

Vergleichende methodische Untersuchung zur Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe monoklonaler Antikörper

P. Mallmann, U. D. Koenig

Arbeitsgruppe für Tumor- und Reproduktionsimmunologie, Universitäts-Frauenklinik Bonn (Direktor: Prof. Dr. D. Krebs)

Zusammenfassung:

Zur Phänotypisierung funktionell differenter Lymphozytensubpopulationen werden eine Vielzahl monoklonaler Antikörper kommerziell angeboten, deren Qualität und Vergleichbarkeit in der vorliegenden Untersuchung überprüft werden sollte. Hierzu wurden die Lymphozyten von 40 jungen freiwilligen Blutspendern mit Hilfe der folgenden monoklonalen Antikörper markiert. Zur Identifizierung der Gesamt-T-Lymphozyten: Quantigen T und B cell assay (Biorad, Mechelen, Belgium), BMA 030 (Behring-Werke, Marburg) und OKT 11 (Ortho, New Jersey, USA); der T-Helfer/Inducer Zellen: Quantigen T4/T8 cell assay (Biorad), BMA 040 (Behring-Werke), Anti-Leu 3a/3b (Becton Dickinson, Heidelberg) und OKT 4 (Ortho); der T-Suppressor-/zytotoxischen Zellen: Quantigen T4/T8 cell assay (Biorad), BMA 081 (Behring-Werke), Anti-Leu 2a/2b (Becton Dickinson) und OKT 8 (Ortho). Es zeigte sich, daß bei der Bestimmung der T-Helfer-/Inducer-Zellen der Anteil der Quantigen T4 und Anti-Leu 3a/3b positiven Zellen ($p < 0,05$) gegenüber dem der OKT 4 und Behring BMA 040 positiven Zellen erniedrigt ist. Desgleichen lag bei Bestimmung der T-Suppressor-/zytotoxischen Zellen der Anteil der Quantigen T8 und Anti-Leu 2a/2b positiven Zellen deutlich unter dem der BMA 081 und OKT 8 positiven Zellen. Bei der klinischen Interpretation der Ergebnisse sollten die methodisch bedingten Unterschiede unbedingt berücksichtigt werden.

Schlüsselwörter:

Lymphozytensubpopulationen – monoklonale Antikörper

Summary:

For the determination of functional lymphocyte subpopulations a plurality of monoclonal antibodies are available commercially, whose quality should be examined in the following investigation. Peripheral blood lymphocytes of 40 young healthy volunteers have been identified using the following monoclonal antibodies. For the identification of total lymphocytes: Quantigen T and B cell assay (Biorad, Mechelen, Belgium), BMA 030 (Behring-Werke, Marburg, FRG) and OKT 11 (Ortho, New Jersey, USA); of T-helper/inducer cells: Quantigen T4/T8 cell assay (Biorad), BMA 040 (Behring-Werke), Anti-Leu 3a/3b (Becton Dickinson, Heidelberg, FRG) and OKT 4 (Ortho); of T-suppressor/cytotoxic cells: Quantigen T4/T8 cell assay (Biorad), BMA 081 (Behring-Werke), Anti-Leu 2a/2b (Becton Dickinson) and OKT 8 (Ortho). We were able to show that the percentage of Quantigen T4 and Anti-Leu 3a/3b positive T-helper/inducer cells ($p < 0,05$) was lower than that of OKT 4 and BMA 040 positive cells. Similarly the percentage of Quantigen T8 and Anti-Leu 2a/2b positive cells was lower than the percentage of BMA 081 and OKT 8 positive cells. The clinical interpretation should take these methodically dependent differences into consideration.

Keywords:

Lymphocyte subpopulations – monoclonal antibodies

Einleitung

Durch die grundlegenden Arbeiten von Köhler und Milstein (1) ist die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen spezifische antigene Determinanten möglich geworden. Neben zahlreichen anderen Anwendungsgebieten erlauben monoklonale Antikörper, durch den Nachweis spezifischer Strukturen auf der Lymphozytenmembran, über die rein morphologische Typisierung hinaus die Identifizierung funktionell differenter Subgruppen von Lymphozyten.

