergebnisse des Wettbewerbsversuches zeigten, dass anti-CD71 und 4B8 bei der Bindung des jeweiligen Antigens bzw. Epitops voneinander unbeeinflusst blieben (s. Abb.15). Auf diese Weise konnte belegt werden, dass 4B8 nicht das von diesem CD71-Antikörperklon gebundene Epitop erkennt. Aufgrund dessen liegt einerseits die Vermutung nahe, dass es sich beim 4B8- bzw. 4B9-Antigen somit auch nicht um den Transferrin-Rezeptor handeln kann. Auf der anderen Seite könnte der neue Antikörper nur ein anderes CD71-Epitop erkennen. Weitere Hinweise dafür, dass es sich bei dem 4B9-Antigen nicht um den Transferrin-Rezeptor handelt, erbrachte jedoch die Untersuchung der Bindung von 4B9 an Erythrozyten sowie an vorrangig fetale erythroide Zellen. CD71 wird im Gegensatz zu 4B9 auf 96 % der adulten Erythroblasten stark exprimiert (Loken et al., 1987). Weiterhin war eine Bildung von 4B9 erst ab dem Proerythroblastenstadium nachweisbar, CD71 wird dagegen laut Literatur schon auf frühen CD34-positiven BFU-E exprimiert, was durch die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen bestätigt wurde (Alter, 1994). Es konnte eine Subpopulation CD34 und CD71 doppelt positiver Zellen, aber keine CD34 und 4B9 doppelt positive Population ermittelt werden. CD71 kann als mögliches Antigen auch anhand der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Zelllinien K-562 und KMOE-2 ausgeschlossen werden. Anti-CD71 hat an beide Zelllinien gebunden, 4B9 jedoch nicht (s. Abb.13 und 14). Das Ziel anderer Arbeitsgruppen war ebenfalls die Entwicklung monoklonaler Antikörper, die spezifisch fetale erythroide Zellen binden. Dabei wurden allerdings in den meisten Ansätzen neue Antikörperklone gegen verschiedene Epitope des Transferrin-Rezeptors generiert (Prieto et al., 2002; Alvarez et al., 1999). Bei CD71 scheint es sich demnach um ein dominantes

Immunogen zu handeln, dass bei der Immunisierung von Mäusen mit ganzen Zellen oder Zellmembranen für eine starke Immunantwort sorgt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die neue CD71-Antikörperklone entwickelt haben, ist für 4B9 nicht eindeutig belegt, dass dieser Antikörper den Transferrin-Rezeptor bindet.

Eine weitere Oberflächenstruktur, die als mögliches Antigen für 4B9 zur Diskussion steht, da dieses Protein auch auf fetalen erythroiden Zellen gebildet wird, ist der Erythropoetin Rezeptor. Aber aufgrund der Tatsache, dass der Erythropoetin Rezeptor sowohl auf adulten als auch auf fetalen Zellen exprimiert wird, 4B9 aber nur die Subpopulation fetaler NRBCs bindet, kann es sich bei dem 4B9-Antigen nicht um den Erythropoetin-Rezeptor handeln.

Es wurde gezeigt, dass das 4B9-Antigen eine spezifische, punkt- oder tröpfchenförmige Verteilung auf der Oberfläche erythroider Zellen aufweist (s. Abb.27). Im Vergleich dazu ist die Expression von GPA auf der Zelloberfläche sehr stark und homogen (s. Abb.25). Die Verteilung des 4B9-Antigens ist der relativ schwach erscheinenden Bildung von CD34, einem auf Stammzellen und BFU-E nachweisbaren Marker, sehr ähnlich (Timens und Kamps, 1997). Ebenso kann die Bildung des 4B9-Antigens mit der Verteilung von CD71 verglichen werden. Auch dieses Antigen wird nur partiell und tröpfchenförmig auf der Zelloberfläche exprimiert, wie mikroskopische Untersuchungen CD71-positiver Erythroblasten ergaben (Daten nicht gezeigt). CD34 und CD71 scheiden als Antigene, die durch 4B9 erkannt werden zwar aus, dennoch können durch einen Vergleich der Expressionsmuster möglicherweise Rückschlüsse auf die Struktur des 4B9-Antigens geschlossen werden. Bei CD34 handelt es sich um ein hoch glykosyliertes Transmembranprotein. CD71 ist ebenfalls ein Transmembranprotein, das mit Polysaccharidstrukturen verlinkt ist. Bei beiden Antigenen handelt es sich um Rezeptormoleküle, die bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt sind. Die sich ähnelnden, spezifischen Verteilungsmuster der drei Antigene auf der Zellmembran lassen vermuten, dass das 4B9-Antigen vergleichbare funktionelle Eigenschaften wie CD34 und CD71 aufweisen könnte.

Der Vergleich der Bildung des 4B9-Antigens mit der Expression anderer Marker anhand durchflusszytometrischer Analysen sowie anhand der auffälligen Verteilung auf der Zelloberfläche hat gezeigt, dass es sich beim 4B9-Antigen weder um CD36 (Thrombospondin-Rezeptor), CD71 (Transferrin-Rezeptor), den Erythropoetin Rezeptor noch um terminales α - oder β -N-Acetylgalaktosamin handelt. Weiterhin ist es wenig wahrscheinlich, dass es sich bei dem 4B9-Antigen um eines der Haupt-Blutgruppenantigene (Glykophorin A, Antigen I und Antigen i) handelt. Die bisherigen Untersuchungen sprechen dafür, dass 4B9 ein bisher nicht beschriebenes fetalspezifisches Antigen erkennt.

