

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. M. Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. T. Göbel

Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen equine Leukozyten

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

von
Christian Umlauf
aus Forchheim

München 2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. T. Göbel
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Alexandra

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	S. 1
2	Literaturübersicht	S. 2
2.1	Equine Antigene und Antikörper	S. 3
2.2	Zytokine	S. 15
2.3	Klinische Anwendungsmöglichkeiten und Forschungsprojekte	S. 17
2.4	Kommerziell erhältliche Reagenzien	S. 20
3	Material und Methoden	S. 21
3.1	Tiere und Tierhaltung	S. 21
3.2	Präparation von Lymphozyten	S. 22
3.3	Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk)	S. 24
3.3.1	Immunisierung von Mäusen	S. 24
3.3.2	Kultivierung von Myelomzellen	S. 24
3.3.3	Zellfusion	S. 25
3.3.4	Kultivierung von Hybridomzellen, Klonierung, Nomenklatur	S. 27
3.3.5	Einfrieren und Auftauen von Hybridomzelllinien und Lymphozyten	S. 28
3.3.6	Reinigung monoklonaler Antikörper mittels G-Sepharose-Säule	S. 29
3.3.7	Konjugation monoklonaler Antikörper mit Biotin	S. 30
3.4	Methoden zur Charakterisierung der mAk	S. 31
3.4.1	Immunfluoreszenzfärbung und Analyse im Durchflusszytometer (FACScan)	S. 31
3.4.2	Proliferationsassay	S. 33
3.4.3	Immunpräzipitation	S. 35
3.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	S. 37
3.4.5	Analyse von mRNA stimulierter und unstimulierter Zellen	S. 38

4	Ergebnisse	S. 42
4.1	Übersicht	S. 42
4.2	MAk 4-13	S. 49
4.3	MAk 4-58	S. 54
4.4	MAk 5-50	S. 60
4.5	MAk 1-19	S. 62
4.6	MAk 6-39	S. 65
4.7	MAk 2-52	S. 68
4.8	MAk 4-36	S. 70
4.9	MAk 4-55	S. 72
4.10	MAk 6-5 und mAk 6-17	S. 74
4.11	MAk 4-39	S. 77
5	Diskussion	S. 79
5.1	Einleitung	S. 79
5.2	MAk 4-13	S. 80
5.3	MAk 4-58	S. 82
5.4	MAk 5-50	S. 83
5.5	B-Zell-spezifische Antikörper	S. 84
5.6	Panleukozytenmarker	S. 84
5.7	Weitere Antikörper	S. 85
5.8	Ausblick	S. 86
6	Zusammenfassung	S. 87
7	Summary	S. 88
Anhang A: Tabellen		S. 89
Anhang B: Verwendete Materialien und Geräte		S. 97
Literaturverzeichnis		S.101

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 4.1: Einteilung der PBL-Zellpopulationen im FACScan	S. 43
Abbildung 4.2: Immunpräzipitation mAk 4-13 und mAk 4-58	S. 47
Abbildung 4.3: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von Lymphknoten-Leukozyten (mAk 4-13)	S. 51
Abbildung 4.4: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 4-13)	S. 52
Abbildung 4.5: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von IEL (mAk 4-13)	S. 53
Abbildung 4.6: Proliferation von Leukozyten nach Stimulation mit mAk 4-58	S. 55
Abbildung 4.7: Nachweis der m-RNA verschiedener Zytokine in stimulierten und unstimulierten Zellen mittels PCR	S. 57
Abbildung 4.8: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse mit Lymphknoten-Leukozyten (mAk 4-58)	S. 59
Abbildung 4.9: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 5-50)	S. 61
Abbildung 4.10: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 1-19)	S. 64
Abbildung 4.11: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 6-39)	S. 66
Abbildung 4.12: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 2-52)	S. 69
Abbildung 4.13: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 4-36)	S. 71
Abbildung 4.14: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 4-55)	S. 73
Abbildung 4.15: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von Lymphknoten-Leukozyten und PBL. Vergleich von mAk 6-5 und mAk 6-17 mit mAk 1-19	S. 75
Abbildung 4.16: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse der mAk 6-17 und 4-13	S. 76
Abbildung 4.17: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 4-39)	S. 78

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 3.1: primäre Antikörper (Kontrollen)	S. 31
Tabelle 3.2: sekundäre Antikörper	S. 31
Tabelle 3.3: Zusätze für die Zellkultur	S. 33
Tabelle 3.4: Primer, synthetisiert durch MWG Biotech AG, Ebersberg	S. 40
Tabelle 3.5: PCR-Ansatz	S. 41
Tabelle 4.1: Ausbeute an mAks aus den einzelnen Fusionen	S. 42
Tabelle 4.2: Gruppeneinteilung von mAks anhand von Ergebnissen der Durchflusszytometrie mit PBL	S. 44
Tabelle 4.3: Periphere Blutleukozyten vor und nach Stimulation mit ConA	S. 45
Tabelle 4.4: Proliferationsassays mit PBL	S. 46
Tabelle 4.5: Proliferationsassay No. 60 (mAk 4-58-stimulierte Zellen mit/ohne erneuter Stimulation)	S. 56
Tabelle 5.1: Vergleich der Mittelwerte an positiven Zellen bei durchflusszytometrischen Untersuchungen in Prozent	S. 81
Tabelle A.1: Zusammenfassung der Resultate von ELAW II	S. 89
Tabelle A.2: Auszug aus dem Angebot der Fa. Serotec (Katalog 2003)	S. 91
Tabelle A.3: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzanalysen	S. 92
Tabelle A.4: Proliferationsassays mit mAk 4-58 (Messwerte)	S. 95

Abkürzungsverzeichnis:

CD	cluster of differentiation
COB	chronische obstruktive Bronchitis
ConA	Concanavalin A
DNA	desoxyribonucleic acid
(d)dNTP	(di)Desoxynukleotid-Triphosphat
Eq	equine
EqWC	equine workshop cluster
ELAW I	First Equine Leucocyte Antigen Workshop
ELAW II	Second Equine Leucocyte Antigen Workshop
EST	expressed sequence tag
FACScan	Fluorescence activated cell scanner
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IEL	Intestinale Intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
Lkn	Lymphknoten-Leukozyten
mAb	monoclonal antibody
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
M-MLV-RT	Moloney-Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PHA	Phythämagglutinin
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SA	Streptavidin
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SI	Stimulationsindex
TAQ-Polymerase	aus <i>Thermus aquaticus</i> isolierte Polymerase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
WS	Workshop-Nummer

1. Einleitung

Die Erforschung grundlegender biologischer Vorgänge, die präzise Diagnostik, die technische Reinigung von Substanzgemischen und die zielgenaue Therapie von Krankheiten sind nur einige der Anwendungsgebiete, die monoklonale Antikörper zu bieten haben.

Doch was in der Humanmedizin und der Grundlagenforschung, vor allem bei der Maus, längst etabliert ist, findet sich in der Tiermedizin nur spärlich. Vor allem für die Erforschung des equinen Immunsystems gibt es bisher nur wenige spezifisch bindende Antikörper [69].

Dabei steht nicht nur die unmittelbare Anwendung beim Pferd im Vordergrund, beispielsweise bei der Erforschung chronischer Atemwegserkrankungen [12].

Auch der Einsatz des Pferdes als Tiermodell gewinnt immer mehr an Bedeutung: So dient die häufig bei Araberfohlen auftretende "Severe combined immunodeficiency" (SCID) schon lange zur Analyse kombinierter Immundefizienzen [74][100]. Die Immunreaktionen bei der Infektion mit Lentiviren, wie dem Equinen Infektiösen Anämievirus (EIAV) [75][77] sind Gegenstand aktueller Untersuchungen. Außerdem sind in den letzten Jahren Parallelen zwischen der Rezidivierenden Uveitis des Menschen und der des Pferdes [20] nachgewiesen worden.

Da weiterführende Experimente ohne neue Werkzeuge in Form von monoklonalen Antikörpern kaum möglich sind, war es Ziel dieser Arbeit, die Palette der gegen Leukozyten des Pferdes gerichteten Antikörper zu erweitern, diese möglichst genau zu charakterisieren und mit bereits vorhandenen Antikörpern zu vergleichen.

Insgesamt wurden 78 monoklonale Maus-anti-Pferd-Antikörper hergestellt und untersucht. 12 davon konnte eine spezifische Bindung an Leukozyten bzw. ihren Subpopulationen zugewiesen werden. Unter anderem wurden Marker für Leukozyten und Granulozyten und spezifisch an T- und B-Lymphozyten bindende Antikörper etabliert.

2. Literaturübersicht

Lymphozyten spielen eine große Rolle im Immunsystem und leisten vielfältige Beiträge zu einer erfolgreichen Immunantwort.

B-Lymphozyten sind durch die Produktion von Antikörpern Hauptträger der humoralen Abwehr. Antikörper neutralisieren direkt Krankheitserreger und Toxine, opsonieren Antigene und aktivieren die Komplementkaskade, sowie Makrophagen und Natürliche Killerzellen. Außerdem sensibilisieren sie Mastzellen und Granulozyten.

T-Lymphozyten lassen sich zuerst einmal nach der Struktur ihres T-Zellrezeptors (TCR) unterteilen. Bei einer kleinen Subpopulation, den $\gamma\delta$ -T-Zellen, besteht der T-Zellrezeptor aus je einer γ - und einer δ -Kette. Sie reagieren gegen Hitzeschock- und Stressproteine bzw. gegen Zellen, die diese produzieren.

Der größte Teil der T-Lymphozyten sind $\alpha\beta$ -T-Zellen mit einem T-Zellrezeptor, der aus einer α - und einer β -Kette besteht. Sie lassen sich in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive Zytotoxische T-Zellen unterteilen. T-Helferzellen erkennen Antigene, die ihnen in MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden. Sie fördern dann entweder eine zellvermittelte, T-Helfer-1 oder eine humorale, T-Helfer-2 Immunantwort.

Bestandteile der zellvermittelten Immunität sind die Zytotoxischen T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen, wobei Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2, IL-12 und IL-18 als Botenstoffe eine große Rolle spielen. Auch für die Aktivierung von B-Lymphozyten ist der Kontakt zu T-Helferzellen notwendig. Wichtige Zytokine sind dabei IL-4 und IL-5.

Sowohl bei den B-, als auch bei den T-Lymphozyten existieren Gedächtniszellen, die bei einem wiederholten Kontakt mit bestimmten Antigenen eine schnellere und spezifischere Immunantwort, als beim Erstkontakt ermöglichen. Bei der Steuerung der Immunantwort haben Regulatorische T-Lymphozyten eine übergeordnete Funktion [114].

Abgesehen von geringen Unterschieden in Größe und Granularität, gibt es keine morphologischen Unterscheidungsmerkmale, die auf die Funktion des einzelnen Lymphozyten Rückschlüsse erlauben. Erst mit Hilfe spezifisch bindender Antikörper ist eine Differenzierung und eine Einteilung in Subpopulationen möglich.

2.1 Equine Antigene und Antikörper

Einen großen Beitrag zur Erforschung der Oberflächenantigene von Leukozyten liefern Konferenzen, in denen Laboratorien aus der ganzen Welt ihre Antikörper vorstellen, vergleichen, sie Antigenen zuordnen, neue Antigene definieren und eine einheitliche Nomenklatur einführen.

Auf dem „*First Equine Leucocyte Antigen Workshop*“ (ELAW I) 1991 in Cambridge, England, trafen sich Vertreter aus fünf Laboratorien, um 86 monoklonale Antikörper vorzustellen [48]. Dabei gelang es, Antikörper den equinen Antigenen EqCD2, EqCD4, EqCD5, EqCD8, EqCD11a/CD18 (LFA-1), EqCD13, EqCD44, EqMHC Klasse I, EqMHC Klasse II zuzuordnen und Marker für B-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und einigen bisher unbekanntem T-Zell-Subpopulationen zu definieren. Die Nomenklatur folgte dem beim Menschen geläufigen System, bei dem „CD“ für „cluster of differentiation“ steht und wurde mit dem Kürzel „Eq“ für „equine“ an die Tierart angepasst.

1995 folgte das zweite derartige Symposium, der „*Second Equine Leucocyte Antigen Workshop*“ (ELAW II) in Squaw Valley, Kalifornien, mit Forschern aus 10 Arbeitsgruppen, die 113 Antikörper untersuchten und diese als WS1 bis WS113 durchnummerierten [66].

Eine Übersicht über die Ergebnisse von ELAW II kann der Tabelle A.1 im Anhang A entnommen werden.

Auf der „*Equine Immunology*“-Konferenz im Januar 2001 in Santa Fe, New Mexico wurde die Entwicklung neuer Reagenzien ebenfalls angesprochen. Der Schwerpunkt lag hier jedoch bei der Erforschung von Zytokinen des Pferdes, deren Klonierung, Etablierung von Antikörpern gegen Zytokine und PCR-Verfahren zum Nachweis von mRNA [69].

Über den aktuellen Stand der bekannten equinen Oberflächenantigene informiert auch die Homepage <http://www.vetmed.wisc.edu/research/eirh/>.

Im Folgenden sollen die Methoden, die beim ELAW II Verwendung fanden, kurz erläutert werden, um einen Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten Verfahren ziehen zu können:

Die wichtigste Methode zur Charakterisierung der Antikörper war die Durchflusszytometrie: Dabei wurde die Bindung an Periphere Blutleukozyten (PBL), Granulozyten, Thymozyten, fetale Nierenzellen und die equine Lymphoblastenzelllinie EqT8888 [36] gemessen [66]. Außerdem wurden COS7-Zellen, die mit Vektoren, die DNA für equines CD2 oder CD44 enthielten, transfiziert worden waren, auf ihre Bindung durch Anti-CD2- bzw. Anti-CD44-Antikörper untersucht [112][113]. An Gefrierschnitten aus Lymphknoten, Milz und Thymus wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt [58]. Das Molekulargewicht der Liganden konnte durch Immunpräzipitation ermittelt werden [66]. Mittels ELISA erfolgte die Bestimmung der Subklassen der monoklonalen Antikörper [66]. Darüber hinaus wurden funktionelle Studien, vor allem Proliferationsassays, durchgeführt. Dabei untersuchten die Arbeitsgruppen den Effekt ihrer Antikörper auf das Wachstum von, mit Mitogenen vorstimulierten Zellen, gegenüber PBS und sich neutral verhaltenden Antikörpern als Negativkontrollen [66]. Allen untersuchten Antikörpern wurde eine eigene Workshopnummer (WS) zugeordnet.

EqCD2 (EqWC3)

Nachdem dieses Antigen zunächst als EqWC3 (equine workshop cluster 3) bezeichnet worden war, konnte durch Expressionsklonierung und Gensequenzierung gezeigt werden, dass das 58 kDa schwere Protein [116] weitgehend dem humanen CD2-Molekül entspricht [113]. In der zytometrischen Analyse Peripherer Blutleukozyten ist der Prozentsatz positiver Zellen mit dem der T-Zellen gleich. Als Maßstab für die Anzahl der T-Lymphozyten wurde der gegen EqCD5 gerichtete Antikörper WS81 verwendet [66]. Bei immunhistochemischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass alle drei Antikörper die T-Zell-abhängigen Bereiche in Lymphknoten erkennen und im Thymus die meisten medullären und nur einige kortikale Thymozyten färben [48]. Die Proliferation PHA-stimulierter Lymphozyten wird durch Anti-EqCD2-Antikörper teilweise gehemmt [66].

Während die Maus CD2-Moleküle auf B- und T-Zellen besitzt, kommt das CD2-Antigen bei Mensch und Pferd nur auf T-Zellen vor [66].

Beim Menschen bindet es an das CD58-Molekül. Dieses befindet sich auf Zielzellen für Zytotoxische T-Zellen, Antigen-präsentierenden Zellen und T-Gedächtniszellen. Durch die Bindung können T-Lymphozyten aktiviert werden [8].

EqCD3

Der Antikörper WS98 erkennt ein Homolog des CD3-Komplexes [11][66]. Sowohl in Analysen mit dem Durchflusszytometer, als auch in der Immunhistochemie ist zu erkennen, dass EqCD3 ausschließlich auf EqCD5(WS81)-positiven T-Lymphozyten vorkommt.

WS98 präzipitiert einen Komplex von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 18 kDa und 42 kDa. Nach weiterer Dissoziation des Komplexes, konnten zwei Proteine mit Molekulargewichten von 22 kDa und 27 kDa identifiziert werden.

Der Antikörper fördert die Expression des Interleukin-2-Rezeptors auf T-Lymphozyten [11].

Ein weiterer Antikörper wurde von Jones et al. 1993 [38] beschrieben (Klon PC3/188A). Er bindet an den CD3-Komplex verschiedener Spezies, unter anderem an den des Pferdes. Da der Antikörper ein intrazytoplasmatisches Epitop erkennt, eignet er sich sehr gut für die Immunhistochemie, insbesondere für Paraffinschnitte. Für die Durchflusszytometrie ist er nur eingeschränkt verwendbar, da die Zellen vor der Analyse permeabilisiert werden müssen.

EqCD4

EqCD4 entspricht dem humanen CD4-Molekül, dessen Ligand das MHC II-Antigen ist [48][58][66]. Seine Expression erfolgt außerhalb des Thymus nur auf CD8-negativen T-Lymphozyten, was den Verhältnissen beim Menschen [83] und den meisten Säugern [66], abgesehen vom Schwein [87] entspricht. Unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen wurde ein 58 kDa schweres Protein präzipitiert [48].

Die Antikörper WS38 und WS46 binden an EqCD4. PHA-induzierte Proliferation von Lymphozyten wird durch sie zumindest zum Teil gehemmt [66], was in anderen Spezies ebenfalls bei Antikörpern gegen das CD4-Epitop beobachtet wurde [83][5].

EqCD5

Drei speziesspezifische Antikörper sind bisher bekannt, die das equine CD5-Antigen erkennen: WS51 [11], WS71 [66] und WS81 [58] binden unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen 69 kDa schwere Moleküle. Verwendet man zwei der Antikörper in der Zwei-Farben-Immunfluoreszenzfärbung, so blockiert der zuerst eingesetzte Antikörper die Bindung des zweiten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass alle drei Antikörper Epitope an der gleichen Struktur, oder das selbe Epitop erkennen [66]. Des Weiteren fördern sie gleichermaßen die Proliferation von Lymphozyten *in vitro* [61][48]. Das entspricht Beobachtungen beim Menschen, bei dem Anti-CD5-Antikörper als Co-Stimulatoren gelten [68].

Crump et al. [19] wiesen die Kreuzreaktivität eines murinen T-Zellmarkers (Klon: HT23A) nach: Er ist beim Pferd in der Durchflusszytometrie und in der Immunhistochemie einsetzbar und präzipitiert ebenfalls ein 69 kDa schweres Protein.

EqCD8

WS84, WS92, WS97 und WS101 binden an eine CD4-negative T-Zell-Subpopulation [48][66] und sind auch in der Immunhistologie einsetzbar [48]. Die biochemische Analyse zeigte, dass CD8 auch beim Pferd als Heterodimer vorliegt, das aus einem 32 kDa und einem 39 kDa schweren Protein besteht (SDS-Page, reduzierende Bedingungen). Unter nicht reduzierenden Bedingungen wird eine Bande bei 68 kDa präzipitiert. Da sich WS84 und WS97 in der Zwei-Farben-Fluoreszenzfärbung im FACScan gegenseitig blockieren, mit WS92 und WS101 jedoch eine doppelt positive Population bilden, wird vermutet, dass WS84 und WS97 an die eine, WS92 und WS101 an die andere Kette des CD8-Moleküls binden [66].

Tschetter et al. konnten nachweisen, dass, wie bei anderen Spezies auch, CD8 meistens aus einem Dimer aus einer 32 kDa schweren α - und einer 39 kDa messenden β -Kette besteht. Teilweise exprimieren T-Lymphozyten aber auch ein α - α -Homodimer. Diese T-Zellen konnten am besten unter Lymphozyten des Ileumepithels nachgewiesen werden, wo sie bis zu 38% der T-Lymphozyten ausmachen [115].

Funktionelle Studien mit Antikörpern gegen das CD8-Molekül zeigen unterschiedliche Ergebnisse: Gibt man freie Antikörper in eine PHA-stimulierte Lymphozytensuspension, wird die Proliferation gehemmt [66], ist der Antikörper jedoch an Agarosekugeln gebunden, wird die Aktivität der Zellen erhöht [65]. Nach Lunn et al. besitzen auch einige Natürliche Killerzellen das CD8-Molekül [64]. Ligand des CD8-Epitops ist das MHC I-Antigen [103].

EqCD11a/CD18 (LFA-1)

Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei Interaktionen von Zellen, beispielsweise bei der Migration von Lymphozyten aus den Blutgefäßen in das Gewebe. Eine Familie bilden die β_2 -Integrine LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), Mac-1 und P150, 95. Sie bilden alle nicht kovalent gebundene Heterodimere aus einer ihnen gemeinsamen β -Einheit (CD18) und den unterschiedlichen α -Einheiten CD11a, CD11b und CD11c [102]. CD18 konnte mit 100 kDa, CD11a mit 180 kDa präzipitiert werden [47]. LFA-1 befindet sich auf allen Leukozyten [47].