Die wesentlichen, an der Regulation der Immunantwort beteiligten Lymphozytenpopulationen sind durch die Ex-

pression bestimmter Glycoproteine an der Zelloberfläche charakterisiert und konnten durch folgende monoklonale Antikörper definiert und in verschiedenen Testsystemen funktionell identifiziert werden:

1. Der T101-Antikörper reagiert mit einem T-Zell-membranantigen mit einem Molekulargewicht von 65000 Dalton, das bei mehr als 90% aller E-Rosettenpositiven Zellen, 95% der Thymozyten und 10% der Knochenmarkszellen zu finden ist (2).
2. Der T4-Antikörper reagiert mit einem 62000 Dalton Membranantigen, das bei 50-65% der peripheren zirkulierenden T-Lymphozyten, 75% der Thymozyten und 15% der Splenozyten zu finden ist und mit einer Helfer/Indu-

cer-Funktion der T-Lymphozytensubpopulationen assoziiert ist (3).

3. Der T8-Antikörper reagiert mit einem Lymphozytenmembranantigen, das sich aus zwei Komponenten mit einem Molekulargewicht von 32000 und 43000 Dalton zusammensetzt und bei 20–35% der peripheren T-Lymphozyten, 80% der Thymozyten und 15% der Splenozyten gefunden wird. Das Vorhandensein dieses Antigens ist mit der Suppressorfunktion und Zytotoxizität der T-Lymphozytensubpopulationen assoziiert (4).

Das Testprinzip besteht darin, daß die Lymphozytensubpopulationen durch Inkubation der isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen subgruppenspezifische antigene Determinanten der Lymphozytenmembran identifiziert und anschließend entweder mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Immunglobulin oder durch Bindung des monoklonalen Antikörpers an Polyacrylamidgelpartikel („Microbeads“) sichtbar gemacht werden. Zwischenzeitlich hat sich diese Technik zu einer Standardmethode entwickelt und es werden von zahlreichen Herstellern monoklonale Antikörper zur Bestimmung der wesentlichen, auch klinisch interessanten Lymphozytensubpopulationen kommerziell angeboten. Die nach unseren Erfahrungen derzeit gebräuchlichsten monoklonalen Antikörper werden von folgenden Herstellern angeboten: Ortho Diagnostics, Becton Dickinson, Behring-Werke und Biorad Laboratories.

Die Phänotypisierung von Lymphozytensubpopulationen hat nicht nur in der Forschung, sondern auch in der klinisch-immunologischen Routinediagnostik, insbesondere bei der Diagnose von Autoimmunerkrankungen (6), in der Onkologie (7), bei der Verlaufskontrolle unter Zytostatikatherapie und bei der Früherkennung von Abstoßungskrisen nach Transplantationen (8) große Bedeutung erlangt. Diese breite Anwendung macht eine Qualitätskontrolle unbedingt erforderlich.

Es war daher Ziel der folgenden Untersuchung, zu überprüfen, inwieweit die mit Hilfe verschiedener monoklonaler Antikörper ermittelten Ergebnisse vergleichbar sind.

Material und Methode

Hierzu wurde 40 gesunden, freiwilligen männlichen und weiblichen Blutspendern der Altersklasse zwischen 18 und 25 Jahren morgens jeweils 20 ml venöses Heparinblut entnommen und die mononukleären peripheren Blutzellen durch Dichtegradientenzentrifugation entsprechend der Methode von Boyum (5) isoliert.

Aus der auf 5000 Zellen pro μ l eingestellten Lymphozytensuspension wurden die entsprechenden Aliquote entnommen und nach den Arbeitsvorschriften der Hersteller mit den folgenden monoklonalen Antikörpern markiert.

Zur Identifizierung der Gesamt-T-Lymphozyten:

- Quantigen T und B-Cell Assay (Biorad, Mechelen, Belgien),
- BMA 030 (Behring-Werke, Marburg),
- OKT 11 (Ortho, New Jersey, USA).