5.4 Potentieller diagnostischer Nutzen des neuen Antikörperklons

Kernhaltige erythroide Vorläuferzellen sind an einer Vielzahl hämatologischer und nicht-hämatologischer Erkrankungen beteiligt. Die Erkennung und Charakterisierung morphologischer Veränderungen sowie die Entdeckung von Unterschieden in der Antigenexpression auf der Zelloberfläche spielt für die Diagnostik eine wichtige Rolle.

Wie bei der Bildung von Leukozyten und damit einhergehenden Bluterkrankungen (Leukämien), kann es auch im Verlauf der Erythropoese zu Störungen kommen. Dabei handelt es sich häufig um eine krankhafte Überproduktion erythroider Vorläuferstadien und deren Auftreten im peripheren Blut (Erythroblastämie) oder um Störungen bei der Hämoglobinbildung (Anämien). Bei der Erythroblastämie werden die Formen der Erythramie und Erythroleukämie unterschieden. Die akute Erythramie ist eine nach Art der akuten Leukämie verlaufende Erkrankung, bei der es verstärkt zur Bildung und Ausschwemmung untypischer unreifer Erythroblasten, wie Paraerythroblasten und Hämozytoblasten ins periphere Blut kommt. Hämozytoblasten werden normalerweise nur in der Embryonalentwicklung gebildet (Tavassoli, 1991). Bei der Erythroleukämie handelt es sich um eine Untergruppe der akuten myeloischen Leukämie (AML) mit Beteiligung des erythropoetischen Blutbildungssystems, die sich ebenfalls durch das Auftreten kernhaltiger, erythroider Vorläuferzellen und unreifer Granulozyten im peripheren Blut auszeichnet. Auffällig ist hier eine verstärkte extramedulläre Blutbildung. Eine Diagnostik dieser Erkrankungen erfolgt bis zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch anhand einer morphologischen Identifizierung früher, undifferenzierter Entwicklungsstadien erythroider Zellen (Rüfer, 2003).

Glykophorin A, das auf frühen Erythroblasten, orthochromatischen Normoblasten und deren ausgeschleusten Zellkernen nachweisbar war, wurde bereits als Oberflächenmarker zur Diagnose von akuter Leukämie beschrieben (Fornas et al., 2002). Eine andere Arbeitsgruppe hat die Bildung von Glykophorin-Vorläuferformen auf Zellen erythroleukämischer Erkrankungen nachgewiesen (Ulmer et al., 1989). Es wird angenommen, dass diese Glykophorin-Vorläufer über GPA-Antikörper erkannt werden könnten und somit eine Diagnostik von Erythroblastämie mittels durchflusszytometrischer Verfahren möglich ist (Fornas et al., 2002). Da sich das 4B9-Antigen und GPA hinsichtlich der Bindung an frühe Erythroblastenstadien ähneln, kann 4B9 möglicherweise ebenfalls zur Detektion leukämischer oder erythroleukämischer Erkrankungen genutzt werden. Dagegen sprechen die Ergebnisse aus den Untersuchungen von K-562, einer Zelllinie, die von einem Patienten mit CML (chronische lymphatische Leukämie) stammt. Es herrscht Uneinigkeit darüber, ob K-562-Zellen Charakteristika embryonischer erythroider Zellen aufweisen und zum Studium der Erythropoese genutzt werden können. Einerseits gibt es bei K-562 keinen Hinweis für eine normale Differenzierung zu Retikulozyten und

Erythrozyten (Lozzio und Lozzio, 1979). Andererseits gilt anderen Autoren die GPA-Expression sowie eine induzierbare Synthese von embryonalem und fetalem Hämoglobin bei K-562 als Beweis für eine Differenzierung erythroider Stadien (Benz et al., 1980; Andersson et al., 1979). Das 4B9-Antigen wurde, im Gegensatz zu GPA, nicht auf K-562 exprimiert, obwohl 4B9 nachweislich Zellen der embryonalen Erythropoese, nicht aber adulte erythroide Vorläuferzellen bindet. Möglicherweise handelt es sich beim 4B9-Antigen um eine Struktur, die zwar auf embryonalen und fetalen erythroiden Vorläuferzellen gebildet wird, aber nicht wie GPA auf entarteten, erythroleukämischen Zellen nachzuweisen ist. Es bleibt demnach fraglich, ob 4B9 in der Diagnostik von leukämischen Erkrankungen eine Rolle spielen kann, nicht zuletzt deshalb, weil die beschriebene erythroide Differenzierung der Zelllinien K-562 und KMOE-2 offensichtlich nicht mit dem Phänotyp übereinstimmt, der in einer normalen fetalen oder adulten Erythropoese zu finden ist. Aus diesem Grunde muss die Eignung des 4B9-Antikörpers zur Erkennung und Differenzierung spezieller Formen leukämischer Erkrankungen anhand von Patientenproben untersucht werden.