Zhang et al. [124] untersuchten die Antikörper H20A, CZ3.1 (WS45) und CZ3.2 (WS77), sowie den gegen humanes CD18 gerichteten Antikörper MHM23 [33][37]. In der Durchflusszytometrie färbten sie über 95% der Lymphozyten, Granulozyten und Thymozyten. EqT8888 und fetale Nierenzellen wurden nicht erkannt [48][66].

Bei der Immunpräzipitation unter reduzierenden Bedingungen erkennen WS45 und WS77, ebenso wie MHM23 zwei Proteine mit 100 kDa bzw. 180 kDa [124].

Während des ELAW II wurde WS65 ebenfalls als Anti-LFA-1-Antikörper eingeordnet, der jedoch nicht immunpräzipitiert werden konnte [66].

Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalysen zeigen, dass die Expression von CD11a/CD18 auf einer T-Zellsubpopulation erhöht ist [66], die möglicherweise den T-Gedächtniszellen entspricht [120][24]. Auf die Proliferation vorstimulierter Lymphozyten kann kein einheitlicher Effekt beobachtet werden [124].

Des Weiteren existiert ein kreuzreagierender Anti-CD18-Antikörper vom Hund (Klon: CA16.2G1), der in der Durchflusszytometrie alle equinen Leukozyten erkennt [85].

EqCD13

Nur ein einziger Antikörper (WS54) wurde bisher beschrieben, der eine orthologe Struktur zum menschlichen CD13-Molekül erkennt: WS54 bindet an allen Zellen myeloiden Ursprungs, wie Granulozyten und Monozyten, an ein 150 kDa schweres Molekül (Immunpräzipitation unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen), färbt im FACScan aber keine B- und T-Zellen [66]. Außerdem befindet sich dieses Glykoprotein auf Fibroblasten, Osteoklasten und Dünndarmepithelzellen. Im Gegensatz zum Menschen ist es nicht auf Zellen des proximalen Tubulus der Niere zu finden [114].

EqCD44

Von den vier Antikörpern (WS53, WS63, WS72, WS75), die auf Grund der Immunfluoreszenzdaten ursprünglich dieser Gruppe zugeordnet wurden, konnte nur für zwei (WS63, WS72) bewiesen werden, dass sie an ein, dem menschlichen CD44 entsprechendes, Molekül binden. Dazu wurde die Bindung der Antikörper an, mit EqCD44-transfizierten, COS7-Zellen überprüft [112]. Die Bande bei 76 kDa im SDS-Page nach Endoglykosidase-Behandlung des Immunpräzipitates von WS72 entspricht den Verhältnissen beim Menschen [104]. Dagegen wurden sowohl bei WS53, als auch bei WS75 Banden bei 100 kDa und 80 kDa gefunden, so dass die richtige Zuordnung zu dieser Gruppe bezweifelt wird [66].

Zytometrische Analysen zeigen, dass auf Makrophagen und Granulozyten die Dichte der CD44-Moleküle einheitlich ist, während Lymphozyten große Unterschiede zeigen. Die Expression ist dabei auf B-Zellen am geringsten.

Keiner der Antikörper hat einen Einfluss auf die Proliferation PHA-stimulierter Lymphozyten [66].

EqMHC I

Drei Antikörper wurden auf dem ELAWII dem EqMHC I-Antigen zugeordnet: Während WS57 nur an die 44-45 kDa schwere α -Kette bindet, präzipitieren WS37 und WS105 auch das 12 kDa schwere β -Mikroglobulin. Auf die Proliferation von Lymphozyten war kein Einfluss messbar [66].

Eine Reihe von kreuzreaktive Antikörper gegen MHC I beschrieben Donaldson et al. 1988 [22].

Der Equine MHC I-Komplex wurde auf Chromosom 20 identifiziert [2] und kloniert [7]. Dabei wurden Loci für zwei unterschiedliche Formen, ELA-A und ELA-B [2], sowie mehrere lösliche Formen entdeckt [56][57]. Insgesamt konnten bisher 13 verschiedene MHC I-Varianten nachgewiesen werden [54].

Das β -Mikroglobulin blockiert in vitro die Aktivität Zytotoxischer T-Zellen [81].

EqMHC II

WS43, WS74 und WS99 präzipitieren unter reduzierenden, wie nicht reduzierenden Bedingungen, eine oder zwei Banden bei 33 bis 34 kDa [66]. In der Fluoreszenzanalyse sind B-Zellen und ein großer Teil von T-Zellen positiv [59][18].

Darüber hinaus lassen sich eine Reihe von Antikörpern gegen MHC II von Maus und Ratte beim Pferd verwenden [18][78].

Die Gene für MHC II befinden sich ebenfalls auf Chromosom 20 [2]. Das Heterodimer aus einer 30-33 kDa großen α -Kette und einer nicht kovalent gebundenen, 28-30 kDa großen β -Kette [18][59][78] wurde 1994 von Szalai et al. kloniert [107][108].

Im Gegensatz zu Mensch und Nager, bei denen sich das MHC II-Antigen ausschließlich auf Antigen-präsentierenden Zellen und B-Lymphozyten befindet [89], wird es bei Pferd, Hund und Schwein auch auf T-Lymphozyten nachgewiesen [18][78]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl CD4-positive, als auch CD8-positive T-Zellen effektiv Antigene präsentieren können [50][51]. Während bei neugeborenen Fohlen das MHC II-Molekül auf CD4- und CD8-positiven Zellen nicht nachweisbar ist, kann ein kontinuierlicher Anstieg bis zum Alter von 6 Monaten gemessen werden [59]. Da beim Menschen ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung des CD45RO-Antigens auf T-Gedächtniszellen gefunden wurden [31], wird

angenommen, dass es sich bei MHC II-positiven equinen T-Zellen ebenfalls um Gedächtniszellen handelt [50][91].

Verschiedene Veröffentlichungen haben sich mit den Haplotypen des MHC-Moleküls, seiner Expressionsrate und dem Auftreten verschiedener Krankheiten beschäftigt: Lazary et al. konnten beispielsweise mit dem Haplotyp D3 ein gehäuftes Auftreten von Equinen Sarcoiden in Verbindung bringen [53][55]. Auch die Wahrscheinlichkeit, eine Überempfindlichkeit gegen Insektenstiche zu entwickeln, ist bei bestimmten Varianten des equinen MHC II-Moleküls erhöht [25][55].

EqWC1

Diesem 22 kDa schweren Antigen konnte keine entsprechende Struktur bei anderen Spezies zugeordnet werden. Es wurde während des ersten *Leucocyte Antigen Workshops* (ELAW I) definiert [48][61]. Die vier bekannten Antikörper WS49, WS61, WS80 und WS89 binden an einen Großteil von B-Lymphozyten, alle medulären Thymozyten und alle Granulozyten. Es wird vermutet, dass EqWC1 dem Thy-1 (CD90) anderer Spezies entspricht. Da Versuche mit kreuzreagierenden Antikörpern, ebenso wie Proliferationsassays und Tests mit zytotoxischen Zellen jedoch negativ verliefen, bleiben Identität und Funktion weiter ungeklärt [66].

EqWC2

Sieben Antikörper (vgl. Anhang A, Tabelle A.1) binden an das neu definierte Antigen EqWC2. Da aber nur WS68, WS90 und WS96 erfolgreich immunpräzipitiert werden konnten (160-180 kDa), wurden während des ELAW I nur diese drei Antikörper offiziell dieser Gruppe zugeordnet [66][48]. Im Durchflusszytometer sind T-Lymphozyten und Granulozyten positiv. Auf das Wachstum PHA-stimulierter Leukozyten konnte kein Einfluss festgestellt werden, Zytotoxische T-Zellen werden durch Anti-EqWC2-Antikörper aber gehemmt [62]. Aufgrund der biochemischen Eigenschaften wurden die leichte Isoform des CD45-Moleküls (CD45RO) und die CD49-Integrin-Familie als orthologe Strukturen diskutiert [66].

EqWC4 (EqCD28)

WS112 und WS113 erkennen in der Analyse mit dem Durchflusszytometer eine kleine Subpopulation CD5-positiver Zellen, die sowohl das CD4-, als auch das CD8-Molekül tragen können. Nur ein Prozent der Thymozyten ist EqWC4-positiv. Immunhistologisch färben diese Antikörper vor allem Zellen des Parakortex, aber auch einige wenige Zellen in Follikeln von Lymphknoten. EqWC4 hat eine Masse von 46 kDa und kann auch als kovalent gebundenes Homodimer auftreten, weshalb es von einigen Autoren als ortholog zum humanen CD28-Molekül angesehen wird [13][66]. Allerdings kommt das humane CD28-Antigen auf den meisten T-Zellen, Plasmazellen und Thymozyten vor, so dass die Klonierung des equinen CD28-Moleküls abgewartet werden muss, bevor eine endgültige Zuordnung erfolgen kann [66].

B-Lymphozyten

Drei Antikörper (WS67, WS73, WS104) wurden auf dem ELAW II aufgrund von Immunfluoreszenzanalysen als B-Zell-Marker definiert. Während für WS67 keine Daten über Präzipitationen vorliegen, weiß man von WS73, dass er ein 85 kDa, und von WS104, dass er ein 240 kDa schweres Molekül unter reduzierenden Bedingungen präzipitiert [66]. Für WS73 wurde die Bindung an ein equines CD19-Molekül diskutiert [123], während für WS104 eine B-Zell-Isoform des CD45-Moleküls angenommen wird [8]. Beide Thesen konnten bisher aber nicht bewiesen werden.

In ELAW I wurde außerdem der Antikörper WS68 (Klon: B29A) beschrieben, der ebenfalls spezifisch B-Lymphozyten markiert [48][116].

Der, gegen ein synthetisches Peptid der zytoplasmatischen Region des Epitops CD79a gerichtete, Antikörper MB-1 (Klone: HM57, M7051, Dako) [38] und BU33, der auf menschlichen B-Zellen CD21 erkennt [70], lassen sich ebenfalls zur Markierung equiner B-Lymphozyten verwenden. MB-1 eignet sich hauptsächlich für den Einsatz in der Immunhistologie, da das intrazellulär gelegene Epitop nur nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen angefärbt werden kann.

Makrophagen

WS50 und WS102 binden im FACScan spezifisch an Makrophagen, eine nähere Charakterisierung wurde aber nicht durchgeführt [66][48].

Sellon et al. beschrieb 1993 einen weiteren Antikörper (Klon: 1.646), der auf Pferdemaakrophagen an zwei 150 bzw. 30 kDa große Proteine bindet und der auch in der Immunhistologie eingesetzt werden kann [98].

Der während des ELAW I beschriebene Antikörper WS25 (Klon: DH59B) bindet an ein 96 kDa großes Molekül auf allen equinen Monozyten und Granulozyten [48][116].

Thrombozyten

Antikörper der Klone Co35E4 und Co20A1 erkennen das Glykoprotein IIb/IIIa, das im Mensch als CD41/61 bezeichnet wird. Dieses β_3 -Integrin kommt ausschließlich auf Thrombozyten vor [88].

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Der gegen NK-Zellen von Fischen gerichtete Antikörper 5C6 ist neben Mensch, Schaf und Rind auch beim Pferd einsetzbar [30].

Individuelle Anti-Leukozyten-Antikörper

26 Antikörper konnten während des ELAW II weder einem bestimmten Antigen, noch einer bestimmten Zellart zugeordnet werden. Man hofft aber mit ihrer Hilfe bei weiteren Untersuchungen neue Erkenntnisse über das equine Immunsystem sammeln zu können [66].

2.2 Zytokine

Zytokine sind für die Kommunikation zwischen den einzelnen Teilen des Immunsystems und eine effektive Immunantwort essentiell. In den letzten Jahren wurde verstärkt an der Klonierung equiner Zytokine und der Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen sie gearbeitet, so dass hier einige Reagenzien vorliegen, mit denen sich Immunantworten des Pferdes studieren lassen. In diesem Kapitel sollen kurz die aktuellen Erkenntnisse über die equinen Zytokine dargestellt werden:

Interleukin-1 (IL-1) kommt in einer α - und einer β -Form vor, die beide kloniert wurden [42] und stellt auch beim Pferd einen entscheidenden Entzündungsmediator dar [84].

Rekombinantes Interleukin-2 (IL-2) fördert die Proliferation sowie die Zytotoxizität mononuklearer Zellen im Pferdeblut [111][117] und begünstigt damit die zelluläre Immunantwort [21].

Die Klonierung von Interleukin-4 (IL-4) gelang aus Lymphozyten, die mit Mitogenen stimuliert worden waren. IL-4 verstärkt die Proliferation von B-Zellen und verhindert die Aktivierung Zytotoxischer Killerzellen [118][21]. Zusammen mit IL-5 gilt es als potentes Stimulans für eine humorale Immunantwort, mediiert durch T-Helfer-2-Zellen. Es wird aber auch für das Auftreten von Hypersensibilitätsreaktionen verantwortlich gemacht [9].

Interleukin-6 (IL-6) schütten Makrophagen massiv nach mononuklearer Phagozytoseaktivität und Kontakt mit Lipopolysacchariden aus [84].

Bei der Klonierung von Interleukin-10 (IL-10) des Pferdes [106] entdeckte man Sequenzen, die auch im Genom des Equinen Herpesvirus 2 (EHV2) und dem Epstein-Barr-Virus Protein BCRF1 [95] vorkommen. Die Funktion von IL-10 beim Pferd konnte bisher noch nicht geklärt werden [114].

Die Typ-1-Interferone (IFN) α , β , und ω haben antivirale Aktivität [34][103]. IFN- α hemmt zusätzlich die Proliferation von Lymphozyten [103].

Das Typ-2-Interferon γ (IFN- γ) [28] hat immunmodulatorische Funktion: So konnte nachgewiesen werden, dass durch Inkubation mit IFN- γ in vitro die MHC II-Expression auf Monozyten ansteigt und eine zellvermittelte Immunantwort gefördert wird [103].

Infolge der grundlegenden Arbeiten von Su et al. über den equinen Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) [105], wurden zahlreiche Untersuchungen über sein Vorkommen und seine

Funktion veröffentlicht. Zusammen mit IL-1 und IL-6 wird TNF α eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der, insbesondere durch Gram-negative Bakterien verursachten Septikämie und bei der Induktion einer zellulären Immunantwort mit Hilfe von T-Helfer-1-Lymphozyten zugeschrieben [84][114].

Benarfa et al. klonierten 2000 die Chemokine Eotaxin, Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, MCP-2 und MCP-4 und berichtete über deren Induktion (Eotaxin, MCP-4) bzw. Expressionssteigerung (MCP-1) durch rekombinantes IL-4 [10].

In vitro-Experimente mit rekombinantes IL-12 zeigten einen signifikanten Anstieg der INF- γ Produktion, sowie eine Proliferation von Lymphknotenlymphozyten, was auf eine wichtige Rolle dieser Zytokine in der zellvermittelten Immunität hinweist [76][69].

2.3 Klinische Anwendungsmöglichkeiten und Forschungsprojekte

Übersensibilität und Erkrankungen der Atemwege

Sowohl beim Pferd, als auch beim Menschen kommen chronische Erkrankungen der Atemwege sehr häufig vor. Dabei ist die Pathologie der meisten dieser Krankheiten keineswegs vollständig geklärt. Im Folgenden werde ich einen kurzen Überblick über die häufigste Form der chronischen Atemwegserkrankungen des Pferdes geben, Vergleiche zu Krankheiten beim Menschen ziehen und auf Probleme bei der weiteren Klärung der Pathologien hinweisen:

Die chronische obstruktive Bronchitis (COB) ist auch als Recurrent Airway Obstruction (RAO), bzw. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) bekannt [93]. Die meist erwachsenen Tiere reagieren auf die Inhalation organischen Heustaubes mit einer schweren Entzündung der Atemwege. Die typische Jahreszeit für die Erkrankung sind die Wintermonate. Außerdem treten bei Pferden auf Sommerweiden in den Südstaaten der USA die gleichen Symptome auf. Man spricht in diesen Fällen von „*summer pasture associated obstructive pulmonary disease*“ (SPAOPD).

In der Lunge und den unteren Atemwegen können sich bereits vier bis sechs Stunden nach Exposition mit entsprechenden Allergenen Neutrophile Granulozyten ansammeln. Weitere Symptome sind Bronchospasmus und erhöhte Sekretion und Viskosität von Bronchialsekret. Im Laufe der Zeit entwickelt sich eine unspezifische chronische Überempfindlichkeitsreaktion der Atemwege, deren immunologische Basis aber noch nicht verstanden ist [69]. Typisch ist eine Verbesserung der Symptomatik nach der Behandlung mit nicht steroidalen und steroidalen Antiphlogistika [93].

Untersuchungen der Bronchoalveolarflüssigkeit (BALF) zeigen, dass sich dort große Mengen an IgE befinden, was die Vermutung nahe legt, es könnte sich um eine Typ-1 Hypersensibilitätsreaktion handeln. Klinisch fällt aber auf, dass die Pferde nicht plötzlich hochgradig erkranken, was bei einer Typ-1-Reaktion zu erwarten wäre, sondern sich langsam verschlechtern. Außerdem korrelieren intradermale Tests auf verschiedene Allergenextrakte nur schlecht mit klinischen Symptomen [39].

In der Humanmedizin schafften es 1998 Cramer et al. Moleküle, die IgE binden, zu isolieren, zu analysieren und rekombinant herzustellen. Dabei lagen Schimmelpilz-Allergene, beispielsweise von *Aspergillus fumigatus*, im Zentrum des Interesses. Es gelang ihm unter anderem, mit serologischen Methoden Unterschiede in der Pathogenese von IgE-mediertem Asthma und der oft lebensbedrohlichen allergischen Aspergillose beim Menschen zu klären [17]. 2001 führten Eder et al. ähnliche Untersuchungen mit rekombinanten *Aspergillus fumigatus*-Allergenen bei Pferden durch und konnten beweisen, dass an COB-leidende Pferde zum Teil gegen die gleichen Proteine sensibilisiert sind wie Menschen mit Schimmelpilzallergien: IgE von COB-Pferden erkannte in vitro zwei von drei untersuchten Allergenen signifikant besser, als IgE von Kontrollpferden [25].

Allgemein ist die BALF von Pferden mit chronischen Atemwegserkrankungen durch eine Ansammlung Neutrophiler Granulozyten gekennzeichnet, die nach Franchini et al. durch IL-8 ausgelöst wird [27]. Nevalainen et al. fanden außerdem erhöhte Level der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) [80], die durch Neutrophile Granulozyten freigesetzt wird und die Migration der Granulozyten durch die Basalmembran erleichtert [72]. Die ebenfalls freigesetzte Neutrophile Elastase bleibt weitgehend inaktiv, womit Raulo et al. erklären, warum, im Gegensatz zu Menschen mit chronischen Atemwegserkrankungen, nur wenig Umbauvorgänge an den Atemwegen stattfinden [80].

Für den Bronchospasmus sind Mastzellen verantwortlich: Sie setzen Histamin, Serotonin und Leucotrien D4 frei, die über eine Stimulation des Parasympathicus zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen der Atemwege führen [82].

Um die Immunologie der chronischen Atemwegserkrankungen der Pferde zu verstehen, ist eine Verbesserung und Ausweitung der Werkzeuge für die Erforschung des equinen Immunsystems nötig. Bowles et al. wiesen 2002 explizit auf fehlende Antikörper gegen Zytokine und IgE und große Lücken im Verständnis dieser Krankheiten hin [12].

Die ersten Schritte der COB sind überhaupt noch nicht geklärt: Welche Zellen nehmen die Antigene auf? Wo nehmen sie sie auf? Welche Rolle spielen die unterschiedlichen Untergruppen von Leukozyten? Und was ist der entscheidende Unterschied zwischen gesunden Pferden und Pferden, die an COB leiden?

Doch solange es nicht gelingt, Detektionssysteme für wichtige Strukturen des equinen Immunsystems zu entwickeln, ist es schwierig, große Fortschritte in der Aufklärung der physiologischen und pathologischen Vorgänge zu erringen. Außerdem können Ähnlichkeiten und Unterschiede zu Erkrankungen beispielsweise des Menschen nur bruchstückhaft

untersucht werden, so dass es momentan nicht möglich ist, ein umfassendes Modell der immunologischen Vorgänge dieser Erkrankungen zu entwickeln.

Severe combined Immunodeficiency (SCID)

Die Ätiologie der Schwere kombinierten Immundefizienz („Severe combined Immunodeficiency“, SCID) ist weitgehend geklärt. SCID ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit, die bei Araberpferden auftritt. Als für diese Krankheit verantwortlicher Gendefekt wurde eine fünf Basenpaare lange Deletion in einem Gen identifiziert, das für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein Kinase (DNA-PKcs) codiert. Während Pferde mit nur einer Kopie dieses Defektgens klinisch unauffällig sind, zeigen Tiere mit zwei Kopien Krankheitserscheinungen und werden durch die kombinierte Defizienz von B- und T-Lymphozyten in der Regel nicht älter als 5 Monate. Reihenuntersuchungen in den USA zeigten, dass 8,4% aller Araberpfede heterozygote Anlageträger für diese Erkrankung sind. Die Erkrankung dient auch als Modell für Immundefizienzen beim Menschen [74][100][114].