Zur Identifizierung der T-Helfer/Inducer Zellen:

- Quantigen T4/T8 Cell Assay (Biorad, Richmond, USA),
- BMA 040 (Behring-Werke, Marburg),
- Anti-Leu 3a/3b (Becton Dickinson, Heidelberg),
- OKT 4 (Ortho, New Jersey, USA);

Zur Identifizierung der T-Suppressor-/zytotoxischen Zellen:

- Quantigen T4/T8 Cell Assay (Biorad, Richmond, USA),
- BMA 081 (Behring-Werke, Marburg),
- Anti-Leu 2a/2b (Becton Dickinson, Heidelberg),
- OKT 8 (Ortho, New Jersey, USA).

Die monoklonalen Antikörper der Firma Biorad (Quantigen T und B Cell Assay und Quantigen T4/T8 Cell Assay) sind mit unterschiedlich gefärbten Microbeads gekoppelt und bilden bei Bindung an die jeweiligen Lymphozytenpopulation Rosetten aus, wobei eine Rosette definiert ist als jede Zelle mit 3 oder mehr Microbeads an ihrer Oberfläche. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

Bei den übrigen verwendeten monoklonalen Antikörpern sind zur Sichtbarmachung sogenannte „Second-Anti-

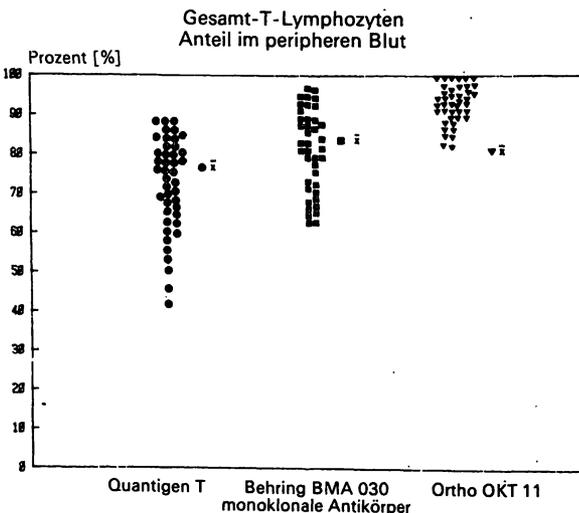


Abb. 1: Bestimmung der Gesamt-T-Lymphozyten im peripheren Blut mit Hilfe verschiedener monoklonaler Antikörper

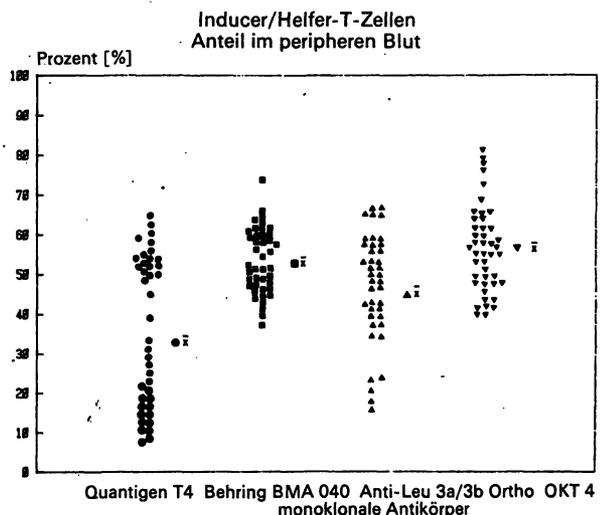


Abb. 2: Bestimmung der Inducer/Helfer-T-Zellen im peripheren Blut mit Hilfe verschiedener monoklonaler Antikörper

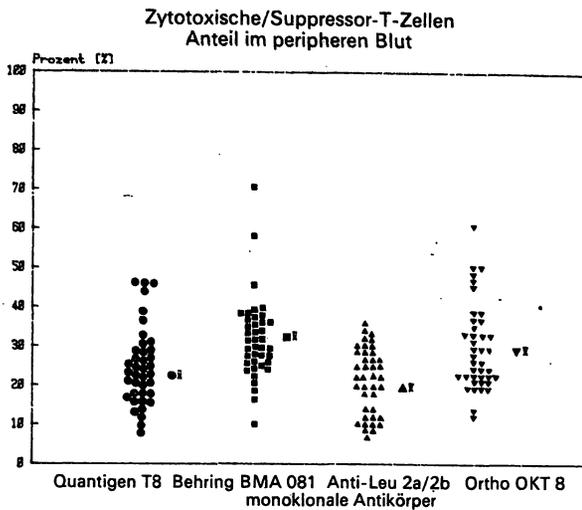


Abb. 3: Bestimmung der zytotoxischen/Suppressor-T-Zellen im peripheren Blut mit Hilfe verschiedener monoklonaler Antikörper