Charakteristika erythroider Zellen werden nicht nur zur Diagnostik hämatologischer Erkrankungen genutzt, sondern auch zur pränatalen Untersuchung nicht-hämatologischer Erkrankungen (Chen et al., 2004). Dabei handelt es sich um die frühzeitige Untersuchung von Aneuploidien (z.B. Trisomien 13, 18 und 21) oder Gendefekten (z.B. Cystische Fibrose, Dystrophie). Ein Ziel dabei ist die Entwicklung einer validen Analyseverfahren, die invasive Eingriffe wie die Amniozentese ersetzen kann und somit für die werdende Mutter und den Fetus ungefährlich ist (Vona et al., 2002; Belvedere et al., 1999; Valerio et al., 1997; Cho und Chi, 1995). Fetale erythroide Vorläuferzellen sind die am häufigsten genutzten Zielzellen zur Etablierung einer nicht-invasiven Pränataldiagnostik (Ho et al., 2003). Für diesen Ansatz wird das Phänomen des Übertritts fetaler Zellen in den mütterlichen Blutkreislauf, die fetomaternalen Transfusion, genutzt (Sekizawa et al., 2003; Bianchi, 2000). Spezifische Charakteristika fetaler Zellen, d.h. vor allem Oberflächenantigene auf fetalen erythroiden Zellen sollen genutzt werden, um diese aus dem Blut der Mutter zu isolieren und zu identifizieren. Ein Problem zur Erreichung dieses Ziels ist, dass zur Isolierung und eindeutigen Identifizierung keine Marker zur Verfügung stehen, die ausschließlich fetale erythroide Zellen binden. Aus diesem Grund wurde bereits mehrfach versucht, neue Antikörper, die spezifisch diese Zellen erkennen, zu entwickeln. Dabei wurden meist neue Antikörperklone gegen den Transferrin-Rezeptor generiert (Prieto et al., 2002; Alvarez et al., 1999). Außerdem wurden Antikörper entwickelt, die fetale erythroide Zellen, aber auch weitere, u.a. adulte erythroide Subpopulationen erkennen (Savion et al., 1997; Mechetner et al., 1987). Die Struktur des 4B9-Antigens ist zurzeit noch unbekannt, dennoch ist das Potential zur Detektion seltener

fetaler erythroider Zellen im Blut Schwangerer durch die Spezifität von 4B9 für diese Zellen vorhanden.

Weiterhin wurde von einigen Arbeitsgruppen verstärkt untersucht, welche der im Blut der Mutter auftretenden fetalen erythroiden Zellen am besten für eine Isolierung und Identifizierung geeignet sind. Untersuchungen zeigten, dass sich vor allem die im 1. Trimester vorhandenen embryonalen, primitiven Erythroblasten als Zielzellen anbieten. Diese Zellen exprimieren GPA und können mit Hilfe von anti-GPA u.a. durch magnetische Selektion angereichert werden. CD71, der Marker, der bislang am häufigsten zur Anreicherung von Erythroblasten genutzt wurde (Jackson, 2003), wird nur schwach auf ca. 70 % der embryonalen primitiven Erythroblasten exprimiert und ist aus diesem Grunde zur Isolierung dieser frühen Zellen nicht gut geeignet (Choolani et al., 2003). Der Transferrin-Rezeptor wird erst auf fetalen NRBCs verstärkt gebildet. Außerdem werden durch den Einsatz von GPA und CD71 auch mütterliche NRBCs angereichert. In einer Studie waren bis zu 11,9 % mütterliche Zellen in Schwangerenblut CD71-positiv (Zheng et al., 1997). Das 4B9-Antigen dagegen wird sowohl auf primitiven embryonalen als auch auf definitiven fetalen Erythroblastenstadien exprimiert, nicht aber auf Zellen in adultem, peripherem Blut. Trotz dieser Tatsache muss 4B9 nicht unbedingt zur Anreicherung seltener fetaler Zellen aus mütterlichem Blut geeignet sein. Die Güte der Anreicherung von seltenen Zellen hängt einerseits von der Art des Separationssystems, in höherem Maße jedoch von der Stärke der Expression des Oberflächeantigens ab, gegen das der verwendete Antikörper gerichtet ist. Wird ein Antigen nur schwach auf den zu isolierenden Zellen exprimiert, wie z.B. CD71 auf primitiven Erythroblasten, so ist die Ausbeute an Zielzellen geringer als bei einer Zellseparation über einen stark exprimierten Marker, wie z.B. GPA (Choolani et al., 2003). 4B9 wird im Vergleich zu GPA nur schwach auf der Zelloberfläche gebildet. Möglicherweise ist der 4B9-Antikörper aus diesem Grunde nicht für eine Positivselektion seltener Zellen aus mütterlichem Blut geeignet. Stattdessen könnte eine Negativselektion, d.h. die Depletion aller Leukozyten über CD45 oder eine Positivselektion über GPA erfolgen und das 4B9-Antigen zum Nachweis des fetalen Ursprungs der Zellen genutzt werden.