Equine Rezidivierende Uveitis (ERU)

Bereits seit langem ist die „periodische Augenentzündung“ beim Pferd bekannt. Sie wird auch als „Mondblindheit“, „Iridocyclochorioiditis“ oder „Equine Rezidivierende Uveitis“ (ERU) bezeichnet.

Die Pferde erkranken meistens im Alter von drei bis sieben Jahren. Die Entzündung verläuft schubweise, oft in Abständen von vier bis sechs Wochen und kann bis zur Erblindung führen. Ätiologie und Pathogenese sind nach wie vor nicht vollständig verstanden. Es gibt jedoch Hinweise auf ein autoimmunes Geschehen, ähnlich der Pathogenese bei der Uveitis des Menschen [20]. Auch hier können spezifische Antikörper gegen Leukozytenantigene einen Beitrag zur Erforschung der Krankheit leisten.

2.4 Kommerziell erhältliche Reagenzien

Die vorhergehenden Kapitel zeigten, wie bruchstückhaft das Wissen und wie gering die Auswahl an immunologischen Werkzeugen beim Pferd ist. Auch E. Marti et al. wiesen in ihrem Übersichtsartikel im Frühjahr 2003 explizit darauf hin, dass zur Erforschung des equinen Immunsystems Reagenzien, beispielsweise Antikörper gegen Zytokine, gegen IgE, gegen weitere MHC-Varianten, sowie den T-Zellrezeptor, fehlen [69].

Darüber hinaus sind viele der beschriebenen Antikörper nicht kommerziell erhältlich, was beispielsweise ein Vergleich des Angebots der Firma SEROTEC, einem der Marktführer, mit der Liste von 113 bereits 1995 beim ELAW II [66] validierten Antikörper belegt. Bei der Firma Serotec waren im Jahr 2001 nur 20, im Jahr 2003 21 monoklonale Antikörper gegen equine Leukozyten erhältlich (vgl. Anhang A, Tabelle A.2).

Davon handelt es sich bei einigen um kreuzreagierende Antikörper, die in der Literatur nicht beschrieben worden sind.

Zieht man den Vergleich zum Angebot in der Humanmedizin, wird der Mangel an immunologischen Werkzeugen umso auffälliger: Alleine gegen den humanen T-Zell-Rezeptor, gegen den beim Pferd noch kein monoklonaler Antikörper vorhanden ist, bietet Serotec 31 Varianten an.

Es ist wünschenswert, dass die bestehenden Lücken in der Palette der immunologischen Arbeitsmittel bald gefüllt werden.

3. Material und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien und Methoden erläutert. Angaben zur Herkunft der Materialien können Anhang B entnommen werden, soweit sie nicht im Text angegeben sind.

3.1 Tiere und Tierhaltung

Bei den Mäusen handelte es sich um BALB/c-Mäuse aus hauseigener Zucht. Die Tiere wurden in Zweier- bis Fünfer-Gruppen in Macrolonkäfigen gehalten. Die Fütterung bestand aus handelsüblichem Alleinfutter für Mäuse und Wasser. Beides wurde ad libitum verabreicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 6 Mäuse zur Herstellung monoklonaler Antikörper getötet. Die Immunisierung wurde als anzeigepflichtiger Tierversuch durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und entsprechend dokumentiert.

Die Pferde umfassten verschiedene Ponys, Warm- und Kaltblüter verschiedenen Alters und beiderlei Geschlechts. Zur Blutentnahme wurden Pferde des Instituts für Tierphysiologie, sowie Patienten der chirurgischen Tierklinik herangezogen. Sie erfolgte durch Punktion der V. jugularis. Das Blut wurde in Heparin-Röhrchen gesammelt. Organentnahmen erfolgten an eingeschläferten Tieren.

3.2 Präparation von Lymphozyten

Material:

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2:

8,0 g	NaCl
1,45 g	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O
0,2 g	KCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml	Aqua dest.

DL-Dithiothreitol-(DTT-) Stammlösung (1 M in PBS):

1,45 g	DTT
ad 10 ml	Aqua dest.

Methoden:

Für die Isolierung aus **Vollblut** [2][66][99][125] wurden für ca. 1×10^8 Lymphozyten 100 ml Pferdeblut in mit Ca-Heparin beschichteten Röhrchen gesammelt. Dazu wurde pro Röhrchen 1g Eisenspäne gegeben und das Blut 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. In dieser Zeit sanken sowohl die Erythrozyten als auch Makrophagen ab, die die Eisenspäne phagozytierten. Das Plasma wurde abpipettiert und bei $225 \times g$ 10 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet in 20 ml PBS resuspendiert und vorsichtig auf die gleiche Menge FICOLL-Plaque™ geschichtet. Nach 12 Minuten Zentrifugation bei $600 \times g$ (Raumtemperatur) konnten die Peripheren Blutleukozyten (PBL) aus der Interphase abgesaugt und mit PBS gewaschen werden (10 Minuten, $225 \times g$). Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf eine gewünschte Konzentration eingestellt.

Für die Gewinnung von Lymphozyten aus **Lymphknoten** oder **Milz** [99] wurde an einem getöteten Pferd ein ca. 2 cm durchmessendes Stück des Nodus lymphaticus mandibularis bzw. der Milz entnommen und auf Eis vom umgebenden Fett und Bindegewebe freipräpariert. Dann wurde die Probe in ca. 2 mm durchmessende Stücke zerteilt und mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels und 50 ml PBS durch ein Sieb der Porenweite 0,5 mm in eine sterile Petrischale gedrückt. Die Zellsuspension stand anschließend etwa 5 Minuten auf Eis. Nachdem sich größere Gewebeteile abgesetzt hatten, wurden die oberen 40 ml abpipettiert

und 2 mal mit PBS gewaschen (10 min, 225 x g). Die Auftrennung mittels FICOLL-Plaque™ erfolgte wie bei der Gewinnung aus Blut.

Für die Gewinnung von **Intestinalen Intraepithelialen Lymphozyten** (IEL) [99][43] wurde ein etwa 5 cm breiter Streifen aus dem Dünndarm entnommen. Dieser wurde longitudinal eröffnet und in 5 mal 5 mm große Stücke geschnitten, die so lange in einem Erlenmeyer-Kolben mit eiskaltem PBS gewaschen wurden, bis der Überstand klar blieb. Danach wurden die Stücke vorsichtig mit Filterpapier abgetrocknet und in 50,5 ml einer 37°C warmen Lösung aus PBS, 10% FCS und 1% DTT-Stammlösung gegeben. Ein Magnetrührer mit 60 Umdrehungen pro Minute löste eine halbe Stunde lang die Lymphozyten aus dem Epithel der Darmstücke. Die entstandene Zelllösung wurde abpipettiert und 10 Minuten bei 225 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml einer 44%-igen PERCOLL-Plaque™ Trennlösung resuspendiert und mit einem gleich großen Volumen einer 67%-igen PERCOLL-Plaque™ Trennlösung überschichtet. Nach 12-minütiger Zentrifugation bei 600 x g (Raumtemperatur) konnten die IEL vorsichtig aus der Interphase abgesaugt und mit PBS gewaschen werden.

Die aus den verschiedenen Organen gewonnenen Lymphozyten wurden zur Immunisierung von Mäusen, für die Zellkultur oder zur Immunfluoreszenzanalyse verwendet.

3.3 Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk)

3.3.1 Immunisierung von Mäusen

Zur Immunisierung wurden 8-12 Wochen alte BALB/c Mäuse verwendet. Alle Mäuse wurden drei bis fünf mal im Abstand von ein bis drei Wochen mit ca. 5×10^7 Zellen intraperitoneal immunisiert. Als Antigen wurde für die Fusionen Nummer 1 bis 4 ausschließlich PBL, für Fusion Nummer 5 Lymphknoten-Lymphozyten und für Fusion Nummer 6 IEL verwendet. Für die Fusionen Nummer 5 und 6 wurde teilweise auf tiefgekühlte und wieder aufgetaute Lymphozyten zurückgegriffen (s.u.). Die Entnahme der Milz für die Fusion erfolgte 24 bis 36 Stunden nach der letzten Injektion.

3.3.2 Kultivierung von Myelomzellen

Materialien:

Standardmedium:	89%	RPMI 1640
	10%	FCSi (inaktiviert, 30 min, 37°C)
	1%	Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 IE Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml)

Methode:

Alle Fusionen wurden mit der murinen B-Zell-Myelomzelllinie SP2/0 durchgeführt. SP2/0-Zellen sind Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-negativ (HGPRT⁻), wachsen in einem Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, also nicht. Aminopterin blockiert einen wichtigen biochemischen Weg im Metabolismus der Zellen [46]. Die SP2/0-Zellen wurden in 500 ml Zellkulturflaschen in Standardmedium in einem mit 5% CO₂ begasten, 37°C warmen Brutschrank kultiviert.

3.3.3 Zellfusion

Materialien:

2-Mercaptoethanol (50 mM):	35 µl 10 ml	2-Mercaptoethanol RPMI 1640
HAT-Medium:	400 ml 100 ml davon 425 ml:	RPMI 1640 Dulbeco´s Modified Eagles Medium +50 ml Ultra low IgG FCS (inaktiviert) +10 ml HAT-Lösung (50x) +10 ml IL 6-Lösung +5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 IE Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml) +0,5 ml 50mM 2-Mercaptoethanol

Endkonzentrationen: Hypoxanthin: 0,1 mM
Aminopterin: 0,4 µM
Thymidin: 0,016 mM

PBS (vgl. 3.2)

Polyethylenglycol(PEG) -Lösung: 50 % PEG
50 % HEPES

Methode:

Nach Tötung einer immunisierten Maus mittels zervikaler Dislokation wurde ihre Milz steril entnommen und auf einem Drahtnetz mit 0,5 mm Porenweite unter Zugabe von 50 ml PBS in eine Petrischale zerrieben. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und ca. 5 Minuten stehen gelassen, bis sich die größeren Partikel abgesetzt hatten. Die oberen 40 ml wurden wiederum in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei 225 x g 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Resuspendierung in RPMI wurden die Zellen in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer gezählt.

Parallel dazu wurden SP2/0-Zellen geerntet und gezählt, um sie anschließend mit den Milz-Zellen im Verhältnis 1:3 in einem Zentrifugenröhrchen zu kombinieren und abzuzentrifugieren (225 x g, 10 min). Der Überstand wurde komplett abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig vom Boden gelöst. Danach wurden 1,5 ml PEG-Lösung dazugegeben, das Zentrifugenröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad eine Minute lang geschwenkt und anschließend mit insgesamt 20 ml 37°C warmem RPMI nach folgendem Schema tropfenweise verdünnt: 1 ml in 30 Sekunden, 3 ml in 30 Sekunden, 16 ml in 60 Sekunden. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 225 x g erfolgte eine weitere Inkubation für 5 Minuten im 37°C warmen Wasserbad, bevor der Überstand abpipettiert und die Zellen im Sediment in 450 ml HAT-Medium resuspendiert und in 20 sterile 96-Flachlochplatten mit 200µl pro Kavität ausplattiert wurden.

3.3.4 Kultivierung von Hybridomzellen, Klonierung, Nomenklatur

Material:

HT-Medium: wie HAT-Medium (vgl. 3.2.4), jedoch HT-Lösung statt HAT-Lösung

Endkonzentrationen: Hypoxanthin: 0,1 mM
Thymidin: 0,016 mM

Standardmedium (vgl. 3.3.2)

Methode:

Nur fusionierte Zellen überlebten im HAT-Medium und vermehrten sich, sodass nach 10 bis 14 Tagen Klone dieser Zellen in den Platten sichtbar wurden. Um die Gefahr zu minimieren, mehrere Klone aus einer Delle weiter zu kultivieren, wurden nach Möglichkeit nur diejenigen Klone getestet, die deutlich sichtbar auf eine einzelne Zelle zurückgingen. Nach 14 Tagen konnte auf ein HT-Medium, nach weiteren 7 Tagen auf ein Standard-Medium umgestellt werden. Die Klone, die Antikörper produzierten (Analyse mittels FACScan, vgl. 3.3.1), wurden schrittweise in 24-Loch- und 6-Loch-Platten, später auch in Zellkulturflaschen von bis zu 500 ml Volumen umgesetzt.

Schlecht wachsende oder nur wenig Antikörper produzierende Klone wurden wiederum **subkloniert**, indem sie in Konzentrationen von 1 bis 10 Zellen pro 96-Loch-Platte ausgesät und von diesen Klonen nur die am besten wachsenden und Antikörper produzierenden weiter kultiviert wurden.

Die **Nomenklatur** der Klone erfolgte durch zwei Ziffern: Vorne steht die Nummer der Fusion, dahinter die fortlaufende Zahl des Klons in der Fusion. Beispielsweise entspricht der Klon „4-13“ dem 13. getesteten Überstand der 4. Fusion.

3.3.5 Einfrieren und Auftauen von Hybridomzelllinien und Lymphozyten

Materialien:

PBS (vgl. 3.2)

Einfriermedium: 95% FCS
 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

Methode:

Zum Einfrieren von Zellen und Zelllinien wurden die Zellen zunächst bei 225 x g 10 Minuten sedimentiert, der Überstand gegebenenfalls für weitere Tests gewonnen, die Zellen in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in 1 ml-Portionen in Kryoröhrchen pipettiert. Die Konzentration betrug $1-5 \times 10^7$ Zellen pro ml Einfriermedium. Durch Verbringen der Kryoröhrchen in speziell isolierte Einfrierboxen, die in Tiefkühlschränke mit -80°C gestellt wurden, konnte eine optimale Absenkung der Temperatur um 1°C pro Stunde erreicht werden. Für eine Konservierung der Klone über längere Zeit wurden die Röhrchen nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell im Wasserbad knapp über den Gefrierpunkt erwärmt und 2 mal mit PBS gewaschen.

Nach der gleichen Methode wurden frisch gewonnene Lymphozyten aus Blut, Lymphknoten und Darm tiefgekühlt bzw. aufgetaut, beispielsweise um Zellen für eine Immunfluoreszenzanalyse oder für die Immunisierung von Mäusen zur Verfügung zu haben.

3.3.6 Reinigung monoklonaler Antikörper mittels G-Sepharose-Säule

Material:

Startpuffer (20 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,0):

Lösung 1:	1,424 g	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O ad 400 ml Aqua dest.
Lösung 2:	0,936 g	NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O ad 300 ml Aqua dest.
Lösung 2 zu Lösung 1 geben, bis pH 7,0 erreicht ist		

Elutionspuffer (0,1 mol/l Glycinpuffer, pH 2,5)

3,75 g	Glycin
+ HCl 1N	bis pH 2,5 erreicht ist
ad 500 ml	Aqua dest.

Trislösung (1 mol/l), pH 8,3

1,211 g	Tris
ad 10 ml	Aqua dest.

Dialysepuffer (pH 7,8 bzw. pH 8,0)

1,65 g	KH ₂ PO ₄
29,03 g	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O
45,00 g	NaCl
ad 5000 ml	Aqua dest

Guanidinhydrochlorid (6 mol/l)

57,32g	Guanidinhydrochlorid
ad 100 ml	Aqua dest.

Methode:

Antikörper wurden aus Zellkulturüberstand über eine G-Sepharose-Säule aufgereinigt. Der Überstand musste dazu 1:2 mit Startpuffer verdünnt werden, bevor die Lösung mit 1 ml pro Minute über die Säule gepumpt wurde. Photometrisch konnte der Gehalt an Protein im Eluat der Säule bestimmt und an einem Schreiber abgelesen werden. Nach Durchlauf des Überstandes wurde Elutionspuffer auf die Säule gepumpt. Der Ausschlag des Schreibers nach einigen Minuten zeigte dabei die Elution des Antikörpers an, der in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen und sofort mit einem Tropfen Trispuffer neutralisiert wurde. Anschließend wurde die Säule 20 Minuten mit Startpuffer gespült und vor einem weiteren Durchlauf 30 Minuten mit Guanidin regeneriert. Aufbewahrt wurde die Säule bei 4°C unter 20%-igem Ethanol. Das Eluat wurde anschließend in einen Dialyseschlauch pipettiert, dieser verschlossen und bei 4°C 3 Tage gegen 5l Dialysepuffer dialysiert. Der Puffer wurde täglich gewechselt. Sollte der Antikörper später biotinyliert werden, so empfahl sich ein pH von 8,0, sonst wurde der Dialysepuffer auf pH 7,8 eingestellt.

Die genaue Konzentration konnte photometrisch bestimmt werden. Durch 15- bis 30-minütige Zentrifugation bei 5000 x g in „*Centricon 30 concentrator Röhrchen*“, bzw. durch

Verdünnen mit PBS, wurde die Konzentration der Antikörper auf 1 mg/ml eingestellt, portioniert und bei -20°C eingefroren.

3.3.7 Konjugation monoklonaler Antikörper mit Biotin

Material:

Antikörper	1 mg/ml, pH 8,0
Biotin-Stammlösung:	Biotin in DMSO 10 mg/ml
Dialysepuffer (vgl. 3.3.6)	

Methode:

Pro ml Antikörper (Konzentration 1 mg/ml) wurden 10 μl Biotin-Stammlösung zugegeben. Dabei war auf einen leicht alkalischen pH-Wert (z.B. 8,0) zu achten. Nach 4-stündiger Inkubation im Schüttler bei 4°C wurde der Antikörper in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht bei 4°C gegen Dialysepuffer (pH 7,8) dialysiert.

3.4 Methoden zur Charakterisierung der mAk

3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung und Analyse im Durchflusszytometer (FACScan)

Material:

PBS (vgl. 3.2)

Fluoreszenzpuffer (Fluo-Puffer) (1% BSA, 0,01% NaN₃), pH 7,2:

10 g	Bovines Serumalbumin (BSA)
1 ml	NaN ₃ (10 % in PBS)
ad 1000 ml	PBS (s.o.)

FACS-Puffer, pH 7,2:

1 ml	NaN ₃ (10 % in PBS), Endkonzentration: 0,01%
ad 1000 ml	PBS (s.o.)

Tabelle 3.1: primäre Antikörper (Kontrollen)

Antikörper	Verdünnung	Firma
Maus-anti-Pferd-CD4	1:20	Serotec, Oxford, UK
Maus-anti-Pferd-CD8	1:2	Serotec, Oxford, UK
Maus-anti-Pferd-Ig-FITC	1:1500	Southern Biotech Ass. Inc., USA

Tabelle 3.2: sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Ratte-anti-Maus-κ-Leichte-Kette-FITC	1:250	Southern Biotech Ass. Inc., USA
Ziege-anti-Maus-IgG1-FITC	1:500	Southern Biotech Ass. Inc., USA
Ziege -anti-Maus-IgG1-PE	1:500	Southern Biotech Ass. Inc., USA
Ziege -anti-Maus-IgG2a-FITC	1:100	Southern Biotech Ass. Inc., USA
Ziege -anti-Maus-IgG2a-PE	1:300	Southern Biotech Ass. Inc., USA
Ziege -anti-Maus-IgG2b-PE	1:300	Southern Biotech Ass. Inc., USA
Ziege -anti-Maus-IgG3-FITC	1:100	Southern Biotech Ass. Inc., USA
Streptavidin-PE (SA-PE)	1:400	Southern Biotech Ass. Inc., USA

Methode:

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, dann in Fluoreszenzpuffer aufgenommen, in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung gezählt und auf 5×10^7 lebende Zellen pro ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurde für jeden zu testenden Antikörper 200µl pro Kavität einer 96-Lochplatte pipettiert. Ab jetzt musste darauf geachtet werden, dass die Zellen möglichst

immer bei 4°C bearbeitet wurden. Nach kurzer Zentrifugation bei 716 x g wurde der Überstand mit Schwung abgeschüttet, die Zellpellets in 50µl verschiedener Antikörperlösungen resuspendiert und 15 Minuten inkubiert. Als Kontrollen wurden die Antikörper aus Tabelle 3.1 verwendet, die mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt worden waren. Nach erneuter Zentrifugation (716 x g) und Abschütten des Überstandes wurden die Zellen mit je 200µl Fluoreszenzpuffer gewaschen, wieder zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Ungebundene Antikörper wurden dadurch entfernt. Zu den nun pelletierten, mit primären Antikörpern behafteten Zellen, pipettierte man nun 30µl FITC-, PE- oder Biotin-konjugierte sekundäre Antikörper (vgl. Tabelle 3.2), die an den primären Antikörpern hafteten. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen und anschließend mit 200 µl Fluoreszenzpuffer in FACS-Röhrchen überführt. Bei Biotin-markierten Antikörpern war ein dritter Inkubationsschritt mit 30µl eines Streptavidin-gekoppelten Farbstoffes nötig.

Prinzipiell wurden Doppelfärbungen auf die oben beschriebene Weise durchgeführt. Um Kreuzreaktionen zu verhindern, wurde nach Konjugation des ersten Farbstoffes eine Inkubation mit von Balb/c-Mäusen stammendem Serum (Verdünnung 1:20, 15 min) vorgenommen, bevor der zweite primäre, bzw. sekundäre Antikörper zugegeben wurde.