body-Techniken“ notwendig. Hierzu werden zunächst durch Waschen die überschüssigen Antikörper entfernt und dann durch erneute Inkubation die Lymphozyten mit Fluoreszein-gebundenem Anti-Maus-Serum (Bionetics, Kensington, USA) markiert. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop.

Es wurden im zweifachen Parallelansatz jeweils 200 Zellen differenziert und der relative Anteil der jeweiligen Lymphozytensubpopulation in Prozent (%) angegeben.

Ergebnisse

Der Anteil der Gesamt-Lymphozyten war bei allen verwendeten monoklonalen Antikörpern nahezu identisch, lediglich bei Verwendung des Quantigen T und B Cell Assays war der ermittelte Wert geringfügig erniedrigt (Abb. 1). Größere Unterschiede zeigten sich jedoch bei den übrigen untersuchten T-Lymphozytenpopulationen. Der Anteil der Quantigen T4 positiven T-Helfer/Inducer Zellen war signifikant ($p < 0,05$), der Anteil der Anti-Leu 3a/3b positiven Zellen war ebenfalls deutlich, jedoch nicht statistisch signifikant, gegenüber dem der OKT 4 und Behring BMA 040 positiven Zellen erniedrigt. Die Schwankungsbreite war bei Verwendung von Quantigen T4/T8 und Anti-Leu 3a/3b auch deutlich größer (Abb. 2).

Auch bei der Bestimmung des Anteils der T-Suppressor-/zytotoxischen Zellen zeigten sich deutliche, wenn auch nicht statistisch zu sichernde Unterschiede in Abhängigkeit von den verwendeten monoklonalen Antikörpern. So lag der Anteil der Quantigen T8 und Anti-Leu 2a/2b positiven Zellen deutlich unter dem der BMA 081 und OKT 8 positiven Zellen (Abb. 3). Es bestand eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten r zwischen 0,5 und 0,7 zwischen dem Anteil der Quantigen T4- und Anti-Leu 3a/3b- und Quantigen T8- und Anti-Leu 2a/2b-positiven, sowie zwischen den BMA 040- und OKT 4- und den BMA 081- und OKT 8-positiven Zellen. In einer anderen Form der graphischen Darstellung werden die jeweiligen Unterschiede zwischen den verschiedenen Bestimmungsmethoden noch deutlicher (Abb. 4).

Lymphozytensubpopulationen Anteil im peripheren Blut

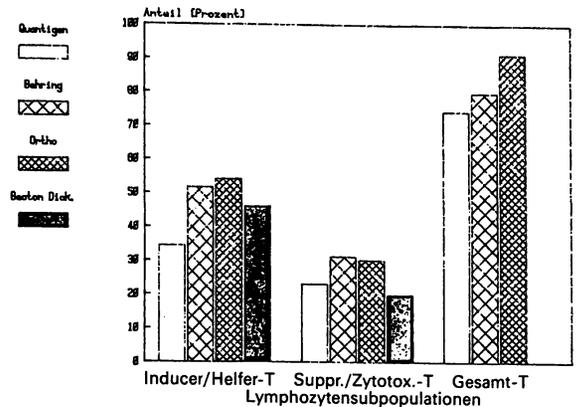


Abb. 4: Vergleich des mit Hilfe verschiedener monoklonaler Antikörper ermittelten Anteils von T-Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut

In Tab.1 sind die Ergebnisse und die jeweilige Standardabweichung im einzelnen aufgelistet. Eine Übersicht über das mit Hilfe der jeweiligen monoklonalen Antikörper ermittelte Verhältnis der T-Helfer und T-Suppressor Zellen, das bei bestimmten klinischen Fragestellungen besonders interessant ist, gibt Tab. 2.