Ein 100 %iger Nachweis des embryonalen Ursprungs aller isolierten primitiven Zellen erfolgte erstmals über embryonales Hämoglobin (Choolani et al., 2003). Diese Form des Hämoglobins wird ausschließlich in primitiven embryonalen Erythroblasten gebildet, wodurch das Zeitfenster für einen Nachweis dieser Zellen sehr schmal wird. Bereits ab der 10. SSW sind in mütterlichem Blut verstärkt definitive Erythroblasten, die fetales Hämoglobin synthetisieren, nachweisbar. Ab der 12. Woche sinkt jedoch der prozentuale Anteil an primitiven Zellen im Blut der Mutter auf unter 50 %, und der Anteil fetaler Zellen im peripheren Blut der Mutter ist ohnehin sehr gering. Es sind uneinheitliche Angaben in

der Literatur zu finden, wie etwa 1 fetale Zelle in 1 mL mütterlichem Blut (Shulman, 2003), ca. 19 fetale Zellen in 16 mL maternalem Blut (Bianchi et al., 1997) oder 30 % aller NRBCs in mütterlichem Blut sind fetalen Ursprungs (Wachtel et al., 1998). Fetales Hämoglobin (γ -Globin), das zwar später und länger von fetalen Zellen gebildet wird, kann nicht ausschließlich zur Identifizierung genutzt werden, da es gerade zur Schwangerschaft in mütterlichen Erythroblasten nachgewiesen werden konnte (Ho et al., 2003). 4B9 eignet sich möglicherweise besser zur Identifizierung fetaler Zellen aus frühen und späten Schwangerschaftswochen. Das 4B9-Antigen wird nahezu ausschließlich auf fetalen Zellen exprimiert und war auf allen erythropoetischen Zellen im Verlauf der fetalen Ontogenese, nachweisbar.

Bei dem 4B9-Antigen handelt es sich nach Stand der bisherigen Untersuchungen um eine unbekannt Struktur, die spezifisch auf erythroiden Zellen der embryonalen und fetalen Ontogenese gebildet wird, im adulten Organismus jedoch nur in einem Ausnahmefall nachweisbar war. Aufgrund der spezifischen Expression des 4B9-Antigens scheint dieser Marker besser zur Charakterisierung und Identifizierung geeignet zu sein als bislang bekannte Oberflächenstrukturen auf fetalen erythroiden Zellen.

5.5 Ausblick

Aufgrund der erzielten Ergebnisse ist es lohnenswert, Untersuchungen zur Identifizierung der Struktur des Antigens, das von 4B9 erkannt wird, durchzuführen. Es ist geplant, zunächst leicht zugängliche Erythrozyten aus Nabelschnurblut, die das 4B9-Antigen exprimieren, für die Analyse der Antigenstruktur einzusetzen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass 4B9 bei der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen eingesetzt werden könnte. Aus diesem Grunde sollen Blutproben von Patienten mit leukämischen Erkrankungen wie Erythämie und Erythroleukämie hinsichtlich des Potentials von 4B9 untersucht werden, spezielle Formen entarteter erythroider Zellen zu binden.

Die Eigenschaften von 4B9 stellen einen Fortschritt bei der Entwicklung einer nicht-invasiven pränatalen Diagnostik mittels fetaler Zellen aus mütterlichem peripherem Blut in Aussicht. Dazu muss das Potential von 4B9, fetale Erythroblasten oder Erythrozyten von adulten Zellen zu unterscheiden, durch die Analyse des Blutes Schwangerer überprüft werden.

6 LITERATUR

- Al-Mufti, R., Hambley, H., Farzaneh, F., und Nicolaidis, K. H. 2001. **Distribution of fetal and embryonic hemoglobins in fetal erythroblasts enriched from maternal blood.** *Haematologica*. 86:357-62.
- Alter, B. P. 1994. **Biology of erythropoiesis.** *Ann N Y Acad Sci*. 731:36-47.
- Alter, R., O'Kane-Murphy, B., Korth, D., Costas, P., Wang, P. N., Welniak, L., Grealley, J. F., Kuszynski, C., Warkentin, P. I., und Jackson, J. D. 1994. **Characterization of hematopoietic stem cells in human cord blood.** *Prog Clin Biol Res*. 389:393-8.
- Alvarez, F. V., Olander, J., Crimmins, D., Prieto, B., Paz, A., Alonso, R., Porter, S., Hess, J., Crist, R. D., Landt, Y., und Ladenson, J. H. 1999. **Development, characterization, and use of monoclonal antibodies made to antigens expressed on the surface of fetal nucleated red blood cells.** *Clin Chem*. 45:1614-20.
- Andersson, L. C., Jokinen, M., und Gahmberg, C. G. 1979. **Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562.** *Nature*. 278:364-5.
- Belvedere, O., Feruglio, C., Malangone, W., Bonora, M. L., Donini, A., Dorotea, L., Tonutti, E., Rinaldi, C., Pittino, M., Baccarani, M., Del Frate, G., Biffoni, F., Sala, P., Hilbert, D. M., und Degrossi, A. 1999. **Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34+ cells.** *Blood Cells Mol Dis*. 25:141-6.
- Benz, E. J., Jr., Murnane, M. J., Tonkonow, B. L., Berman, B. W., Mazur, E. M., Cavallesco, C., Jenko, T., Snyder, E. L., Forget, B. G., und Hoffman, R. 1980. **Embryonic-fetal erythroid characteristics of a human leukemic cell line.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:3509-13.
- Bianchi, D. W. 2000. **Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 92:103-108.