Die Zellen aus je einem Röhrchen wurden mittels eines Durchflusszytometers (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Ein Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm trifft dabei auf einzelne Zellen, die den Strahl streuen und gegebenenfalls selber zum Leuchten angeregt werden. Es wurden die Größe der Zellen durch das Vorwärtsstreulicht (FSC), die Granularität durch das Seitwärtsstreulicht (SSC), die grünelbe Lichtemission des FITC-Farbstoffes im Kanal 1 (FL1) und das rote Licht des PE-Farbstoffes im Kanal 2 (FL2) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest pro™ (Becton Dickinson, Heidelberg).

3.4.2 Proliferationsassay

Material:

Beschichtungspuffer:	3,11 g	Na ₂ CO ₃
	6,0 g	NaHCO ₃
	ad 1000 ml	Aqua dest.
³ H-Thymidin-Gebrauchsmedium:	0,5 ml	³ H-Thymidin (1mCi/ml)
	ad 10 ml	RPMI
	(entspricht 1 µCi/20 µl)	

Tabelle 3.3: Zusätze für die Zellkultur

Zusatz	Firma	Konzentration
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	5 µg/ml
Staphylococcal enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	1 µg/ml
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	1 µg/ml

Methode:

Bei diesem **Verfahren** wird Zellen radioaktiv markiertes Thymidin für begrenzte Zeit im Überschuss angeboten, das diese bei der Replikation in die DNA einbauen. Nicht verwendetes Thymidin wird abgespült und die Zellen werden auf einem Filter aufgefangen. Zugegebene Szintillationsflüssigkeit wird durch die freiwerdende β -Strahlung des Thymidin zur Emission von Lichtblitzen angeregt, die sich wiederum mit einem Zähler (β -counter) erfassen lassen.

Die Proliferationsassays wurden unter verschiedenen **Kulturbedingungen** durchgeführt:

Um Überstände der Klone auf Induktion von Zellwachstum zu untersuchen, wurde zunächst eine 96-Flachlochplatte mit je 200 µl eines primären Antikörpers pro Kavität beschichtet: Ziege-anti-Maus-Ig-(H+L)-mAk 1:50 in sterilem Beschichtungspuffer. Nach 12-stündiger Inkubation bei 4 °C wurde die Platte 3 mal mit sterilem PBS gewaschen und danach 200 µl der zu untersuchenden Antikörper pro Vertiefung pipettiert. Für jeden Antikörper wurde mindestens ein 3-fach Ansatz durchgeführt. Nach einer Inkubation von 2 Stunden im 37°C warmen Brutschrank wurde die Platte wiederum gewaschen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach den in 3.2 aufgeführten Protokollen gewonnen und sofort verwendet: 200µl der Zellsuspension in Standardmedium bei einer Konzentration von 2×10^7 Zellen pro ml wurden pro Kavität pipettiert.

Als Negativkontrollen dienten 200µl Zellsuspension in nicht beschichteten Kavitäten. Zellen unter Zusatz von Concanavalin A, SEB oder LPS (vgl. Tabelle 3.3) wurden als Positivkontrolle verwendet [66][109].

Nach 5 Tagen **Inkubation** im Brutschrank bei 37°C wurden 20µl ^3H -Thymidin-Gebrauchsmedium in jede Vertiefung gegeben. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen mittels eines Zellerntegerätes (Harvester) abgesaugt und auf ein Filterpapier übertragen. Nach dem Trocknen des Filters und dem Einlegen in ein, für den Zähler passende 96-Lochplatte, mussten noch 20µl Szintillationsflüssigkeit pro Vertiefung zugegeben und die Platte mit einer durchsichtigen Folie abgeklebt werden, bevor die Lichtblitze mit Hilfe des Zählers und der zugehörigen Software erfasst werden konnten.

Bei der Auswertung wurde das arithmetische Mittel jedes Mehrfachansatzes, sowie deren Standardabweichung kalkuliert. Der Stimulationsindex (SI) berechnete sich aus dem Quotienten der Messwerte stimulierter und nicht stimulierter (Negativkontrolle) Zellen.

3.4.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation diente der Bestimmung des molekularen Gewichts der Liganden der monoklonalen Antikörper. Eine Möglichkeit der Durchführung bestand in der Verwendung der sogenannten „Solid Phase Immunoprecipitation Technique“ (SPIT-Methode) [15]:

Als erstes musste nach den Schemata von 3.2 **Zellen gewonnen** und mit ¹²⁵**Jod markiert** werden:

Material:

PBS (vgl. 3.2)

Lactoperoxidase-Lösung:	2 mg Lactoperoxidase pro ml PBS
H ₂ O ₂ -Lösungen A bis D:	30 %-iges H ₂ O ₂ wurde wie folgt verdünnt: Lösung A: 1:30 000 Lösung B: 1:10 000 Lösung C: 1:3 000 Lösung D: 1:1 000
Laemmli-Puffer:	25 ml 4x Tris-Cl/SDS-Puffer, pH 6,8 20 ml Glycerol 4 g SDS 1 mg Bromphenolblau ad 100 ml Aqua dest.
Waschpuffer (je ml):	500 µl 2x Lysispuffer-Stammlösung 100 µl Triton X (10%) ad 1000 µl Aqua dest
2x Lysispuffer-Stammlösung:	3 ml NaCl-Lösung (5 M) 10 ml Tris-Lösung (500 mM, pH 7,4) 1 ml EDTA-Lösung (500 mM, pH 8,0) 1 ml NaN ₃ -Lösung (10 %) ad 50 ml Aqua dest.
Lysispuffer (je ml):	500 µl 2x Lysispuffer-Stammlösung 40 µl Complete™ Enzymlösung 100 µl Triton X (10%) ad 1000 µl Aqua dest.

Methode:

Dazu wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und nach Trypanblau-Färbung gezählt, da für die Jodierung eine Zell-Vitalität von mindestens 95% benötigt wird. In ein 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 5×10^7 Zellen gegeben, bei 400 x g 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 100µl PBS aufgenommen. Zu dieser Suspension wurden 50µl Lactoperoxidase-Lösung, dann 10µl ^{125}Jod (1 mCi) und 10µl H_2O_2 -Lösung A pipettiert. Nun wurden im Abstand von jeweils 2 Minuten nacheinander die H_2O_2 -Lösungen B, C und D dazugegeben. Dabei war auf eine gute Durchmischung der Zellen zu achten. Nach weiteren 2 Minuten wurden die Zellen 2 mal mit PBS mit 0,01 % Natriumazid (NaN_3) gewaschen, wobei die Zellen jeweils für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert wurden.

Dann folgte die **Zellyse**:

Die auf 5×10^7 Zellen eingestellten Ansätze wurden für 10 Minuten bei 225 x g zentrifugiert, der Überstand abgeschüttelt und das Pellet in 1 ml Lysispuffer resuspendiert. Das Gemisch wurde nun 40 Minuten auf Eis gestellt und alle 10 Minuten geschüttelt. Danach folgte eine 30-minütige Zentrifugation mit 16000 x g (4°C). Im Überstand waren nun die lysierten Zellbestandteile enthalten, die bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung konserviert wurden.

Nun wurde die benötigte Anzahl an Kavitäten einer 96-Lochplatte mit einem Ziege-anti-Maus-Ig-(H+L)-mAk (10µg/ml, 25µl/Kavität) für ca. 12 Stunden bei 4°C beschichtet. Anschließend wurde die Platte 3 mal mit 200µl PBS je Vertiefung gewaschen. Daraufhin wurden 200µl der zu testenden Antikörper aufgetragen und wiederum bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Kavitäten mit jeweils 200µl PBS mit 2% BSA für 30 Minuten bei 37°C blockiert, bevor pro Vertiefung 200µl Lysatüberstand pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Danach wurde das Lysat abgenommen und das Präzipitat mit je 200µl gewaschen: erst 7 mal mit Waschpuffer, dann 3 mal mit PBS. Als nächstes wurden die Proteine durch Zugabe von je 50µl 1x-Laemmli-Puffer für 45 Minuten bei 37°C von der Platte gelöst. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Gemische in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Um die Proteine mit SDS zu beladen wurden sie bei 95°C für 5 Minuten gekocht [49].

3.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Material:

10 % Ammoniumpersulfat (APS)	1g ad 10 ml	APS Aqua dest.
4x Tris-Cl/SDS-Puffer, pH 8,8	91 g 2 g 300 ml mit NaOH auf pH 8,8 einstellen	Tris SDS Aqua dest.
4x Tris-Cl/SDS-Puffer, pH 6,8	30,2 g 144 g 200 ml	Tris Glycin Aqua dest.
5x Elektrophoresepuffer:	15 g 72 g 5 g ad 1000 ml	Tris Glycin SDS Aqua dest.
Sammelgel (4%):	0,65 ml 1,25 ml 3,05 ml 25 µl 5 µl	Acrylamid(30%)/Bisacrylamid(0,8%)-Lsg. 4x Tris-Cl/SDS-Puffer, pH 6,8 H ₂ O APS (10%) TEMED
Trenngel (12%):	6,0 ml 3,75 ml 5,25 ml 50 µl 10 µl	Acrylamid(30%)/Bisacrylamid(0,8%)-Lsg. 4x Tris-Cl/SDS-Puffer, pH 8,8 H ₂ O APS (10%) TEMED

Methode:

Zur weiteren Analyse folgte das Auftrennen der Proteine nach ihrer Größe durch **SDS-Gelelektrophorese**. Dazu wurde ein 4 %-iges Sammel- und ein 12 %-iges Trenngel gegossen und jeweils 20µl Probe aufgetragen. Bei reduzierten Gelen wurde 19µl Probe verwendet und diese vor dem Auftragen für 5 Minuten mit 1µl 2-Mercaptoethanol auf 95°C erhitzt. Das Gel wurde in eine mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Am Sammelgel wurden 30 mA, am Trenngel 60 mA angelegt.

Für die **Entwicklung** der jodierten Proteine wurde das Gel mit einem fotosensiblen Film zwischen zwei Verstärkerfolien in eine Röntgenkassette gelegt und diese bis zur Filmentwicklung in einem automatischen Entwickler mindestens 4 Wochen bei -80°C gekühlt.

Die **Berechnung** der annähernden Molekulargewichte erfolgte durch Ausmessen der Laufstrecken der Proteine und dem Vergleich mit Markerbanden.

3.4.5 Analyse von mRNA stimulierter und unstimulierter Zellen

Zunächst wurden 8×10^7 **Zellen gewonnen** (vgl. 3.2), in einem 15 ml Falcon[®]-Röhrchen 10 Minuten lang mit $225 \times g$ zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Anschließend wurde das Reagenzgefäß in flüssigen Stickstoff getaucht und damit die **Zellen schockgefroren**. Die weitere Aufbewahrung erfolgte bei -80°C

Als nächstes wurde die **RNA** aus diesen Zellen **isoliert**:

Methode:

Das Zellpellet wurde in 1 ml Trizol[®]-Reagenz auf Eis resuspendiert, dann 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde zelluläre DNA mit Hilfe einer 20g-Kanüle zerkleinert, indem die Zellen mit der Spritze aufgezogenen und wieder ausgepresst wurden. Als nächstes wurden 0,2 ml Chloroform dazugegeben und die Suspension in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, in dem es 15 Sekunden lang geschüttelt wurde. Darauf folgte eine 2 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Zentrifugation des Gemischs mit $12000 \times g$ bei 4°C über 15 Minuten führte zur Ausbildung von 3 Schichten, von denen die oberste in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol wurde schließlich die RNA ausgefällt und noch 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Als nächstes musste das Gefäß für eine halbe Stunde in eine auf -20°C eingestellte Gefriertruhe verbracht werden, bevor das Gemisch erneut bei 4°C mit $12000 \times g$ 10 Minuten lang zentrifugiert wurde. Nun wurde der Überstand abgekippt und das Gefäß mit einem Zelltuch getrocknet. Das Pellet ließ sich anschließend in 1,0 ml Ethanol (70%) durch Schütteln lösen und wurde dann mit $7500 \times g$ bei 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde der

3 Material und Methoden

Überstand abgekippt und mit einem Zelltuch für absolute Trockenheit des Reagenzgefäßes gesorgt. Als nächstes wurde 200µl RNase-freies Wasser dazugeben.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und ihre Qualität durch Auftragen auf ein Agarose-Gel (**Agarosegelelektrophorese**) überprüft.

Material:

EDTA-Lösung (0,5 M):	186,1 g ad 700 ml NaOH	Na ₂ EDTA • 2H ₂ O Aqua dest. zugeben bis pH 8,0
5x TBE:	54 g 27,5 g 20,0 ml (Zum Gebrauch 1:10 in Aqua dest. verdünnen.)	Tris Borsäure krist. EDTA (0,5 M, pH 8,0)
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg 1,0 ml (Zum Gebrauch 1:20 000 in Aqua dest. verdünnen.)	Ethidiumbromid Aqua dest.

Methode:

Zunächst wurde zu 5x TBE-Puffer 1% Agarose gegeben und in einer Mikrowelle langsam erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Das flüssige Gel wurde langsam in eine Elektrophoresekammer gegossen, sodass sich keine Luftblasen bildeten und ein Probenkamm eingesteckt. Sobald das Gel erstarrt war, wurde es mit 0,5 % TBE-Puffer bedeckt und der Kamm entfernt. Dann wurde je 5µl Probe mit jeweils 1µl 6x-Probenpuffer® vermischt und in die Vertiefungen pipettiert. Um das Molekulargewicht bestimmen zu können, wurden entsprechende Marker (Agarosegel-Marker®: 100bp DNA Ladder plus) mitverwendet. Durch Anlegen einer Spannung von 120V für ca. 30 Minuten wurden die RNA-Stücke der Größe nach aufgetrennt. Gefärbt wurde das Gel 20 Minuten lang in einer Ethidiumbromid-Lösung, bevor die Banden mittels UV-Strahlung sichtbar gemacht und schließlich fotografiert wurden. Nun folgte die **Synthese der c-DNA** mit Hilfe des „*Reverted Aid™ H Minus First Strand cDNA Synth Kit*“, in dem alle benötigten Reagenzien enthalten waren. Dieser sogenannte RT-Schritt bestand in der Synthese der c-DNA aus der gewonnenen RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase.

Methode:

Zunächst wurden 5µl RNA, 1µl oligo-dT und 6µl Aqua dest. in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert, geschüttelt und kurz bis 16000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Gemisch im Thermocycler 5 Minuten auf 70°C erhitzt und danach auf Eis gestellt. Dazu wurden nun 4µl 5x Puffer, 1µl RNase-Inhibitor und 2µl dNTP's gegeben. Nach kurzem Durchmischen auf einem Schüttler, Zentrifugation (s.o.) und Inkubation bei 37°C für 5 Minuten wurde auf Eis 1µl des Enzyms M-MLV-RT (Reverse Transkriptase) zugegeben, das die RNA in c-DNA umschrieb. Die Reaktionsbedingungen von 42°C für 60 Minuten und anschließend 70°C für 10 Minuten wurden in den Thermocycler einprogrammiert. Durch Zugabe von 80µl hochreinem, für PCR geeignetem Aqua dest., entstanden insgesamt 100µl c-DNA-Lösung pro Ansatz. Der nächste Analyseschritt erfolgte mittels **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**. Dabei fanden wiederum die Reagenzien des „*Reverted Aid™ H Minus First Strand cDNA Synth Kit*“ Verwendung. Die Primer wurden durch die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert (vgl. Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: **Primer**, synthetisiert durch MWG Biotech AG, Ebersberg

Protein	Primer-Nr.	Temperatur	Sequenz
Aktin	5' 515	50 °C	TGATCTTGATCTTCATCGTGCTGG
	3' 516	50 °C	TGCGTGACATCAAGGAGAAG
IL2	5' 519	55 °C	CCTTGCAAACAGTGACACCTA
	3' 521	55 °C	GCATTTCTCCAGAGGTTTG
IL4	5' 523	55 °C	CTCCAGCTCTGGTCTGCTT
	3' 525	55 °C	TTGAGGTTCTGTCCAGTCC
IFN γ	5' 531	55 °C	GTGTGCGATTTTGGGTTCTT
	3' 533	55 °C	CAGGTCCTCCTTGATGGTGT
TNF α	5' 535	55 °C	AGCCCATGTTGTAGCAAACC
	3' 537	55 °C	GAGACAGCTAAGCGGCTGAT

Tabelle 3.5: **PCR-Ansatz**

3,0 µl	c-DNA
1,5 µl	ddNTP (2mM)
1,5 µl	10x Puffer (für Taq-Polymerase)
3,0 µl	3´-Primer (20 mM)
3,0 µl	5´-Primer (20 mM)
2,8 µl	Aqua dest.
0,2 µl	AmpliTaq DNA Polymerase (1 Unit)

Methode:

Als erstes wurde jeder Ansatz nach Tabelle 3.5 zusammenpipettiert. Für die aufeinander folgenden Reaktionsbedingungen wurde der Thermocycler programmiert: Zunächst erhitze er das Gemisch für 10 Sekunden auf 95°C, sodass die c-DNA komplett denaturiert wurde. Im 30 Sekunden dauernden zweiten Schritt lagerten sich die Primer an die DNA-Stränge an, die wiederum die Startstellen für die Polymerase bildeten. Die Temperatur für die jeweiligen Primer lässt sich in Tabelle 3.4 ablesen. Im dritten Schritt (2 Minuten, 72°C) ergänzte die hitzeresistente Taq-Polymerase den Einzelstrang vom Primer beginnend zu einem Doppelstrang. Der gesamte Zyklus wurde 35 mal wiederholt, so dass es zu einer starken Vervielfältigung der durch die Primer markierten Stücke kam. Abschließend inkubierte der Thermocycler die Proben noch einmal bei 72°C für 10 Minuten, ehe er die Proben zur Konservierung auf 4°C herabkühlte.

Zur Analyse wurden die Proteinbanden mittels **Agarosegelelektrophorese** (s.o.) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Hatten die Zellen mRNA der untersuchten Proteine gebildet, so wurde eine entsprechende Bande sichtbar.

4. Ergebnisse

4.1 Übersicht

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs Fusionen durchgeführt, vier mal wurden Periphere Blutleukozyten zur Immunisierung der Mäuse verwendet und je ein mal Lymphknoten-Lymphozyten und Intestinale Intraepitheliale Leukozyten. Aus einer Auswahl von pro Fusion ca. 90 in der Immunfluoreszenzanalyse auf PBL, Lymphknoten-Lymphozyten und Intraepithelialen Leukozyten positiven Überständen, wurden 78 Antikörper im FACScan näher untersucht. In der Tabelle 4.1 ist die Ausbeute an Antikörpern aus den einzelnen Fusionen dargestellt.

Tabelle 4.1: Ausbeute an mAKs aus den einzelnen Fusionen

Fusion	Material zur Immunisierung	Anzahl mAk (getestet)	Anzahl mAk (Klone)
1	PBL	12	1
2	PBL	3	1
3	PBL	0	0
4	PBL	39	8
5	Lkn	13	4
6	IEL	11	4
Summe		78	18

Mit Hilfe von spezifischen sekundären Antikörpern konnten von 76 Antikörpern die Immunglobulinsubklassen mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden.

Die Überstände wurden bezüglich Ihrer Bindung an Periphere Blutleukozyten, Leukozyten aus Lymphknoten und Darmepithel, dem Darmepithel (DE) selbst, Milz, der Zelllinie EqT8888 und Lymphknotenlymphozyten eines an einem Lymphom erkrankten Pferdes, getestet. 18 Antikörper wurden daraufhin zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Kriterien waren, neben einem stabilem Wachstum und der kontinuierlichen Produktion von Antikörpern, die Ausbildung von gut abgesetzten, positiven Populationen in der

Immunfluoreszenzanalyse. Außerdem sollten die monoklonalen Antikörper spezifisch an Leukozyten binden, also beispielsweise nicht Epithelzellen erkennen.

Tabelle A.3 im Anhang A zeigt eine Übersicht der FACScan-Analysen aller Klone, sowie ihre Immunglobulinsubklassen. Zu beachten ist, dass die Einteilung der Zellpopulationen Peripherer Blutleukozyten in Lymphozyten und Granulozyten anhand des Erscheinungsbildes der Zellen im FACScan erfolgte: Vergleicht man das, die Größe der Zellen bestimmende Vorwärtsstreulicht (FSC) mit dem Seitwärtsstreulicht (SSC) der Zellen, das Aufschluss über die Granularität gibt, so lassen sich die in Abbildung 4.1 dargestellten Populationen, Lymphozyten (mittlere Größe, geringe Granularität), Granulozyten (groß, starke Granularität) und Erythrozyten mit Zellfragmenten (klein, variable Granularität) abgrenzen. Dabei kann man aber nicht ausschließen, dass sich ein geringer Prozentsatz Lymphozyten im Granulozyten-Gate befindet und umgekehrt.