Tab. 1: Anteil der mit Hilfe der angegebenen monoklonalen Antikörper bestimmten Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut (in Prozent)

	Mittelwert	Standardabweichung
Inducer/Helfer-T-Zellen		
Quantigen T4	34,40	20,04
Behring BMA 040	51,68	7,69
Anti-Leu 3a/3b	46,05	10,61
Ortho OKT 4	54,17	11,07
Zytotoxische/Suppressor-T-Zellen		
Quantigen T8	23,05	7,23
Behring BMA 081	31,17	10,27
Anti-Leu 2a/2b	19,80	7,22
Ortho OKT 8	30,17	10,18
Gesamt-T-Lymphozyten		
Quantigen T	74,36	8,45
Behring BMA 030	79,85	11,00
Ortho OKT 11	91,27	5,60

Tab. 2: Bestimmung des T4/T8-Verhältnisses mit Hilfe der verschiedenen monoklonalen Antikörper

Quantigen T4/T8	1,49
Behring BMA 040/081	1,65
Anti-Leu 3/2	2,32
Ortho OKT 4/OKT 8	1,79

Diskussion

Es konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, daß in Abhängigkeit von den verwendeten monoklonalen Antikörpern die Ergebnisse der Lympho-

zytensubpopulationsbestimmung z.T. erheblich differieren. Insbesondere bei Markierung der Lymphozyten mit Hilfe Microbead-gekoppelter monoklonaler Antikörper ist der Anteil der jeweiligen Lymphozytenpopulation deutlich erniedrigt. Diese Unterschiede scheinen zunächst unverständlich, da von den verwendeten monoklonalen Antikörpern lediglich subgruppenspezifische Epitope der Lymphozytenmembran erfaßt werden und somit die Gesamtzahl der als positiv identifizierten Zellen jeweils ungefähr gleich sein müßte. Möglicherweise wird durch Kopplung des monoklonalen Antikörpers an Microbeads deren Affinität gegenüber antigenen Strukturen der Lymphozytenmembran gestört, was den signifikant erniedrigten Anteil der Quantigen T4 und T8 positiven Zellen erklären könnte. Hier war zudem die Standardabweichung am größten. Eine weitere Erklärung könnte die zum Teil sehr unterschiedliche Qualität der Fluoreszenzmarkierung sein. Insbesondere bei Verwendung der monoklonalen Antikörper OKT 4 und der BMA-Serie traten zumeist erhebliche Schwierigkeiten bei der Auswertung auf, da die markierten Lymphozyten nur mit Schwierigkeiten identifiziert werden konnten. Probleme bereitete auch gelegentlich die farbliche Differenzierung zwischen Rosetten mit roten T4- und gelbbraunen T8-markierten Microbeads. Positiv fielen hingegen die monoklonalen Antikörper der Leu-Serie auf, bei denen sich die antikörperpositiven Lymphozyten eindeutig und mühelos identifizieren ließen.

Die klinische Interpretation der Ergebnisse der Lymphozytensubpopulationsbestimmung sollte somit unbedingt die methodisch bedingten Unterschiede berücksichtigen,

wobei die verwendeten Antikörper angegeben werden sollten. Eine Qualitätskontrolle ist erforderlich, um die mit Hilfe dieser neuen Methode ermittelten Ergebnisse der klinischen Medizin zugänglich zu machen. Vor einer unkritischen Weitergabe der Ergebnisse, ohne die Möglichkeit auf immunologische Kenntnisse zurückgreifen zu können, muß gewarnt werden.

Schrifttum:

1. KÖHLER, G., MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497 (1975).
2. ROYSTON, I. et al.: Human T cell antigens defined by monoclonal antibodies: the 65,000-Dalton antigen of T cells (T65) is also found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins, in: *Peptides of the Biological Fluids*. Pergamon, Oxford, 725-731.
3. HAYNES, B. F.: Human T lymphocyte antigens as defined by monoclonal antibodies. *Immunol. Rev.* 57, 127-161 (1981).
4. FAIRBANKS, T.: Current status of lymphocyte subpopulation testing in human. *Amer. J. Med. Techn.* 46, 471-478 (1980).
5. BOYUM, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, Suppl. 97, 77-89 (1968).
6. JABS, D. et al.: Identifying human lymphocyte subpopulations. *Lab. Management* 18, 33-39 (1980).
7. DILLMANN, R. O. et al.: Immunoincompetence in cancer patients. Assessment by in vitro stimulation tests and quantification of lymphocyte subpopulation. *Cancer* 53, 1484-1492 (1984).
8. STROBER, S.: T and B cells in immunologic diseases. *Amer. J. Clin. Path.*, 671-677 (1977).