- Bianchi, D. W., Flint, A. F., Pizzimenti, M. F., Knoll, J. H., und Latt, S. A. 1990. **Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:3279-83.
- Bianchi, D. W., Williams, J. M., Sullivan, L. M., Hanson, F. W., Klinger, K. W., und Shuber, A. P. 1997. **PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies.** *Am J Hum Genet.* 61:822-9.
- Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Yih, M. C., Flint, A. F., Geifman, O. H., Erikson, M. S., und Williams, J. M. 1993. **Erythroid-specific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood.** *Prenat Diagn.* 13:293-300.
- Bischoff, F. Z., Hahn, S., Johnson, K. L., Simpson, J. L., Bianchi, D. W., Lewis, D. E., Weber, W. D., Klinger, K., Elias, S., Jackson, L. G., Evans, M. I., Holzgreve, W., und de la Cruz, F. 2003. **Intact fetal cells in maternal plasma: are they really there?** *Lancet.* 361:139-40.
- Cha, D. H., Farina, A., Bianchi, D. W., und Johnson, K. L. 2004. **ROC analysis of an erythroblast morphologic scoring system to improve identification of fetal cells in maternal blood.** *Prenat Diagn.* 24:117-20.
- Chen, H. P., Wang, T. R., Xu, J. P., Xu, X. Y., Dangol, S. D., und He, G. F. 2004. **Fetal origin of single nucleated erythroblasts and free DNA in the peripheral blood of pregnant women.** *Int J Gynaecol Obstet.* 85:1-5.
- Cheung, M. C., Goldberg, J. D., und Kan, Y. W. 1996. **Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood.** *Nat Genet.* 14:264-8.
- Cho, J. H., und Chi, J. G. 1995. **Differential expression of leukocyte common antigen in human fetal lymphoid organs.** *J Korean Med Sci.* 10:14-23.
- Choolani, M., O'Donnell, H., Campagnoli, C., Kumar, S., Roberts, I., Bennett, P. R., und Fisk, N. M. 2001. **Simultaneous fetal cell identification and diagnosis by epsilon-globin chain immunophenotyping and chromosomal fluorescence in situ hybridization.** *Blood.* 98:554-7.

- Choolani, M., O'Donoghue, K., Talbert, D., Kumar, S., Roberts, I., Letsky, E., Bennett, P. R., und Fisk, N. M. 2003. **Characterization of first trimester fetal erythroblasts for non- invasive prenatal diagnosis.** *Mol Hum Reprod.* 9:227-35.
- Collarini, E. J., Cain, C. A., Gammon, D., Harriman, B., Magee, K., Du, G., Schueler, P. A., und Mahoney, W. C. 2001. **Comparison of methods for erythroblast selection: application to selecting fetal erythroblasts from maternal blood.** *Cytometry.* 45:267-76.
- Fornas, O., Domingo, J. C., Marin, P., und Petriz, J. 2002. **Flow cytometric-based isolation of nucleated erythroid cells during maturation: An approach to cell surface antigen studies.** *Cytometry.* 50:305-12.
- Fuhr, J. E., Bamberger, E. G., Lozzio, C. B., und Lozzio, B. B. 1981. **Induction of hemoglobin synthesis in original K 562 cell line.** *Blood Cells.* 7:389-99.
- Gänshirt, D., Smeets, F. W., Dohr, A., Walde, C., Steen, I., Lapucci, C., Falcinelli, C., Sant, R., Velasco, M., Garritsen, H. S., und Holzgreve, W. 1998. **Enrichment of fetal nucleated red blood cells from the maternal circulation for prenatal diagnosis: experiences with triple density gradient and MACS based on more than 600 cases.** *Fetal Diagn Ther.* 13:276-86.
- Gubin, A. N., Njoroge, J. M., Bouffard, G. G., und Miller, J. L. 1999. **Gene expression in proliferating human erythroid cells.** *Genomics.* 59:168-77.
- Gulati, G. L., und Hyun, B. H. 1994. **Blood smear examination.** *Hematol Oncol Clin North Am.* 8:631-50.
- Hann, I. M. 1994a. **Development of blood in the fetus.** *In Fetal and Neonatal Haematology.* 5-13.
- Hann, I. M. 1994b. **The normal blood picture in the fetus.** *In Fetal and Neonatal Haematology.* I. Hann, editor. 29-40.
- Harlow, E., und Lane, D. 1988. **Antibodies - A Laboratorial Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory.

- Hennerbichler, S., Schmied, R., Petek, E., Kroisel, P. M., Pertl, B., Tiran, B., Dohr, G., Wintersteiger, R., und Sedlmayr, P. 2002. **Detection and relocation of cord blood nucleated red blood cells by laser scanning cytometry.** *Cytometry.* 48:87-92.
- Ho, S. S., O'Donoghue, K., und Choolani, M. 2003. **Fetal cells in maternal blood: state of the art for non-invasive prenatal diagnosis.** *Ann Acad Med Singapore.* 32:597-603; quiz 604.
- Huie, M. A., Cheung, M. C., Muench, M. O., Becerril, B., Kan, Y. W., und Marks, J. D. 2001. **Antibodies to human fetal erythroid cells from a nonimmune phage antibody library.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:2682-2687.
- Jackson, L. 2003. **Fetal cells and DNA in maternal blood.** *Prenat Diagn.* 23:837-46.
- Kitagawa, M., Sugiura, K., Omi, H., Akiyama, Y., Kanayama, K., Shinya, M., Tanaka, T., Yura, H., und Sago, H. 2002. **New technique using galactose-specific lectin for isolation of fetal cells from maternal blood.** *Prenat Diagn.* 22:17-21.
- Kohler, G., und Milstein, C. 1975. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature.* 256:495-7.
- Lewis, D. E., Schober, W., Murrell, S., Nguyen, D., Scott, J., Boinoff, J., Simpson, J. L., Bischoff, F. Z., und Elias, S. 1996. **Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry.** *Cytometry.* 23:218-27.
- Lo, Y. M., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M., Wainscoat, J. S., Johnson, P. J., Chang, A. M., und Hjelm, N. M. 1998. **Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis.** *Am J Hum Genet.* 62:768-75.
- Loken, M. R., Shah, V. O., Dattilio, K. L., und Civin, C. I. 1987. **Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development.** *Blood.* 69:255-63.
- Lozzio, B. B., und Lozzio, C. B. 1979. **Absence of erythrocytic components in the original K562 cell line.** *Int J Cancer.* 24:513.