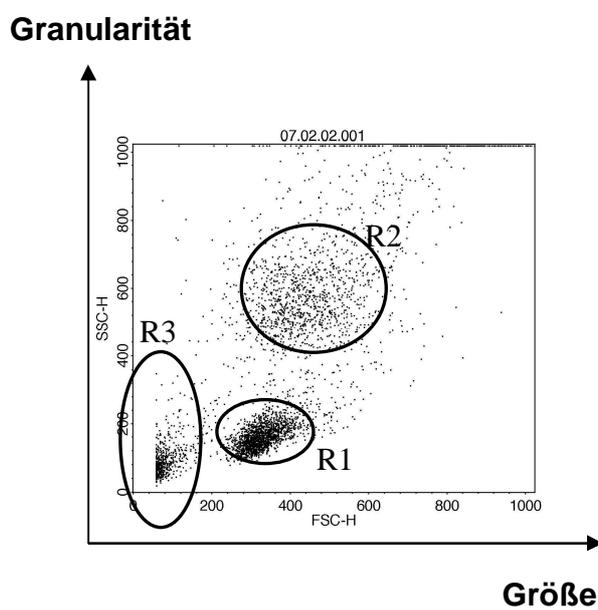


Abbildung 4.1: Einteilung der PBL-Zellpopulationen im FACScan

Aufgrund von Größe und Granularität lassen sich 3 Zellpopulationen bestimmen:
R1 Lymphozyten, R2 Granulozyten, R3 Zellfragmente und Erythrozyten

Als nächstes wurden Gruppen aus Antikörpern mit ähnlichen Eigenschaften erstellt (vgl. Tabelle 4.2). Auch hier ist zu beachten, dass geringgradig positive Messwerte, vor allem bei den Granulozyten, auf einzelne große, granulierte Lymphozyten zurückzuführen sein können:

Tabelle 4.2: Gruppeneinteilung von mAKs anhand von Ergebnissen der Durchflusszytometrie mit PBL

SK		PBL (% positive Zellen)				
		Lymphozyten		Granulozyten		n
Kontrollen		MW	Spanne	MW	Spanne	
Anti-CD4	IgG1	51	35-66	5	1-25	21
Anti-CD8	IgG2a	14	2-44	4	0-6	18
Anti-Ig-Pferd-FITC		20	8-34	11	3-21	14
Gruppe 1:						
4-13	IgG1	73	46-90	6	1-23	18
4-58	IgG2a	78	45-93	5	0-23	18
5-50	IgG1	50	29-74	5	1-14	9
Gruppe 2:						
1-19	IgG1	23	8-48	13	5-26	20
2-52	IgG2b	23	8-50	6	2-19	19
4-36	IgG1	25	8-83	16	7-38	17
4-55	IgG2a	15	7-31	3	0-6	12
6-39	IgG2a	28	15-52	5	0-11	9
Gruppe 3:						
6-5	IgG1	76	33-100	62	17-100	9
6-17	IgG2a	89	32-100	78	41-100	9
Gruppe 4:						
4-18	IgG1	9	2-25	92	74-100	17
4-19	IgG1	5	1-10	91	71-100	9
Gruppe 5:						
4-3	IgG2b	23	8-64	5	2-21	18
4-39	IgG1	19	6-45	74	64-100	16
5-17	IgM	20	10-38	9	0-28	8
5-21	IgG2a	30	14-54	12	0-42	9
5-80	IgG2a	35	16-53	12	1-35	9
6-24	IgM	47	22-78	27	4-70	8

SK: Immunglobulinsubklasse

MW: arithmetisches Mittel

n: Anzahl der durchgeführten Untersuchungen

Die Überstände der Klone 4-13, 4-58 und 5-50 (Gruppe 1) entsprechen in etwa der Summe aus CD4- und CD8-positiven Zellen (MW = 65%) und kommen daher als T-Zell-Marker in Betracht. Bei 1-19, 2-52, 4-36, 4-55 und 6-39 (Gruppe 2) könnte es sich um Antikörper handeln, die an B-Lymphozyten binden. 6-5 und 6-17 markieren fast alle weißen Blutzellen (Gruppe 3). Zur Anfärbung von Granulozyten können die Antikörper 4-18 und 4-19 verwendet werden, wobei der Klon 4-19 wegen schlechten Wachstums aus der engeren Auswahl herausgenommen wurde (Gruppe 4). 4-3, 4-39, 5-17, 5-21, 5-80 und 6-24 (Gruppe 5) konnten zunächst keiner definierten Subpopulation zugeordnet werden, wurden aber aufgrund ihrer guten Färbeeigenschaften in der Durchflusszytometrie weiter untersucht.

Diese Einteilung wird durch Messergebnisse bestätigt, die das Verhalten der Antikörper vor und nach dreitägiger Stimulation von Peripheren Bluteukozyten mit 10µg Concanavalin A pro ml Medium beschreiben (Tabelle 4.3):

Der Prozentsatz an Anti-CD4-, mAk 4-13-, 4-58- und 5-50-positiven Zellen steigt an, während B-Lymphozyten, markiert durch einen Anti-Ig-Pferd-FITC-Antikörper, weitgehend aus der Kultur verschwunden sind. Dementsprechend sinken die Prozentsätze positiver Zellen für die Klone in Gruppe 2. Die Gruppe 3 bleibt konstant bei 100%. Die Antikörper der Klone 4-3, 4-39 und 5-21 verhalten sich ähnlich wie die der Klone in Gruppe 2.

Tabelle 4.3: Periphere Bluteukozyten vor und nach Stimulation mit ConA

mAk	Prozent positive Zellen		mAk	Prozent positive Zellen	
	Tag 0	Tag 3		Tag 0	Tag 3
CD4	38	58	anti-Ig-Pfd	34	6
4-13	36	91	1-19	31	6
4-58	58	99	2-52	32	5
5-50	38	99	4-36	31	6
			4-55	29	5
			6-39	30	5
6-5	100	100	4-3	32	10
6-17	100	100	4-39	20	10
			5-21	36	3

4 Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Beschichtung von 96-Lochplatten mit den Überständen der Klone die Proliferation von Peripheren Blutleukozyten beeinflusst (Tabelle 4.4):

Bei drei verschiedenen Pferden wurde die deutlichste Steigerung mit einem Stimulationsindex (SI) von durchschnittlich 7,9 bei Klon 4-58 gemessen. Das entspricht einem 7,9 mal stärkeren Wachstum als bei Zellen in Standardmedium in unbeschichteten Kavitäten. In einem Fall wurde sogar der Stimulationsindex der Positivkontrolle (Zellen in Standardmedium mit Zusatz von 10,0 µg/ml Concanavalin A) um das Zweifache übertroffen. Bei allen anderen Überständen konnte keine konstante, deutliche Beeinflussung der Proliferation nachgewiesen werden.

Tabelle 4.4: Proliferationsassays mit PBL

Assay-No.:		39		41		53	
mAk	SI (MW)	SI	Stabw (SI)	SI	Stabw (SI)	SI	Stabw (SI)
Medium	1,0	1,0	0,6	1,0	0,2	1,0	0,4
ConA (10 µg/ml)	22,2	51,4	24,6	5,8	0,9	9,4	7,0
1-19	1,9					1,9	0,4
4-3	2,7	2,7	1,5				
4-13	1,5	2,5	1,5	0,9	0,4	1,0	0,1
4-18	2,1	2,1	1,3				
4-36	2,1	1,7	1,1	2,7	0,6	1,8	0,3
4-39	1,6	1,5	1,4	2,2	0,2	1,2	0,6
4-55	2,0	2,2	1,5	1,6	0,2	2,3	0,2
4-58	7,9	4,0	1,5	12,6	1,1	7,1	3,0
5-17	3,6	5,5	3,9	2,7	0,7	2,5	0,3
5-47	2,4	3,1	1,9	2,6	0,4	1,5	0,4
5-50	1,1	0,8	0,2	0,7	0,1	1,8	0,8
5-80	3,1	4,9	0,4	2,6	0,2	1,8	0,7
6-5	2,4	2,8	1,4	2,3	0,4	2,1	0,2
6-17	3,3	4,6	2,1	2,5	0,3	2,8	0,6
6-24	3,0	5,6	0,9	2,8	0,4	0,8	0,8
6-39	1,5	1,6	1,0	1,2	0,4	1,6	0,8

SI: Stimulationsindex

STAB (SI): Standardabweichung des Stimulationsindex

SI (MW) : Arithmetisches Mittel der Stimulationsindices

Jeder Antikörper wurde jeweils in 3-fach-Ansätzen, die Kontrollen (Zellen mit Medium und Zellen, stimuliert mit Concanavalin A) in jeweils 9 Kavitäten untersucht.

Mit Hilfe der Immunpräzipitation wurde versucht Molekülmasse und Anzahl der Moleküle zu bestimmen, an die die monoklonalen Antikörper 4-13 und 4-58 binden (vgl. Abbildung 4.2). Da die Banden verhältnismäßig breit sind und zuverlässige Kontrollen fehlen, können die Molekulargewichte im Verhältnis zum Marker nur grob abgeschätzt werden. Die Ergebnisse müssen daher als vorläufig gelten und können nur einen groben Überblick geben.

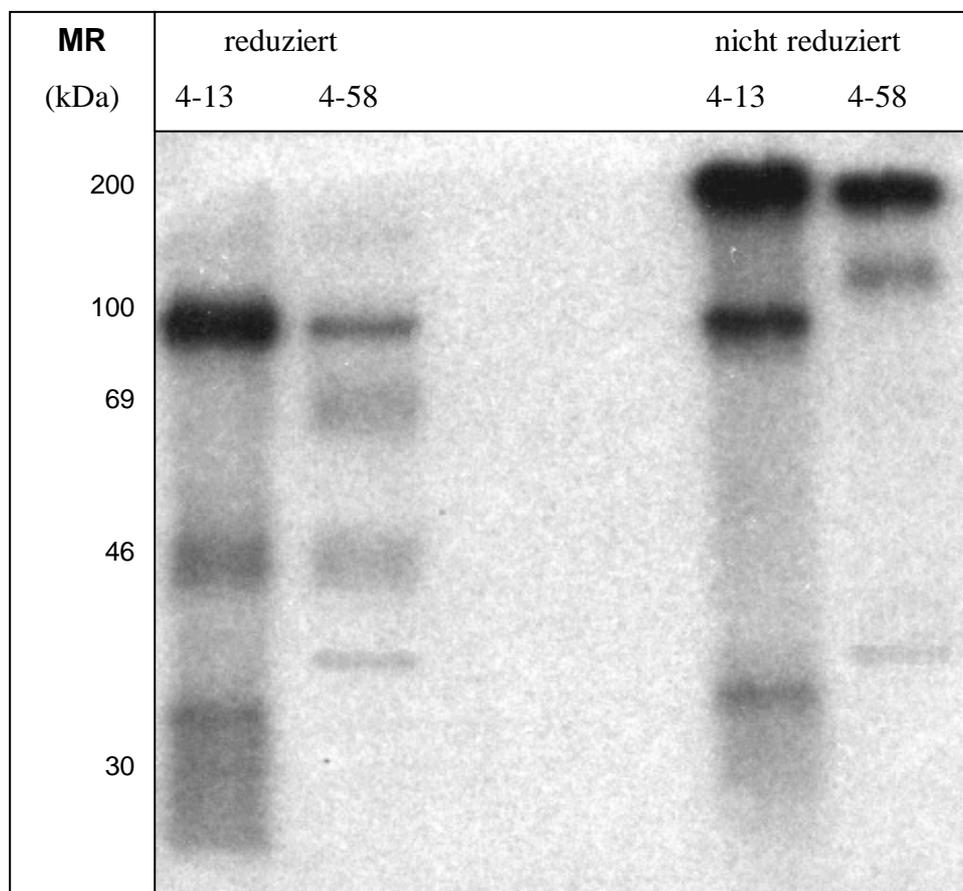


Abbildung 4.2: Immunpräzipitation mAk 4-13 und mAk 4-58

Mittels Immunpräzipitation wurden die Molekülmassen (MR) der Proteine bestimmt (in kDa), an die die Antikörper 4-13 und 4-58 binden. In der linken Hälfte wurden die Proteine vor dem Auftragen auf das SDS-Gel mit Hilfe von Mercaptoethanol reduziert.

Die Präzipitation mit dem Antikörper 4-13 ergab für die reduzierte Probe drei Banden im Bereich von 100 kDa, 69 kDa und 35 kDa. Ohne Reduktion der Moleküle waren Banden bei etwa 35 kDa, 100 kDa und 200 kDa zu sehen.

Für den mAk 4-58 lassen sich für die Probe, die mit Mercaptoethanol reduziert wurde, vier Banden abgrenzen. Die Molekulargewichte liegen in etwa bei 35 kDa, 46 kDa, 69 kDa und 100 kDa. Die nicht reduzierte Probe lässt Molekulargewichte von etwa 35 kDa, 130 kDa und 200 kDa vermuten.

In den folgenden Kapiteln werden die wichtigsten Klone einzeln charakterisiert.

4.2 MAk 4-13

Der monoklonale Antikörper 4-13 bindet nach Analysen im FACScan im Mittel an 73% aller Peripheren Blutlymphozyten, 6% aller Granulozyten, 50% der Leukozyten im Lymphknoten und 57% der Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten. An Epithelzellen und Zellen der Zelllinie EqT8888 erfolgt keine Bindung. Dagegen erkannte der Antikörper 90% der Zellen eines equinen Lymphoms. MAk 4-13 gehört zur Immunglobulinsubklasse IgG1 (vgl. Tabelle A.3) und fördert nicht die Stimulation von Leukozyten (vgl. Tabelle 4.4).

Der Anteil der zytometrisch positiven Peripheren Blutlymphozyten steigt nach dreitägiger Stimulation mit Concanavalin A von 36% auf 91% an (vgl. Tabelle 4.3).

Um genauere Ergebnisse mit diesem Antikörper zu erhalten, wurde er über eine G-Sepharose-Säule gereinigt, auf eine Dichte von 1 mg/ml eingestellt und biotinyliert. Dadurch waren qualitativ hochwertige Analysen im FACScan, insbesondere bei Doppelfärbungen möglich. Durch Titration wurde ermittelt, dass eine Verdünnung von 1:3000 für den gereinigten und eine Verdünnung von 1:500 für den biotinylierten Antikörper die besten Ergebnisse liefern.

Mit Hilfe des biotinylierten Antikörpers wurden eine Reihe von Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Es werden einige charakteristische Daten präsentiert:

Bei der Verwendung von Lymphknoten-Leukozyten (vgl. Abbildung 4.3) ist eine sehr gute Trennung der mAk 4-13-positiven Population (35%) von der Population der B-Zellen (52%) zu erkennen, die mit einem Anti-Ig-Pferd-FITC-Antikörper ermittelt wurde. Nur 5% der Leukozyten waren doppelt positiv. 8% der Zellen wurden von keinem Antikörper angefärbt. Ähnliche Ergebnisse ergab die Analyse der Antikörper 1-19 und 6-39. Hier wurden 4% bzw. 3% der Zellen von beiden Antikörpern markiert, 38% bzw. 37% aller Zellen gingen lediglich eine Bindung mit mAk 4-13 ein und 43% bzw. 29% der Lymphozyten waren nur für den jeweils zweiten monoklonalen Antikörper positiv. Die Doppelfärbung mit einem Marker für CD4-positive Zellen ergab eine doppelt positive Population von 21%, während 16% aller Zellen ausschließlich vom mAk 4-13 angefärbt wurden. Nur 3% der Zellen besaßen das CD4-Antigen, ohne auch gleichzeitig von mAk 4-13 erkannt zu werden.

Mak 4-13 erkannte eine klare Subpopulation der mAk 6-5-positiven Zellen (38%) und bildete keine klaren Subpopulationen mit dem mAk 4-39 aus.

Die Abbildung 4.4 zeigt die Ergebnisse von Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalysen mit Peripheren Blutleukozyten:

Die B-Zellen (32%) ließen sich klar von den mAk 4-13-positiven (45%) abgrenzen. Nur 2% der Zellen waren doppelt positiv. Auch die Färbung mit dem mAk 1-19 zeigte eine ähnliche Verteilung der Populationen. Hier waren 1% doppelt positiv, mit mAk 4-13 konnten 42% der Zellen und mit mAk 1-19 39% der Zellen angefärbt werden.

Im Gegensatz zu den Messungen bei Lymphknoten-Leukozyten gab es eine sehr deutliche Population von Zellen, die CD4 positiv waren (16%), ohne auch durch mAk 4-13 erkannt zu werden. 24% der Zellen besaßen beide Epitope und 13% wurden nur durch mAk 4-13 gefärbt. Strukturen, an die die monoklonalen Antikörper 4-58 und 6-5 binden, befanden sich auf 96% bzw. 89% aller Zellen. 43% bzw. 45% waren gleichzeitig für mAk 4-13 positiv. Nur 1% bzw. 4% wurden ausschließlich von mAk 4-13 erkannt.

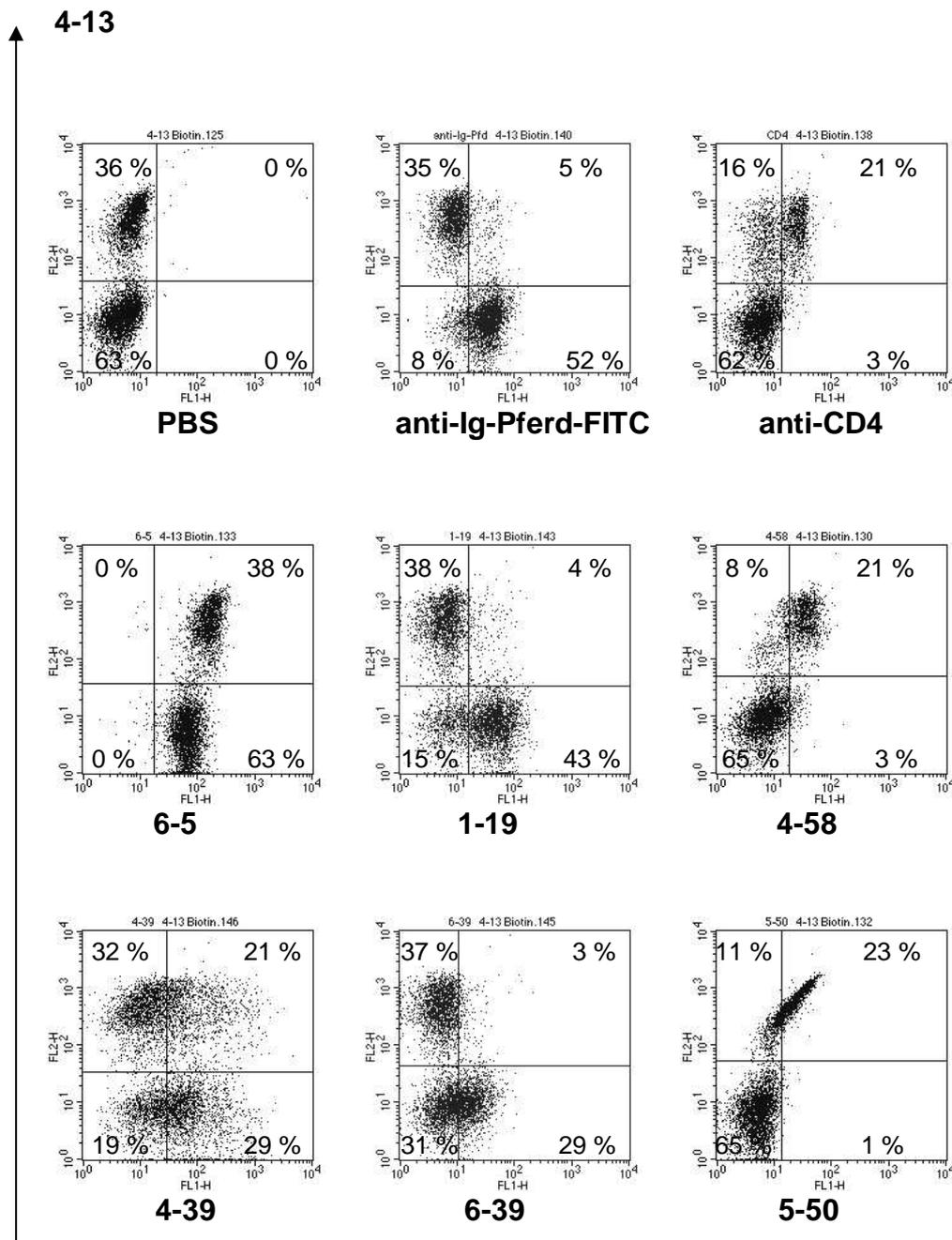


Abbildung 4.3: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von Lymphknoten-Leukozyten (mAk 4-13)

Die Daten wurden als Dotplot dargestellt. Die X- bzw. Y-Achse sind jeweils das Maß für die Intensität der Fluoreszenz im grünen (FL1, X-Achse) bzw. im roten Bereich (FL2, Y-Achse).