Anschrift der Verfasser:

Dr. med. P. Mallmann
 Prof. Dr. med. U. D. Koenig
 Arbeitsgruppe für Tumor- und Reproduktionsimmunologie
 Universitäts-Frauenklinik
 5300 Bonn-Venusberg

Schrifttum zum Beitrag „Vergleichende methodische Untersuchung zur Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe monoklonaler Antikörper“ [Lab.med. 9: 123-128 (1985)].

1. FRIOU, G. J.: Clinical application of lupus serum-nucleoprotein reaction using the fluorescent antibody technique. *J. Clin. Invest.* 36, 890 (1957).
2. HOLBOROW, E. J., WEIR, D. M., JOHNSON, G. D.: A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Br. Med. J.* 2, 732-734 (1957).
3. NISENGARD, R. J.: Antinuclear antibodies: significance of titers, in: BEUTNER, E. H., CHORZELSKI, T. P., BEAN, S. F. (Hrsg.): *Immunopathology of the skin*, 387-398, sec. edition, a Wiley Medical Publication, New York (1979).
4. ABEGG, A., ENZLER, P., GROB, P. J.: Antikörper gegen native Desoxyribonucleinsäure ohne antinukleäre Antikörper. *Dtsch. Med. Wschr.* 105, 1273-1279 (1980).
5. STÖRCH, W.: *Immunfluoreszenz*, S. 114. Gustav Fischer Verlag, Jena (1979).
6. BURNHAM, Th. K.: Antinuclear Antibodies: a simplified classification of the nuclear immunofluorescent patterns, in: BEUTNER, E. H., CHORZELSKI, T. P., BEAN, S. F. (Hrsg.): *Immunopathology of the skin*, 381-386, sec. edition, a Wiley Medical Publication, New York (1979).
7. SEELIG, H. P.: Antikörper gegen Zellkernantigene, S. 42-45. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1983).
8. MCHARDY, K. C., HORNE, C. H. W., RENNIE, J. A. N.: Antinuclear antibody - negative systemic lupus erythematosus - how common? *J. Clin. Pathol.* 35, 1118-1121 (1982).
9. BARTHOLOMEW, B. A.: Antinuclear antibody tests as a clinically selected screening procedure. *Am. J. Clin. Pathol.* 61, 495-499 (1974).
10. RAUTERBERG, E. W.: Detection of anti-nuclear antibodies by either immunofluorescence microscopy or the FIAX system. Kongreß für Laboratoriumsmedizin, Juni 1981.
11. MADDISON, P. J.: ANA-negative SLE. *Clin. Rheum. Dis.* 8, 105-119 (1982).
12. FRIES, J. F., SIEGEL, R. C.: Testing the preliminary criteria for classification of SLE. *Ann. Rheum. Dis.* 32, 171-177 (1973).
13. WERNER, D., ZIMMERMANN, H. P., RAUTERBERG, E. W., SPALINGER, J.: Antibodies to the most tightly bound proteins in eukaryotic DNA. *Exp. Cell. Res.* 133, 149-157 (1981).
14. SEELIG, H. P.: Antikörper gegen Zellkernantigene, S. 34. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1983).
15. SCHOENFELD, Y., RAUCH, J., MASSICOTTE, H., DATTA, S. K., ANDRE-SCHWARTZ, J., STOLLAR, B. D., SCHWARTZ, R. S.: Polyspecificity of monoclonal lupus autoantibodies produced by human-human hybridomas. *N. Engl. J. Med.* 308, 414-420 (1983).
16. SEELIG, H. P.: Antikörper gegen Zellkernantigene, S. 37. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1983).