- Lozzio, C. B., und Lozzio, B. B. 1975. **Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.** *Blood.* 45:321-34.
- Mavrou, A., Kolialexi, A., Antsaklis, A., Korantzis, A., und Metaxotou, C. 2003. **Identification of fetal nucleated red blood cells in the maternal circulation during pregnancy using anti-hemoglobin-epsilon antibody.** *Fetal Diagn Ther.* 18:309-13.
- Mechetner, E. B., Tonevitsky, A. G., Ievleva, E. S., Rozinova, E. N., und Popova, O. N. 1987. **Identification of a human erythroid cell surface antigen by monoclonal antibody HAE9.** *Exp Hematol.* 15:355-9.
- Metcalf, D., und Moore, M. A. 1970. **Factors modifying stem cell proliferation of myelomonocytic leukemic cells in vitro and in vivo.** *J Natl Cancer Inst.* 44:801-8.
- Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Druzin, M. L., Giardina, P. J., Zsebo, K. M., und Adamson, J. W. 1992. **Long-term generation of colony-forming cells in liquid culture of CD34+ cord blood cells in the presence of recombinant human stem cell factor.** *Blood.* 79:2620-7.
- Nagao, M., Kamo, H., Akiguchi, I., und Kimura, J. 1992. **Soybean agglutinin binds commonly to a subpopulation of small-diameter neurons in dorsal root ganglion, vascular endothelium and microglia in human spinal cord.** *Neurosci Lett.* 142:131-4.
- Nagler, A., Morecki, S., und Slavin, S. 1999. **The use of soybean agglutinin (SBA) for bone marrow (BM) purging and hematopoietic progenitor cell enrichment in clinical bone-marrow transplantation.** *Mol Biotechnol.* 11:181-94.
- Nakamura, K., Okano, H., Kaku, M., und Motomura, S. 1985. **In vitro differentiation of a human erythroid cell line (KMOE) induced by some metabolic inhibitors.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 110:203-8.
- Navenot, J. M., Muller, J. Y., und Blanchard, D. 1997. **Expression of blood group i antigen and fetal hemoglobin in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.** *Transfusion.* 37:291-7.

- Newman, R., Schneider, C., Sutherland, R., Vodinelich, L., und Greaves, M. F. 1982. **The transferrin receptor**. In Elsevier Biomedical Press.
- Okano, H., Okamura, J., Yagawa, K., Tasaka, H., und Motomura, S. 1981. **Human erythroid cell lines derived from a patient with acute erythremia**. *J Cancer Res Clin Oncol*. 102:49-55.
- Okumura, N., Tsuji, K., und Nakahata, T. 1992. **Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors**. *Blood*. 80:642-50.
- Oudejans, C. B., Tjoa, M. L., Westerman, B. A., Mulders, M. A., Van Wijk, I. J., und Van Vugt, J. M. 2003. **Circulating trophoblast in maternal blood**. *Prenat Diagn*. 23:111-6.
- Peault, B. 1996. **Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited**. *J Hematother*. 5:369-78.
- Prieto, B., Candenias, M., Ladenson, J. H., und Alvarez, F. V. 2002. **Comparison of different CD71 monoclonal antibodies for enrichment of fetal cells from maternal blood**. *Clin Chem Lab Med*. 40:126-31.
- Reid, M. E., und Lomas-Francis, C. 2004. **II blood group collection**. In *The Blood Group Antigen, Facts Book Series*. Elsevier Academic Press, New York. 471-477; 486-488.
- Rodriguez De Alba, M., Palomino, P., Gonzalez-Gonzalez, C., Lorda-Sanchez, I., Ibanez, M. A., Sanz, R., Fernandez-Moya, J. M., Ayuso, C., Diaz-Recasens, J., und Ramos, C. 2001. **Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: practical comparative evaluation of the first and second trimesters**. *Prenat Diagn*. 21:165-70.
- Rohen, J. W., und Lütjen-Drecoll, E. 2002. **Körperhöhlen und Organsysteme**. In *Funktionelle Embryologie: Die Entwicklung der Funktionssysteme des menschlichen Organismus*. Schattauer GmbH, Verlag für Medizin und Naturwissenschaften.