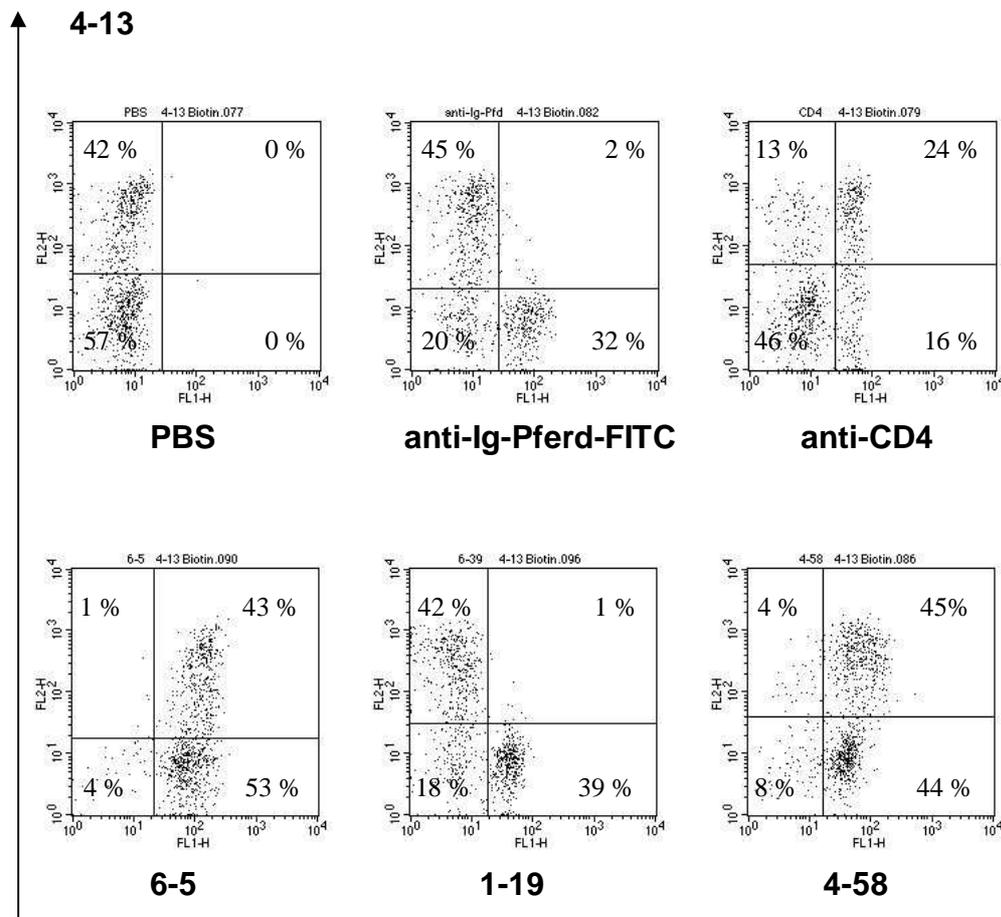


Abbildung 4.4: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 4-13)

Des Weiteren wurden Doppelfärbungen auf IEL durchgeführt (vgl. Abbildung 4.5):

Auffällig ist, dass sich im Darmepithel so gut wie keine B-Lymphozyten befinden. Die Fluoreszenzdaten, sowohl des Antikörpers gegen Immunglobuline des Pferdes, als auch von Antikörpern wie mAk 4-36, überstiegen nicht die der Negativkontrolle mit PBS.

CD4-positive Zellen im IEL (13%) sind ausschließlich auch für mAk 4-13 positiv. 46% aller Zellen wurden dabei nur durch mAk 4-13 angefärbt. Die Anzahl der rein CD4-positiven Zellen lag wiederum im Bereich der Negativkontrolle (2%).

Wurden Zellen mit den Antikörpern 4-13 und 4-58 gefärbt, so waren 39% der Zellen doppelt positiv, 19% wurden nur durch mAk 4-13 und 5% nur durch mAk 4-58 erkannt.

Der monoklonale Antikörper 6-5 hatte in diesem Fall nur an 83% der Zellen gebunden. Alle Zellen, die von mAk 4-13 markiert worden waren, hatten auch ein Epitop für mAk 6-5.

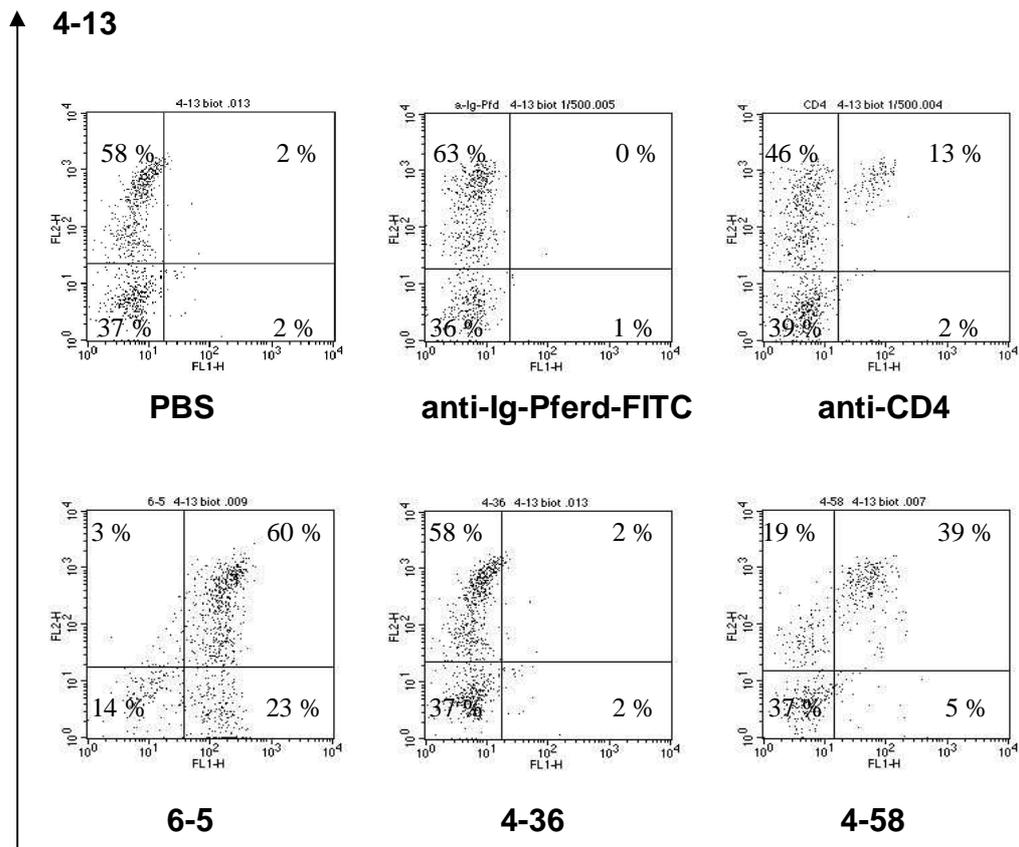


Abbildung 4.5: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von IEL (mAk 4-13)

4.3 MAk 4-58

Durchflusszytometrische Untersuchungen haben ergeben, dass mAk 4-58 im Mittel an 78% aller Peripheren Blutlymphozyten und 5% aller Granulozyten in der Blutbahn, an durchschnittlich 49% der Leukozyten in Lymphknoten und in Präparationen von Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten an 53% der Zellen bindet. Epithelzellen des Dünndarms erkennt der Antikörper ebenso wenig, wie Zellen der Zelllinie EqT8888. Bei der Untersuchung eines Equinen Lymphoms waren 70% der Zellen positiv.

MAk 4-58 gehört der Immunglobulinsubklasse IgG2a an (vgl. Tabelle A.3).

Durch eine dreitägige Stimulation mit Concanavalin A konnte der mAk 4-58-positive Anteil der Zellen von 58% auf 99% gesteigert werden (vgl. Tabelle 4.3).

Der Antikörper wurde nach Aufreinigung über eine G-Sepharose-Säule auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. In der Immunfluoreszenzanalyse konnten die besten Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:200 erzielt werden.

Wie in der Übersichtstabelle 4.4 zu erkennen ist, regt der Antikörper 4-58 Leukozyten zur Proliferation an. In drei Experimenten mit Peripheren Blutleukozyten wurden Proliferationsindices von 4,0, 12,6 und 7,1 bei Standardabweichungen von 1,5, 1,1 und 3,0 gemessen, woraus sich ein durchschnittlicher Stimulationsindex von 7,9 errechnen lässt.

Um die Ergebnisse zu spezifizieren, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der gereinigte mAk 4-58 titriert und die Proliferation von Peripheren Blutleukozyten bei zwei Pferden (Pferd 1, Pferd 2) und von Leukozyten aus dem Lymphknoten eines weiteren Pferdes (Pferd 3) gemessen. Abbildung 4.6 zeigt die graphische Darstellung der Titrationskurven.

Während die Stimulation im Bereich zwischen 2,0 μ g und 0,1 μ g Antikörper innerhalb eines Probanden nahezu gleich blieb und durchwegs mehr als das Doppelte der Concanavalin A-Kontrolle betrug, zeigte sich spätestens ab einer Konzentration von 0,05 μ g ein deutlicher Rückgang der Proliferation, die bei 0,01 μ g Antikörper pro Kavität nur noch bei Pferd 3 nachweisbar war. Die Stimulation der Lymphknoten-Lymphozyten durch Concanavalin A

war deutlich schwächer, als bei den Leukozyten aus der peripheren Blutbahn. Dagegen war die Stimulation durch den Antikörper bei Pferd 3 deutlich höher als bei den Pferden 1 und 2. Die genauen Zahlen finden sich in der Tabelle A.4 in Anhang A.

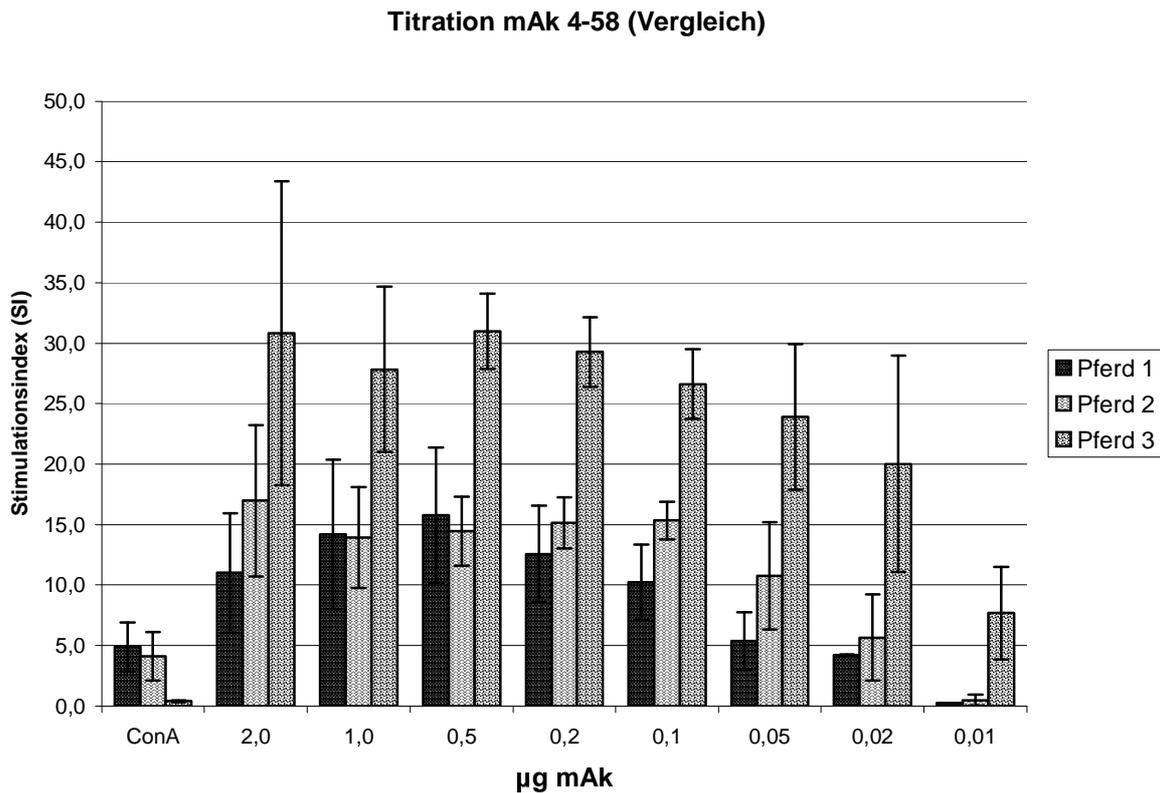


Abbildung 4.6: Proliferation von Leukozyten nach Stimulation mit mAk 4-58

Während auf der X-Achse die Verdünnung des monoklonalen Antikörpers von 2,0 µg bis 0,01 µg pro Kavität in log₂-Schritten, sowie der Vergleich zur Stimulation mit Concanavalin A (ConA) aufgetragen ist, zeigt die Y-Achse die jeweiligen Stimulationsindices, sowie die dazugehörigen Standardabweichungen. Pro Kavität wurden 2×10^5 Zellen pipettiert. Von den Pferden 1+2 wurde PBL, von Pferd 3 Lymphknoten-Leukozyten verwendet.

In einem weiteren Experiment wurden Periphere Blutleukozyten eine Woche in einer Kulturschale, die mit mAk 4-58 beschichtet war, bei 37°C inkubiert. Dann wurden diese Zellen auf beschichtete und unbeschichtete Kavitäten einer 96-Lochplatte verteilt. Wie Tabelle 4.5 zeigt, war das Wachstum der Zellen in beschichteten Kavitäten um den Faktor 6,6, bzw. nach einer Vorbeschichtung der Vertiefungen mit Anti-Ig-Maus-Antikörper, um den Faktor 5,5 höher, als das der Zellen ohne erneuten Zusatz von mAk. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Periphere Blutleukozyten ohne jegliche Stimulation nach dieser Zeit abgestorben waren.

Tabelle 4.5: Proliferationsassay No. 60 (mAk 4-58-stimulierte Zellen mit/ohne erneuter Stimulation)

	SI	STABW (SI)
Zellen+Medium	1,0	0,7
mAk 4-58 (1:200)	6,6	1,7
α -Ig-Maus-mAk + mAk 4-58 (1:200)	5,5	0,9

Als nächstes wurde die mRNA von schockgefrorenen nativen, SEB-stimulierten und mAk 4-58-stimulierten Peripheren Blutleukozyten mittels PCR untersucht, um die Produktion verschiedener Zytokine zu überprüfen. Abbildung 4.7 zeigt das Agarosegel dieses Versuchs. Die Proben der unstimulierten Zellen und der mit mAk 4-58-stimulierten Zellen stammten aus Vollblut eines Pferdes, die SEB-stimulierten Zellen aus dem eines zweiten. Die unstimulierten Leukozyten wurden direkt nach der Gewinnung tiefgekühlt, die anderen Zellen 10 Tage lang stimuliert.

Bei allen drei Proben ergibt der Primer für Aktin als Positivkontrolle eine spezifische Bande, die Negativkontrollen ohne Primer zeigen keine Banden. Aus unstimulierten Peripheren Blutleukozyten konnte weder mRNA für Interleukin-2 (IL-2), noch für Interleukin-4 (IL-4), Interferon gamma (INF γ) und Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) nachgewiesen werden.

In Blutleukozyten werden nach Stimulation mit SEB alle vier untersuchten Zytokine produziert. Im Agarosegel ließen sich mit Hilfe der spezifischen Primer Banden bei 220 Basenpaaren für Interleukin-2, bei 270 Basenpaaren für Interleukin-4, bei 265 Basenpaaren für Interferon gamma und bei 240 Basenpaaren für Tumor-Nekrose-Faktor alpha nachweisen.

Wurden die Zellen in Petrischalen kultiviert, die mit dem monoklonalen Antikörper 4-58 beschichtet waren, ergab die Untersuchung ein positives Ergebnis für Interleukin-4 (270 Basenpaare) und Interferon gamma (265 Basenpaare).

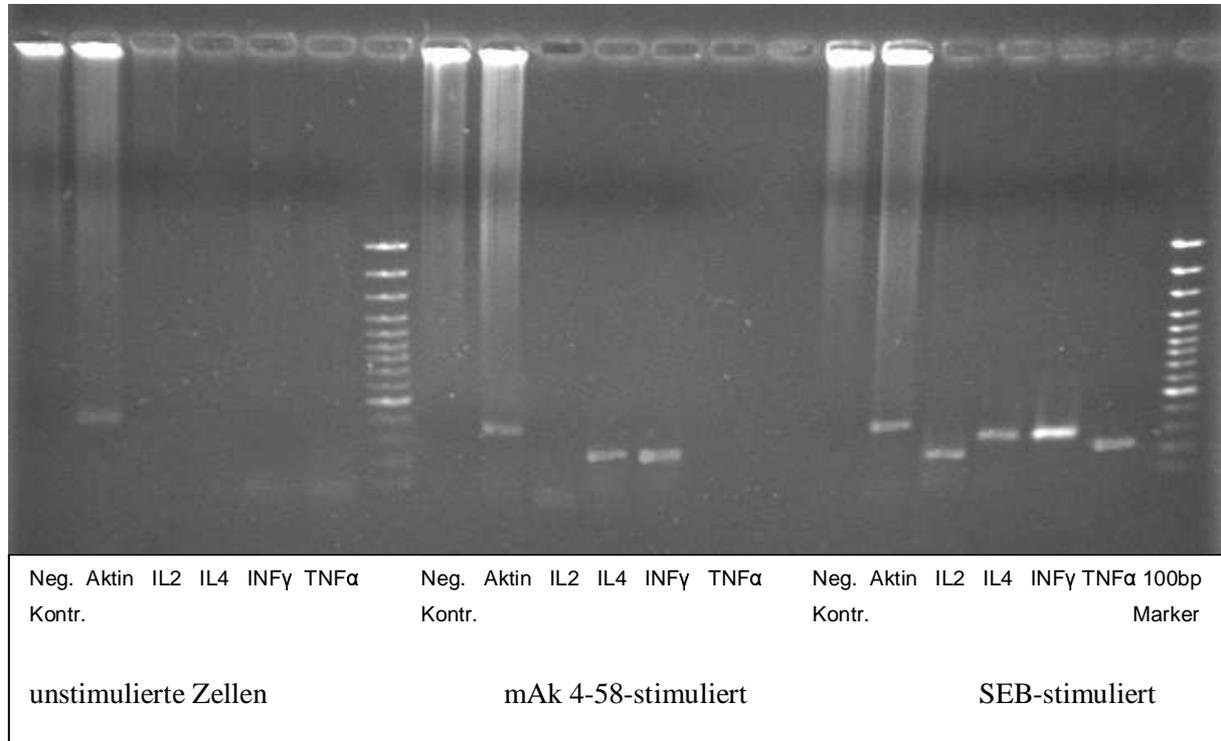


Abbildung 4.7:
Nachweis der m-RNA verschiedener Zytokine in stimulierten und unstimulierten Zellen mittels PCR

Mit spezifischen Primern wurde mittels PCR nach der mRNA verschiedener Zytokine gesucht, die in mAk-4-58-stimulierten Peripheren Blutleukozyten auftreten. Als Positivkontrolle wurden Primer für β -Aktin genutzt. Für die Negativkontrolle wurde kein Primer hinzugefügt. Der Marker zeigt alle 100 Basenpaare eine Bande. Unstimulierte Zellen bilden keine mRNA der untersuchten Zytokine, in SEB-stimulierten Zellen lassen sich alle 4 Zytokine nachweisen.

Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalysen (Abbildung 4.8), in diesem Fall mit Leukozyten aus dem Lymphknoten, helfen das Bindungsverhalten des mAk 4-58 weiter einzuordnen:

Die B-Lymphozyten, markiert durch einen Anti-Ig-Pferd-FITC-Antikörper, machten etwa 66% der Zellen aus. 8% aller Zellen wurden außerdem durch mAk 4-58 gebunden. 21% der Lymphozyten waren nur für mAk 4-58 positiv. 15% der Lymphozyten konnten von keinem der beiden Antikörper erkannt werden.

Die Doppelfärbung mit einem anti-CD4-Antikörper zeigte, dass 16% der Zellen von beiden Antikörpern gebunden wurden. 9% aller Zellen waren ausschließlich für mAk 4-58 und 5% aller Zellen ausschließlich CD4-positiv.

Eine Analyse mit dem mAk 6-39 ergab eine doppelt positive Population von 11%, während 15% der Zellen nur von mAk 4-58 gefärbt wurden. Der größte Teil der Zellen ließ sich nur durch mAk 6-39 (45%) oder gar nicht (29%) anfärben.

Wurde der mAk 4-13 als zweiter Antikörper verwendet, so ergab sich eine gut abgesetzte doppelt positive Population von 26%, gegenüber einer weiteren klaren Population ausschließlich mAK 4-13 positiver Zellen (8%) und einer schlecht abgesetzten 5% starken Population von Zellen, die nur von mAk 4-58 erkannt wurden.

4-58

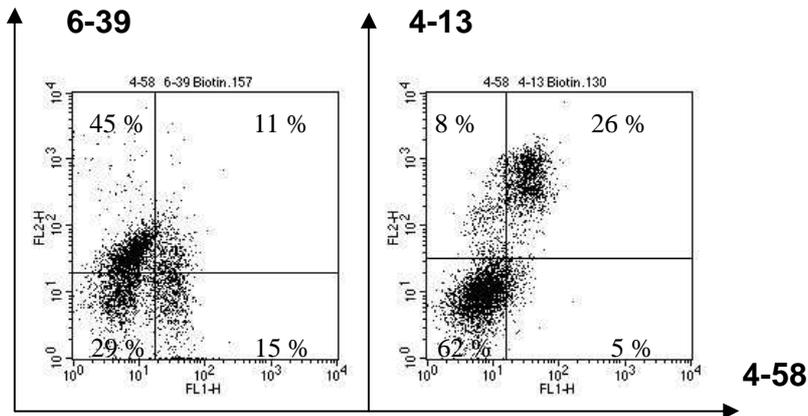
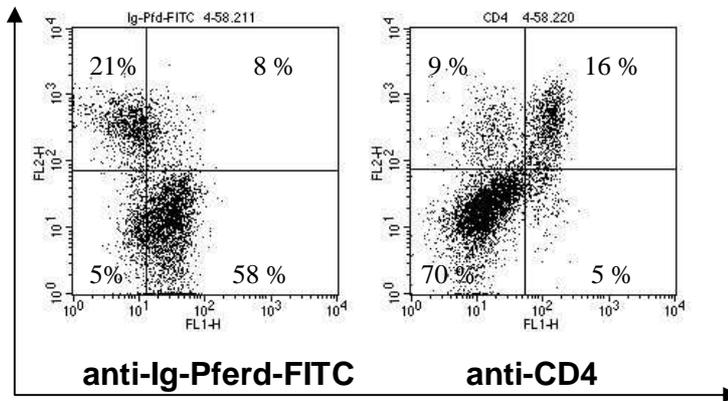


Abbildung 4.8: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von Lymphknoten-Leukozyten (mAk 4-58)

4.4 MAk 5-50

In zytometrischen Untersuchungen bindet der, zur Immunglobulinsubklasse IgG1 gehörende, monoklonale Antikörper 5-50 durchschnittlich an 50% der Peripheren Blutlymphozyten und 5% der Granulozyten. Im Lymphknoten reagieren im Mittel 30%, unter den Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten 37% positiv. Zellen der Zelllinie EqT8888 können nicht, Epithelzellen im Darm können nur zu 1% angefärbt werden. Bei der Untersuchung eines Equinen Lymphoms konnte der Antikörper an 84% der Zellen binden (vgl. Tabelle A.3).

In einer Zellpopulation von Peripheren Blutlymphozyten wurden vor der Stimulation mit Concanavalin A mit Hilfe der Durchflusszytometrie ein mAk 5-50-positiver Anteil von 38%, nach der dreitägigen Stimulation ein Anteil von 99% ermittelt (vgl. Tabelle 4.3).

Untersuchungen mit Hilfe der Zwei-Farben-Durchflusszytometrie mit Peripheren Blutlymphozyten führen zu folgenden Ergebnissen (vgl. Abbildung 4.9):

Die Doppelfärbungen mit den monoklonalen Antikörpern 6-39 und 4-55 ergaben jeweils sehr ähnliche Bilder. Während nur 3% bis 5% der Zellen als doppelt positiv einzuordnen waren, ließen sich gut abgegrenzte Populationen von ausschließlich mAk 5-50-positiven (oberer linker Quadrant), bzw. mAk 6-39- oder mAk 4-55-positiven Zellen (unterer rechter Quadrant) erkennen. Nur ein geringer Prozentsatz zwischen 3% und 13% war keinem der Antikörper zuzuordnen.

Auch mAk 1-19 zeigt eine ähnliche Verteilung: Nur 5% der Zellen besaßen Bindungsstellen für beide Antikörper, 47% der Zellen konnte nur mAk 1-19 anfärben, 33% wurden ausschließlich von mAk 5-50 erkannt und 16% der Zellen waren für beide Antikörper negativ. Verwendete man mAk 4-13 als zweiten Antikörper, so waren 41% der Zellen für beide Antikörper positiv. Nur 13% (mAk 5-50), bzw. 7% (mAk 4-13) ließen sich nur von einem Antikörper anfärben.

4 Ergebnisse

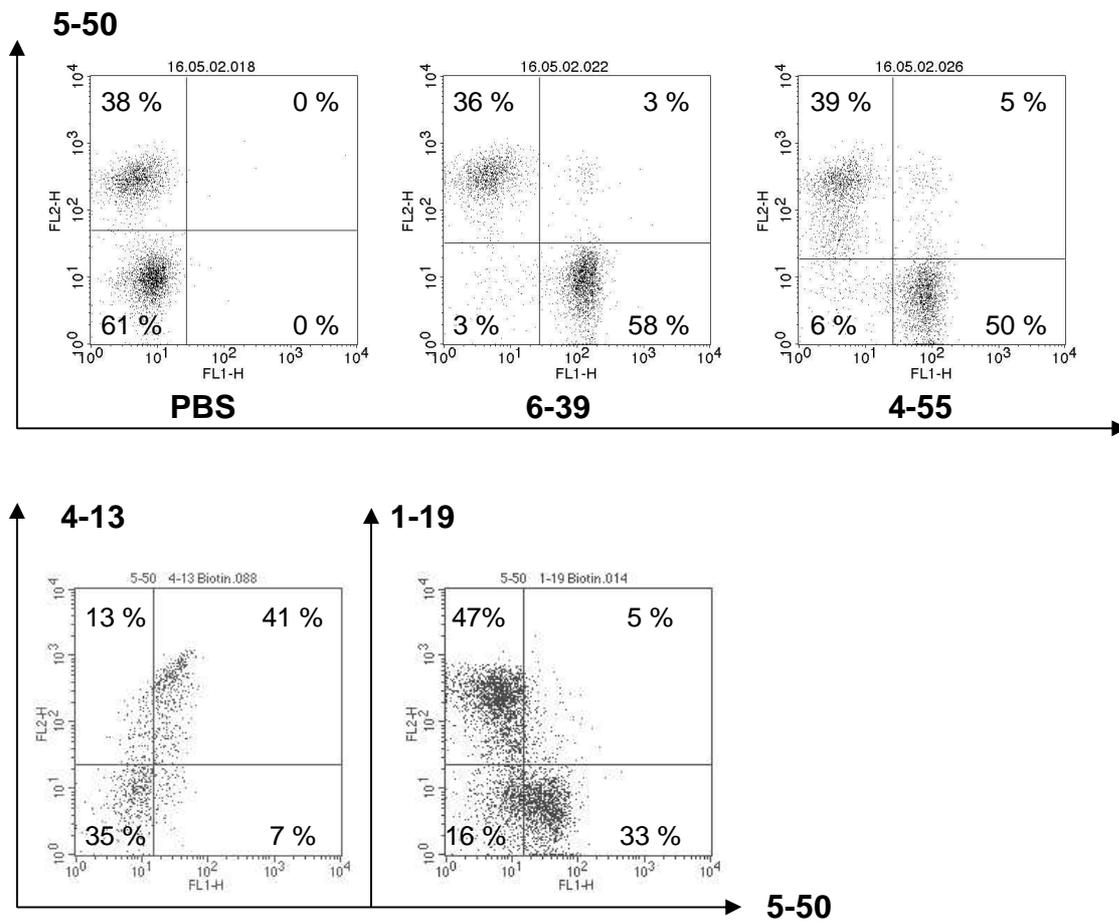


Abbildung 4.9: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 5-50)

4.5 MAk 1-19

Der monoklonale Antikörper 1-19 bindet nach Analysen im FACScan im Mittel an 23% aller Peripheren Blutlymphozyten und 13% der Granulozyten. 32% der Leukozyten im Lymphknoten eines Pferdes werden durchschnittlich angefärbt und 15% der Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten als positiv erkannt. Allerdings bindet er auch an 76% der Intestinalen Epithelzellen. Milzzellen lassen sich zu 21% anfärben. Nur an 1% der Zellen der Zelllinie EqT8888 und an 5% der Zellen eines Equinen Lymphoms ließ sich eine Bindung nachweisen. MAk 1-19 gehört zur Immunglobulinsubklasse IgG1 (vgl. Tabelle A.3).

Nach Stimulation von Peripheren Blutlymphozyten mit Concanavalin A sank der Anteil der durchflusszytometrisch anfärbbaren Lymphozyten innerhalb von 3 Tagen von 31% auf 6% (vgl. Tabelle 4.3).

Um die Genauigkeit der Ergebnisse zu verbessern, wurde der Antikörper mit Hilfe einer G-Sepharose-Säule gereinigt, auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und biotinyliert. Die besten Ergebnisse im FACScan lassen sich jeweils bei einer Verdünnung von 1:500 erzielen.

Mit Hilfe des biotinylierten monoklonalen Antikörpers gelang eine Reihe von Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalysen. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse einer Doppelfärbung mit Peripheren Blutlymphozyten:

Demnach waren 57% der Zellen durch den Antikörper anfärbbar. Bei der Gegenfärbung mit einem Anti-Ig-Pferd-FITC-Antikörper waren 46% der Lymphozyten für beide Antikörper positiv, weitere 14% lediglich für den gegen das equine Immunglobulin gerichteten Antikörper. 1% der Zellen wurden ausschließlich durch mAk 1-19 und 39% durch keinen der beiden Antikörper gebunden.

Der Vergleich mit einem Anti-CD4-Antikörper ergab, dass nur 1% der Lymphozyten mit beiden Antikörpern reagierten, während drei gut abgesetzte Populationen von mAk 1-19-positiven Zellen (41%), CD4-positiven Zellen (23%) und nicht angefärbten Zellen (35%) erkennbar waren.

Die Doppelfärbung mit den monoklonalen Antikörpern 4-13 und 5-50 lieferten ähnliche Ergebnisse: Es reagierten jeweils nur 4% bzw. 5% der Lymphozyten mit beiden Antikörpern und 14% bzw. 16% der Zellen mit keinem Antikörper. Ausschließlich von mAk 1-19 ließen

sich 62% bzw. 47% der Lymphozyten anfärben, während mit dem jeweils anderen Antikörper 21% bzw. 33% positiv reagierten.

Messungen mit den monoklonalen Antikörpern 4-36 und 6-39 ergaben ebenfalls ähnliche Ergebnisse. Knapp die Hälfte der Zellen war durch beide Antikörper anfärbbar (47% bzw. 49%). Die meisten übrigen Zellen (46% bzw. 39%) waren für alle verwendeten Antikörper negativ. 5% der Zellen waren nur für mAk 4-36, 11% der Zellen nur für mAk 6-39 positiv. 3% bzw. 1% der Lymphozyten wurden ausschließlich durch mAk 1-19 angefärbt.

Mit dem monoklonalen Antikörper 6-5 reagierten 98% aller Zellen. In der Doppelfärbung waren 47% außerdem für mAk 1-19 positiv. Die doppelt positiven Zellen hatten eine geringere Fluoreszenz im Kanal FL1 als die einfach positiven Zellen.

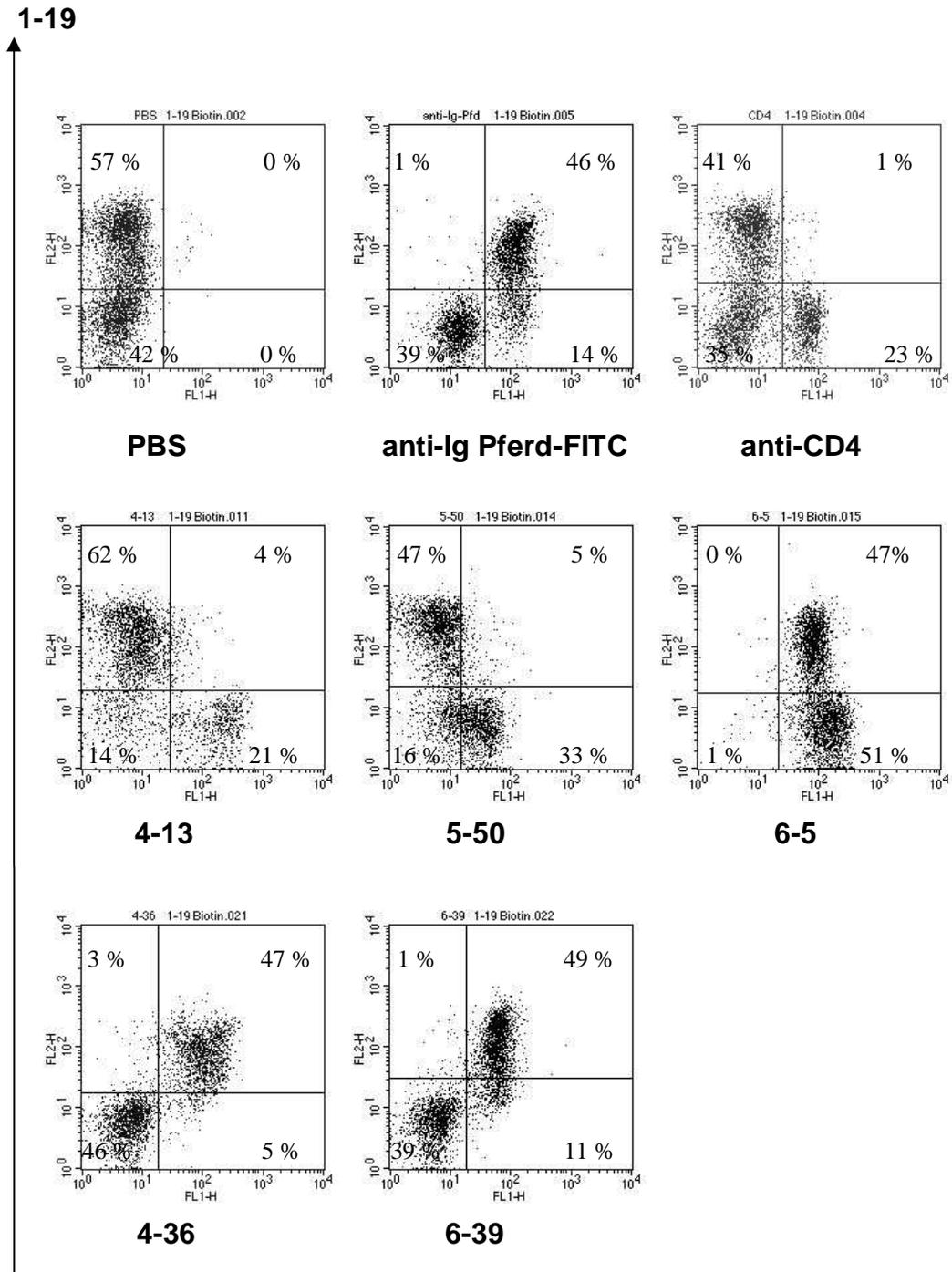


Abbildung 4.10: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 1-19)

4.6 MAk 6-39

MAk 6-39 gehört zur Immunglobulinsubklasse IgG2a. Der Antikörper bindet bei zytometrischen Analysen im FACScan durchschnittlich an 28% aller Peripheren Blutlymphozyten und 5% der Granulozyten. Im Mittel werden 26% der Leukozyten im Lymphknoten eines Pferdes angefärbt und 10% der Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten als positiv erkannt. Der Antikörper zeigt bei 86% der Intestinalen Epithelzellen ein positives Ergebnis. Zellen der Zelllinie EqT8888 werden nicht gebunden und nur an 3% der Zellen eines Equinen Lymphoms ließ sich eine Bindung nachweisen (vgl. Tabelle A.3).

Nach Stimulation von Peripheren Blutlymphozyten mit Concanavalin A sank der Anteil der durchflussytometrisch anfärbbaren Lymphozyten innerhalb von drei Tagen von 30% auf 5% (vgl. Tabelle 4.3).

Um die Genauigkeit der Untersuchungen zu verbessern, wurde der Antikörper mit Hilfe einer G-Sepharose-Säule gereinigt, auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und biotinyliert. Für die Immunfluoreszenzanalyse eignen sich Verdünnungen von 1:50 mit dem gereinigten Antikörper bzw. von 1:100 mit dem biotinylierten Antikörper besonders gut.

Mit Hilfe des biotinylierten monoklonalen Antikörpers wurde eine Reihe von Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Abbildung 4.11 zeigt die Ergebnisse einer Doppelfärbung mit Peripheren Blutlymphozyten:

44% der Zellen waren durch den Antikörper anfärbbar. Bei der Gegenfärbung mit einem Anti-Ig-Pferd-FITC-Antikörper waren 42% der Lymphozyten für beide Antikörper positiv, weitere 9% ausschließlich für den Kontrollantikörper. 2% der Zellen wurden ausschließlich durch mAk 6-39 und 48% durch keinen der beiden Antikörper gebunden.

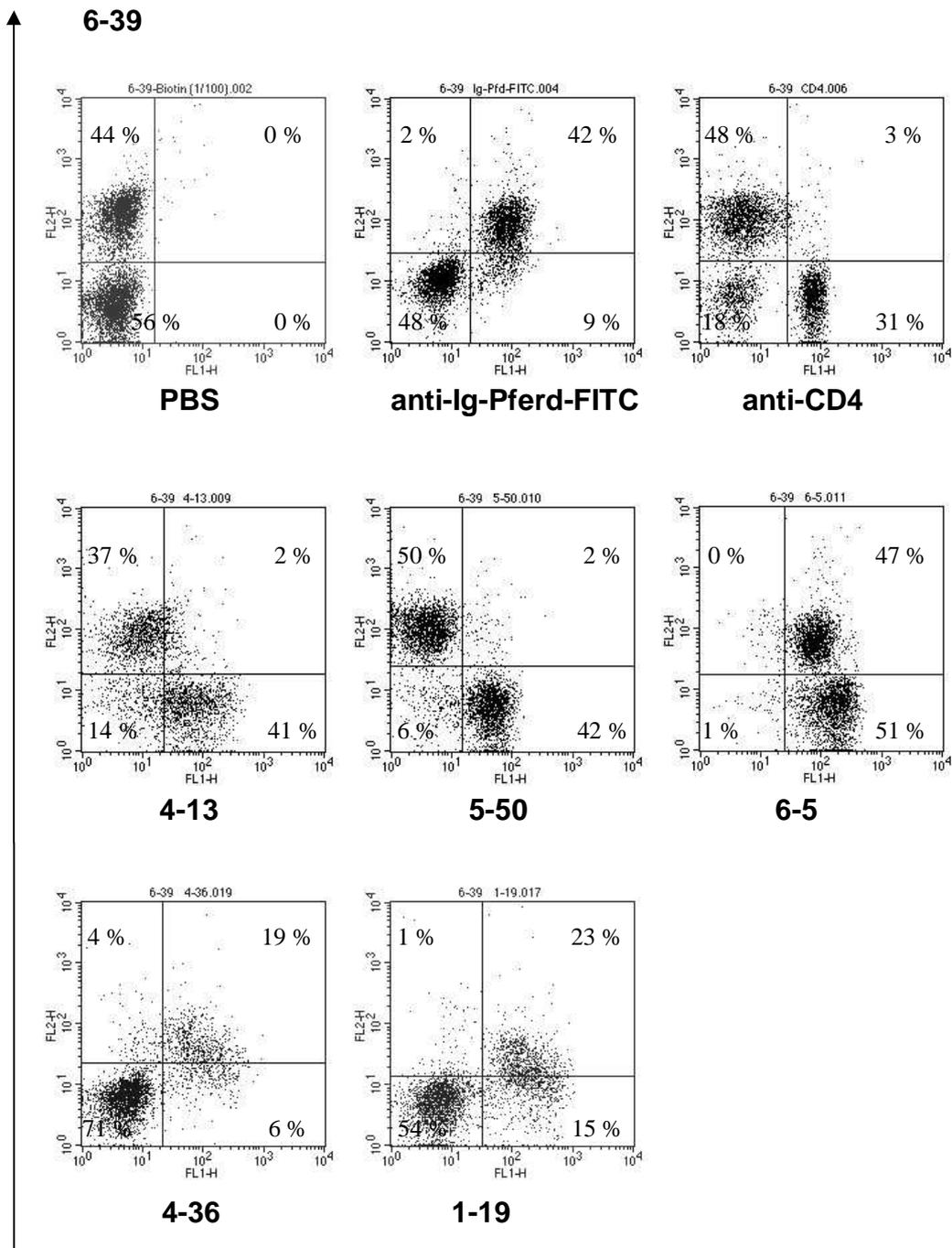


Abbildung 4.11: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 6-39)

Beim Vergleich mit einem Anti-CD4-Antikörper reagierten 3% der Lymphozyten mit beiden Antikörpern, während 31% der Lymphozyten nur CD4-positiv waren, 48% sich ausschließlich von mAk 6-39 anfärben ließen und eine Population von 18% für beide Antikörper negativ blieb.

Die Doppelfärbungen mit den monoklonalen Antikörpern 4-13 und 5-50 lieferten ähnliche Ergebnisse: Jeweils reagierten nur 2% der Lymphozyten mit beiden Antikörpern und 14% bzw. 6% der Zellen mit keinem Antikörper. Ausschließlich von mAk 6-39 ließen sich 62% bzw. 47% der Lymphozyten anfärben, während mit dem jeweils anderen Antikörper 37% bzw. 50% positiv reagierten.

Wiederum ähnliche Ergebnisse ergab der Vergleich mit den monoklonalen Antikörpern 4-36 und 1-19. 19% bzw. 23% waren durch beide Antikörper anfärbbar. Zusätzlich waren 6% bzw. 15 % für mAk 4-36 bzw. mAk 1-19 alleine positiv. Die meisten übrigen Zellen (71% bzw. 54%) waren für alle verwendeten Antikörper negativ. 4% bzw. 1% der Lymphozyten wurden ausschließlich durch mAk 6-39 angefärbt.

Mit dem monoklonalen Antikörper 6-5 reagierten 98% aller Zellen. In der Doppelfärbung waren 47% außerdem für mAk 6-39 positiv. Die doppelt positiven Zellen zeigten im Kanal FL1 durchwegs eine geringere Fluoreszenz als die Lymphozyten, die nur von mAk 6-5 markiert worden waren.