- Rüfer, A. 2003. **Myeloproliferative Syndrome: Polycythaemia vera, essentielle Thrombozytämie, Osteomyelofibrose.** *Schweiz Med Forum.* 43:1026-1033.
- Savion, S., Carp, H., Shepshelovich, J., Irlin, J., Kostykov, M., Fein, A., und Toder, V. 1997. **Use of antibodies against the human antigen of erythroblasts for the detection of nucleated erythrocytes in the maternal circulation.** *Biol Neonate.* 71:126-30.
- Sekizawa, A., Yokokawa, K., Sugito, Y., Iwasaki, M., Yukimoto, Y., Ichizuka, K., Saito, H., und Okai, T. 2003. **Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta.** *Hum Genet.* 113:307-10.
- Shulman, L. P. 2003. **Fetal cells in maternal blood.** *Curr Womens Health Rep.* 3:47-54.
- Sinowatz, F., Seitz, J., Bergmann, M., Petzoldt, U., und Fanghänel, J. 1999. **Blut.** In Embryology des Menschen. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH. 157-161.
- Tavassoli, M. 1991. **Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview.** *Blood Cells.* 17:269-81.
- Telen, M. J. 2000. **Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease.** *Semin Hematol.* 37:130-42.
- Timens, W., und Kamps, W. A. 1997. **Hemopoiesis in human fetal and embryonic liver.** *Microsc Res Tech.* 39:387-97.
- Ulmer, J. B., Dolci, E. D., und Palade, G. E. 1989. **Glycophorin expression in murine erythroleukaemia cells.** *J Cell Sci.* 92 (Pt 2):163-71.
- Valerio, D., Altieri, V., Antonucci, F. R., und Aiello, R. 1997. **Characterization of fetal haematopoietic progenitors circulating in maternal blood of seven aneuploid pregnancies.** *Prenat Diagn.* 17:1159-69.
- Vona, G., Beroud, C., Benachi, A., Quenette, A., Bonnefont, J. P., Romana, S., Dumez, Y., Lacour, B., und Paterlini-Brechot, P. 2002. **Enrichment,**

- immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood.** *Am J Pathol.* 160:51-8.
- Wachtel, S. S., Sammons, D., Twitty, G., Utermohlen, J., Tolley, E., Phillips, O., und Shulman, L. P. 1998. **Charge flow separation: quantification of nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy.** *Prenat Diagn.* 18:455-63.
- Weinberg, R. S., He, L. Y., und Alter, B. P. 1992. **Erythropoiesis is distinct at each stage of ontogeny.** *Pediatr Res.* 31:170-5.
- Winters, J. L., und Howard, D. S. 2001. **Red blood cell antigen changes in malignancies: case report and review.** *Journal of Blood Group Serology and Education.* 17.
- Zheng, Y. L., Zhen, D. K., DeMaria, M. A., Berry, S. M., Wapner, R. J., Evans, M. I., Copeland, D., Williams, J. M., und Bianchi, D. W. 1997. **Search for the optimal fetal cell antibody: results of immunophenotyping studies using flow cytometry.** *Hum Genet.* 100:35-42.
- Ziegler, B. L., Muller, R., Valtieri, M., Lamping, C. P., Thomas, C. A., Gabbianelli, M., Giesert, C., Buhring, H. J., Kanz, L., und Peschle, C. 1999. **Unicellular-unilineage erythropoietic cultures: molecular analysis of regulatory gene expression at sibling cell level.** *Blood.* 93:3355-68.

7 ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Erythropoese	14
Abbildung 2: Phasen der Hämoglobinbildung und Erythropoese während der Fetalentwicklung des Menschen.	15
Abbildung 3: Differenzierung erythroider Zellen	17
Abbildung 4: Expression von Oberflächenmarkern auf fetalen und adulten erythroiden Zellen	43
Abbildung 5: Unterscheidung kernhaltiger und kernloser Zellen mittels LDS 751	47
Abbildung 6: Verteilung von Leukozytensubpopulationen in Nabelschnurblut	48
Abbildung 7: Identifizierung erythroider Vorläuferzellen in Nabelschnurblut	49
Abbildung 8: Präselektionierung erythroider Zellen zum Antikörper-Screening	50
Abbildung 9: Antikörper produzierende Hybridomaklone 4B8, 4B9, 5D10	51
Abbildung 10: Identifizierung der 5D10-positiven Leukozytensubpopulation	52
Abbildung 11: Ermittlung des Isotyps für 4B8, 4B9 und 5D10	53
Abbildung 12: Untersuchung der Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an Blutgruppenantigene	54
Abbildung 13: Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an K-562	55
Abbildung 14: Bindung von 4B8, 4B9 und 5D10 an KMOE-2	56
Abbildung 15: Konkurrenz von 4B8, 4B9 und 5D10 zur Antigencharakterisierung	57
Abbildung 16: Analyse der Bindung von 4B9 und 5D10 an adulte Leukozyten	59
Abbildung 17: Expression erythroider Marker auf vitalen MNCs aus adultem Blut.	60
Abbildung 18: Bindung von 4B9 an Knochenmarkzellen	61
Abbildung 19: Expression erythroider Marker auf MNCs aus adultem Knochenmark	62
Abbildung 20: Analyse der in adultem Knochenmark 4B9-positiven Population	63
Abbildung 21: Immunzytochemische Analyse von 4B9 an adulten Knochenmarkzellen	64
Abbildung 22: Vergleich der Bindung erythroider Marker auf fetalen und adulten Zellen	66
Abbildung 23: 4B9-Expression in einer Blutinsel auf dem Dottersack	67
Abbildung 24: Bindung von 4B9 an NRBCs aus fetaler Leber	69
Abbildung 25: Bindung von 4B9 an Zellen fetalen Knochenmarks	70
Abbildung 26: Analyse von Zellen aus fetalem peripherem Blut	71
Abbildung 27: Untersuchung der Bindung von 4B9 an MNCs aus Nabelschnurblut	73
Abbildung 28: Phänotypisierung fetaler erythroider Zellen	75

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antigenexpression auf MNCs aus Nabelschnurblut und adultem Blut.....	38
Tabelle 2: Prozentualer Anteil an Erythroblasten in Nabelschnurblut	39
Tabelle 3: Übersicht der Untersuchung fetaler und adulter Gewebe.....	67
Tabelle 4: Vergleich der Expression von bekannten Marker und 4B9 auf MNCs aus Nabelschnurblut.....	69
Tabelle 5: Expression des 4B9-Antigens in der fetalen Erythropese zum Zeitpunkt der Geburt im Vergleich zu beschriebenen Antigenen.....	71
Tabelle 6: Expression des 4B9-Antigens im Verlauf der Ontogenese.....	74

7.3 Abkürzungen

7-AAD	7-Actino-aminomycin D
Abb.	Abbildung
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
BFU – E	burst-forming unit - erythroid
BSA	bovine serum albmin; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CFU – E	colony-forming unit - erythroid
d. h.	das heißt
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTAF	4'-6-Diamidino-2-Phenylindole
FACS	fluorescence-activated cell sorter; Durchflusszytometer
FCS	fetal calf serum; fetales Kälberserum
FISH	fluorescence in situ hybridization
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FSC	forward scattered light; Vorwärtsstreulicht
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GEMM	granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HS	Humanes AB-Serum
Ig	Immunglobulin
kDa	kilo-Dalton
MACS	magnetic cell sorting; magnetische Zellsortierung
min	Minuten
MNCs	mononuclear cells
NRBC	nucleated red blood cell; kernhaltige erythroide Vorläuferzellen
PBS	Phosphate-buffered Saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumjodid
RBC	red blood cell
R-PE	Phycoerythrin

rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro minute
RT	Raumtemperatur
SBA	Sojabohnenagglutinin
sec	Sekunden
SSC	side scattered light; Seitwärtsstreulicht
SSW	Schwangerschaftswoche
STR	short tandem repeats (kurze Sequenzwiederholungen)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered Saline, Tris-gepufferte Saline
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
ÜN	Über Nacht
Vgl.	Vergleich
z.B.	zum Beispiel

7.4 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Tagungen präsentiert:

Zimmermann, S., Mönkemeyer, M., Stachelhaus, S., Hollmann, C., 2004. 4-Colour Flow Cytometric Analysis – A Tool to Screen Markers for the Selection of Nucleated Red Blood Cells. International Society for Analytical Cytology (ISAC) XXII. International Congress, 22. – 27. Mai 2004, Montpellier, France. (Vortrag); abstract in Cytometry, Volume 59A, Number 1, May 2004.

Zimmermann, S., Hollmann, C., Stachelhaus, S., 2004. Monoclonal Antibodies for the Differentiation of Fetal and Adult Erythroid Blood Cells. 12th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, International Society for Prenatal Diagnosis, 24. – 27. Juni 2004. (Poster)

7.5 Dank

Der *AdnaGen AG* danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit zur Durchführung der erforderlichen Arbeiten.

Herrn *Prof. Dr. Bernd Otto* und Herrn *Prof. Dr. Walter H. Müller* danke ich vielmals für die Übernahme von Referat und Korreferat sowie für ihr großes Engagement.

Mein ganz besonderer Dank gilt *Herrn Dr. Stefan Stachelhaus* und *Frau Dr. Christiane Hollmann* für eine hervorragende Betreuung, für die vielen „speziellen“ Diskussionen und für das Vertrauen, das sie durch ihre Unterstützung zeigten.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei den Hebammen der Geburtsstation der *Paracelsus-Klinik* in Langenhagen für die große Hilfsbereitschaft, Probenmaterial zur Verfügung zu stellen. Ich danke vielmals *Herrn Prof. E. Weber* und *Frau R. Medek*, Labsoft AG in Halle, für die sehr angenehme Zusammenarbeit. Weiterhin danke ich *Herrn Prof. R. Parwaresch*, Inst. für Hämatopathologie der Universität Kiel, für die Bereitstellung von Probenmaterial und die Hilfe bei der Untersuchung von Geweben. Außerdem bedanke ich mich bei *Herrn Dr. K. Kamino* und Mitarbeitern, Inst. für Zell- und Molekularpathologie der Med. Hochschule Hannover sowie bei *Herrn Prof. P. Sedlmayr* und Mitarbeitern, Inst. für Histologie u. Embryologie der Universität Graz, für die Unterstützung beim Erlernen histologischer Techniken.

Ein großes „Danke schön“ an *Maren* für die ganz besondere Zusammenarbeit – in guten wie in schlechten Zeiten. Weiterhin danke ich *Katrin* für Ihre Unterstützung, sowie *Tanja* und *Silke L.* für die sehr gute und entspannte Stimmung im Labor. Weiterhin danke ich *Veit* für die Nachhilfe in italienischer Esskultur sowie für das nahezu tägliche Studium der Inhaltsstoffe von Nahrungsmitteln. Außerdem großen Dank an *Renate, Stefan, Christiane* und *Veit* für das Korrektur lesen, sowie an meine (Ex-) Kollegen *Kati, Constanze, Verena, Michael, Bertha, Mirco, Axel, Herrn Albert, Sigg, Thomas, Nicole* und *Pia* für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders danke ich *Igor* für seine unermüdliche Unterstützung und für sein Vertrauen in mich, wodurch diese Arbeit überhaupt fertig gestellt werden konnte