4.7 MAk 2-52

Der monoklonale Antikörper 2-52 färbt bei Untersuchungen im FACScan durchschnittlich 23% aller Peripheren Blutlymphozyten und 6% der Granulozyten. Im Mittel bindet der Antikörper an 12% der Leukozyten im Lymphknoten, an 6% der Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten und an 26% der Milzzellen. Intestinale Epithelzellen werden ebenso wenig angefärbt, wie Zellen der Zelllinie EqT8888. An 5% der Zellen eines Equinen Lymphoms ließ sich eine Bindung nachweisen. MAk 2-52 gehört zur Immunglobulinsubklasse IgG2b (vgl. Tabelle A.3).

Nach Stimulation von Peripheren Blutlymphozyten mit Concanavalin A sank der Anteil der im Durchflusszytometer positiven Lymphozyten von 32% auf 5% (vgl. Tabelle 4.3).

Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalysen konnten mit Hilfe von FITC-markierten und biotinylierten Antikörpern, sowie Antikörpern anderer Immunglobulinsubklassen durchgeführt werden. Es stellte sich heraus, dass mit diesem Antikörper kaum gut abgesetzte Populationen dargestellt werden konnten.

Abbildung 4.12 zeigt die Ergebnisse einer Doppelfärbung mit dem biotinylierten Antikörper mAk 4-13 und mAk 4-55 mit PBL.

Die Doppelfärbung mit mAk 4-13 ergab drei große Populationen von 34% (mAk 4-13 positiv), 49% (mAk 2-52-positiv) und 15% (doppelt negativ) und nur 2% Lymphozyten, die mit beiden Antikörpern eine Bindung eingingen.

Bei der Verwendung von mAk 4-55 als zweiten Antikörper, ließen sich die Zellen weitgehend in doppelt positive (43%) und doppelt negative Zellen (45%) aufteilen.

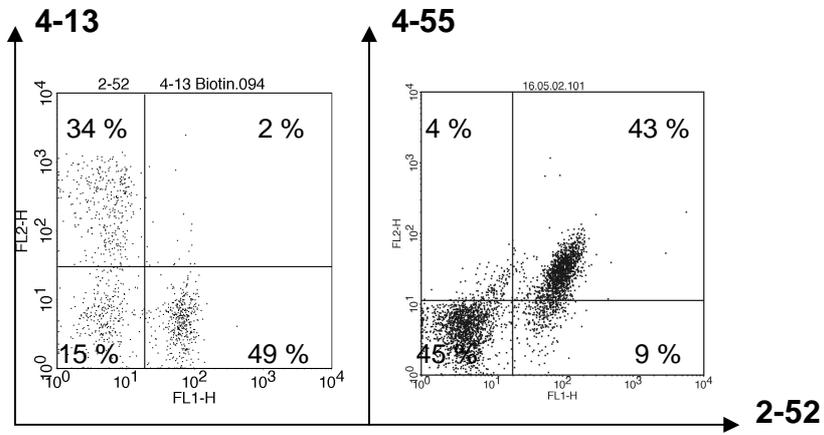


Abbildung 4.12: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 2-52)

4.8 MAk 4-36

Mit dem monoklonalen Antikörper 4-36, der zur Immunglobulinsubklasse IgG1 gehört, können durchflusszytometrisch durchschnittlich 25% aller Peripheren Blutlymphozyten und 16% der Granulozyten markiert werden. Im Mittel bindet der Antikörper an 23% der Leukozyten im Lymphknoten, sowie an 13% der Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten. Auf 24% der intestinalen Epithelzellen werden Epitope erkannt. Für Zellen der Zelllinie EqT8888 und Zellen eines Equinen Lymphoms war mAk 4-36 negativ (vgl. Tabelle A3).

Nach Stimulation von Peripheren Blutlymphozyten mit Concanavalin A war die Tendenz der im Durchflusszytometer positiven Lymphozyten sinkend (innerhalb von drei Tagen von 31% auf 6%, vgl. Tabelle 4.3).

Bei Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalysen lieferten die biotinylierten Antikörper mAk 1-19, mAk 4-13 und mAk 6-39 mit Peripheren Blutlymphozyten eindeutige Ergebnisse (vgl. Abbildung 4.13).

Bei der Doppelfärbung mit mAk 1-19 wurden die Zellen weitgehend in eine für beide Antikörper negative Population mit 46% und eine doppelt positive Population mit 47% unterteilt. Nur einzelne Zellen wurden nur durch einen einzigen Antikörper markiert (3% bzw. 5%).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Gegenfärbung mit mAk 6-39: Doppelt positiv waren 19% der Lymphozyten. Weitere 4% befanden sich im linken oberen Quadranten, in dem die ausschließlich mAk 6-39-positiven Zellen zu sehen sind. 6% der Zellen wurden nur durch mAk 4-36 markiert. 71% der Zellen ließen sich gar nicht anfärben.

Wurde mAk 4-13 als zweiter Antikörper verwendet, so waren drei Populationen zu erkennen: 29% der Zellen erkannte der Antikörper 4-36, 47% der Zellen wurden durch mAk 4-13 markiert und 23% waren für beide Antikörper negativ. Nur 1% der Zellen befanden sich im rechten oberen Quadranten für doppelt positive Zellen.

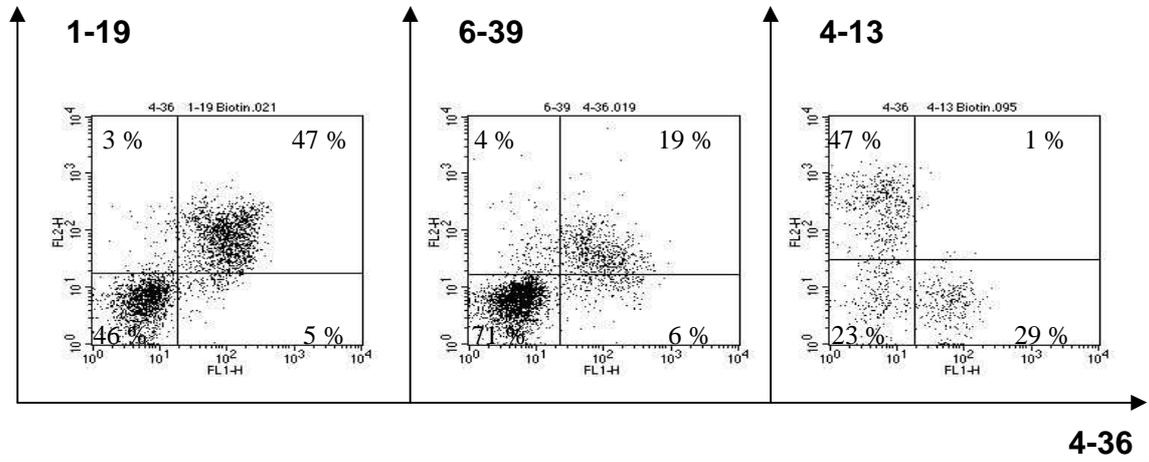


Abbildung 4.13 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 4-36)

4.9 MAk 4-55

An 15% der Peripheren Blutlymphozyten und 3% der Granulozyten bindet der monoklonale Antikörper 4-55 (Immunglobulinsubklasse IgG2a) durchschnittlich in durchflusszytometrischen Untersuchungen. Lymphknotenlymphozyten werden im Mittel zu 14% erkannt und unter den Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten sind durchschnittlich 6% positiv. Zellen der Zelllinie EqT8888 und Epithelzellen im Darm können nicht angefärbt werden. Bei der Untersuchung eines Equinen Lymphoms war der Antikörper bei 4% der Zellen positiv (vgl. Tabelle A.3).

In einer Zellpopulation von Peripheren Blutlymphozyten wurden vor der Stimulation mit Concanavalin A mit Hilfe der Durchflusszytometrie ein mAk 4-55-positiver Anteil von 29%, nach dreitägiger Stimulation ein Anteil von 5% ermittelt (vgl. Tabelle 4.3).

Untersuchungen mit Hilfe der Zwei-Farbdurchflusszytometrie mit Peripheren Blutlymphozyten führen zu folgenden Ergebnissen (vgl. Abbildung 4.14):

Bei Doppelfärbungen mit mAk 4-55 waren sehr schön abgesetzte Populationen zu sehen.

Der Vergleich mit einem Anti-CD4-Antikörper zeigte, dass CD4-positive Zellen, hier 35%, nicht auch gleichzeitig von mAk 4-55 markiert wurden (1% im oberen rechten Quadranten). 39% der Lymphozyten trugen ein Antigen, das von diesem Antikörper erkannt wurde, während 25% für beide Antikörper negativ waren.

Ähnliche Ergebnisse erbrachten Doppelfärbungen mit den monoklonalen Antikörpern 4-13 und 5-50: 51% der Zellen konnten lediglich von mAk 4-13 markiert werden, 1% war zweifach positiv und 40% zeigten ein positives Ergebnis für mAk 4-55. Eine kleine Population von 8% ließ sich mit keinem der beiden Antikörper anfärben.

Von mAk 5-50 wurden 39% der Zellen gebunden, von mAk 4-55 50% der Zellen. Zusätzlich waren 6% der Lymphozyten für beide Antikörper positiv. Weitere 5% reagierten mit keinem Antikörper.

Wurde mAk 6-39 als zweiter Antikörper eingesetzt, so waren die Lymphozyten weitgehend in zwei Populationen eingeteilt: 50% waren für beide Antikörper negativ und mindestens 41% waren für beide positiv, wobei weitere 10% nicht klar abgegrenzt im linken oberen Quadranten der ausschließlich mAk 6-39-positiven Zellen lagen.

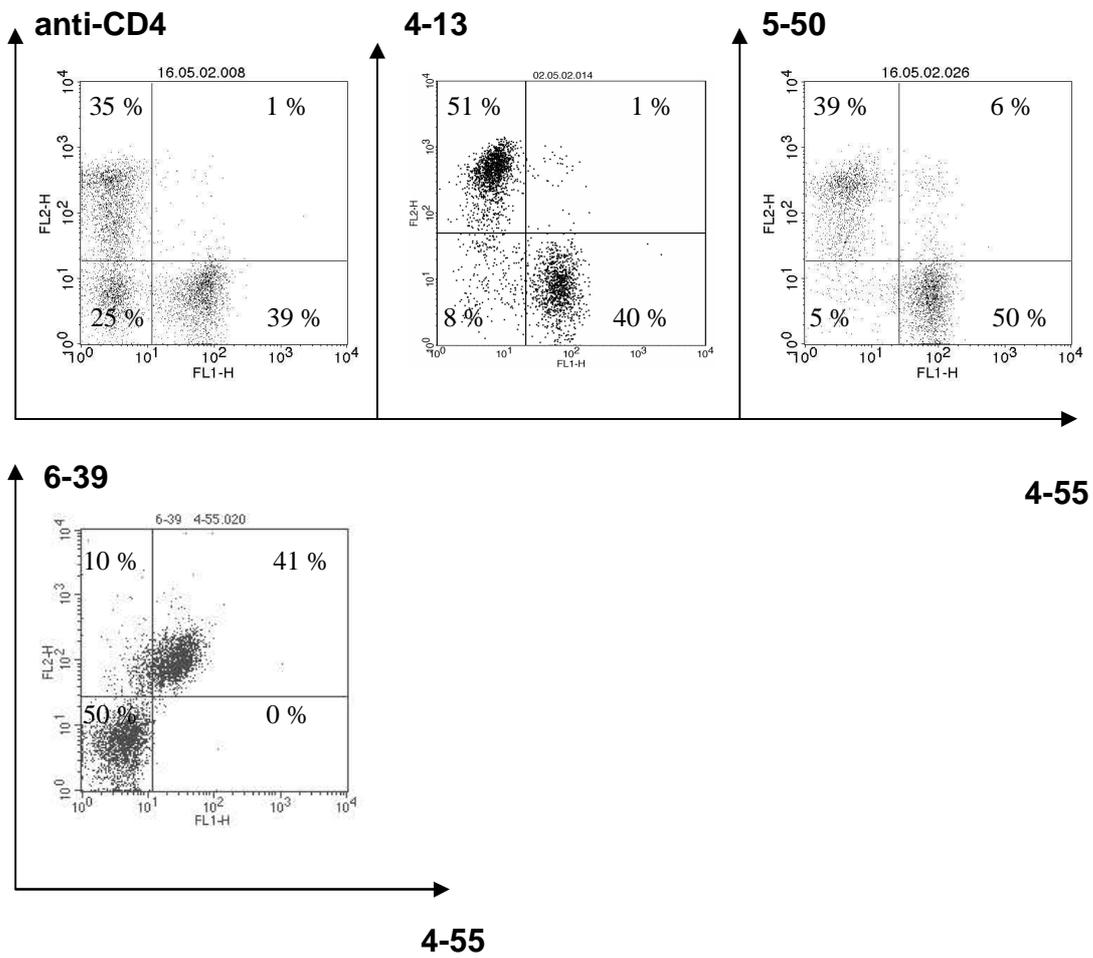


Abbildung 4.14: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von PBL (mAk 4-55)

4.10 MAk 6-5 und mAk 6-17

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse wurde ermittelt, dass mAk 6-5 im Mittel an 76% der Peripheren Blutlymphozyten und 62% der Granulozyten bindet, Lymphknotenlymphozyten im Mittel zu 74% positiv sind und Intestinale Intraepitheliale Leukozyten durchschnittlich zu 81% erkannt werden. Zellen der Zelllinie EqT8888 und Epithelzellen im Darm können nicht bzw. nur zu 4% angefärbt werden. Bei der Untersuchung eines Equinen Lymphoms reagierten alle Zellen mit dem Antikörper. Die Immunglobulinsubklasse des Antikörpers ist IgG1 (vgl. Tabelle A.3).

Für den monoklonalen Antikörper 6-17, der der Immunglobulinsubklasse IgG2a angehört, wurden vergleichbare Werte ermittelt. Periphere Blutlymphozyten werden durchschnittlich zu 89%, die Granulozyten zu 78% erkannt, Lymphozyten aus Lymphknoten zu 98% und Intraepitheliale Dünndarmleukozyten zu 94% angefärbt. An die Zellen eines Lymphknotentumors erfolgte die Bindung des Antikörpers zu 100%. Die Zelllinie EqT8888 war für mAk 6-17 gänzlich negativ, während 4% der untersuchten Darmepithelzellen positiv waren (vgl. Tabelle A.3).

Bei beiden Antikörpern blieb die Stimulation von Peripheren Blutlymphozyten mit Concanavalin A ohne Einfluss auf den Anteil der im Durchflusszytometer positiven Zellen. Sie war konstant bei 100% (vgl. Tabelle 4.3).

In Proliferationsassays wurde für mAk 6-5 ein durchschnittlicher Stimulationsindex von 2,4 gemessen, der von mAk 6-17 liegt bei 3,3 (vgl. Tabelle 4.4).

Die Zwei-Farben-Durchflusszytometrie mit dem biotinylierten monoklonalen Antikörper 1-19 zeigt folgende Ergebnisse (vgl. Abbildung 4.15):

Die beiden monoklonalen Antikörper binden 96% (mAk 6-5) bzw. 97% (mAk 6-17) aller Leukozyten im Lymphknoten. Zellen, die zusätzlich vom Antikörper 1-19 markiert werden, zeigen einen niedrigeren Fluoreszenzwert im Kanal 1 (FL1), als die meisten einfach positiven Zellen.

Die Verhältnisse bei Leukozyten aus der peripheren Blutbahn sind vergleichbar: Die beiden Antikörper binden 98% (mAk 6-5) und 99% (mAk 6-17) der Zellen. Unterschiede kommen

4 Ergebnisse

nur durch die stärkere Fluoreszenz des zweiten Antikörpers (mAk 1-19) bei einem niedrigeren Anteil des selben an der Gesamtpopulation zustande.

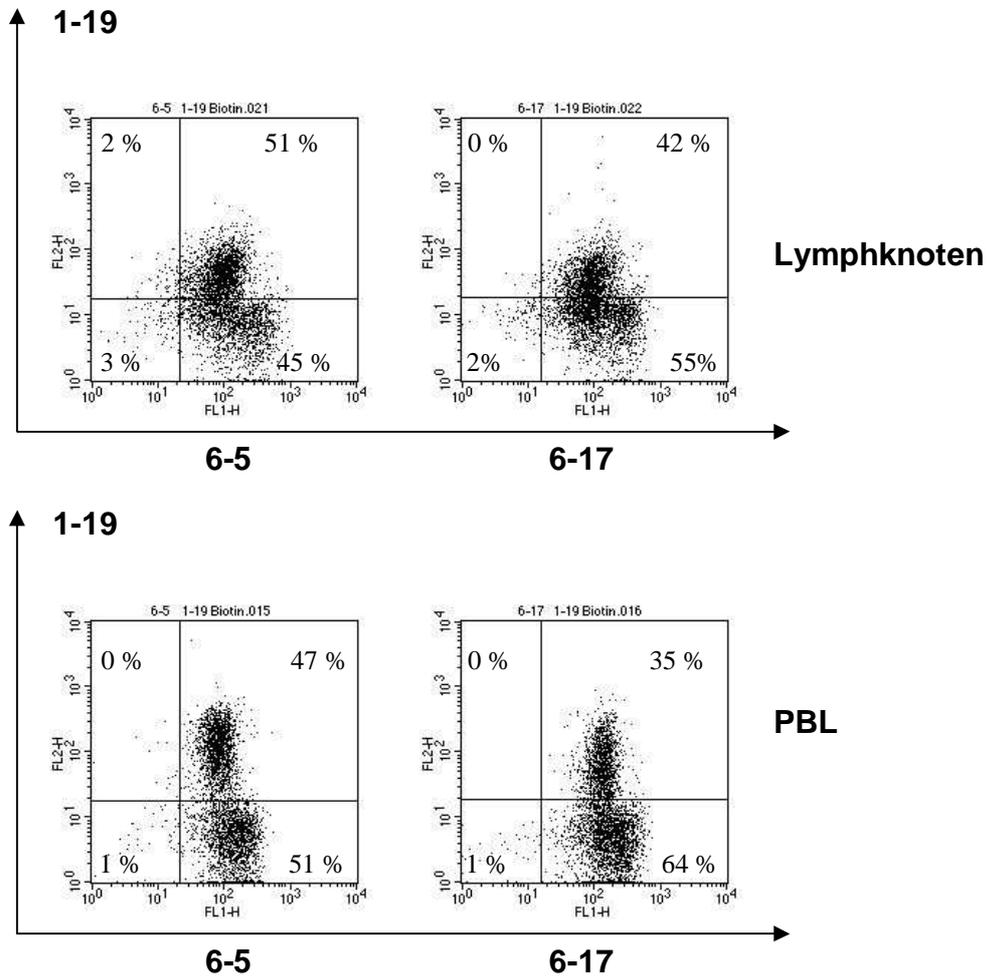


Abbildung 4.15: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von Lymphknotenlymphozyten und PBL. Vergleich von mAk 6-5 und mAk 6-17 mit mAk 1-19.

Bei den durchflusszytometrischen Analysen fielen einige wenige Pferde auf, bei denen mAk 6-17 deutlich weniger Zellen markierte, als bei den meisten anderen Pferden. Der Prozentsatz der mAk 6-17-positiven Zellen entsprach ungefähr dem Prozentsatz an B-Zellen.

Von einem dieser Pferde (Pferd B) wurde wiederholt Blut genommen und eine Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 4.16 zu sehen sind:

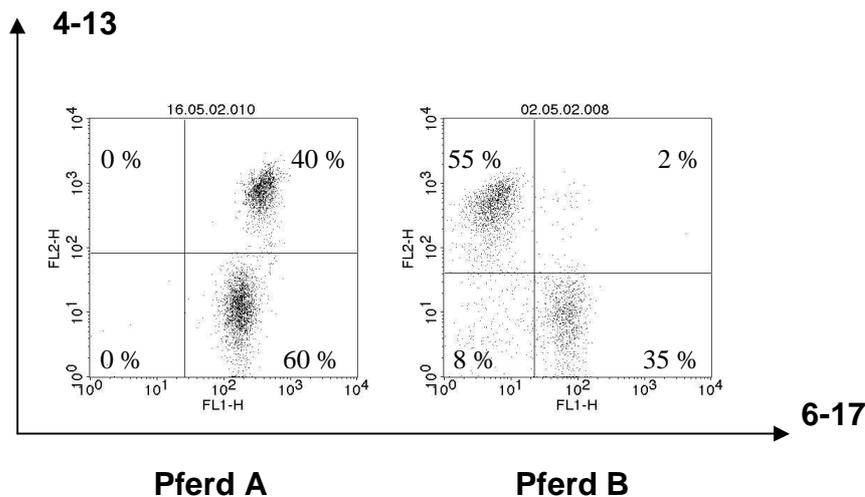


Abbildung 4.16: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von mAk 6-17 und mAk 4-13
Die PBL-Proben stammen von zwei verschiedenen Pferden.

Während bei den meisten Pferden (Pferd A) nahezu alle Zellen durch mAk 6-17 gebunden werden und die Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper 4-13 eine eindeutig abgesetzte, doppelt positive Population (hier: 40%) ergibt, waren bei Pferd B insgesamt nur 35% aller Lymphozyten durch mAk 6-17 anfärbbar und nur 2% für beide Antikörper gleichzeitig positiv. Weitere 55% der Zellen waren ausschließlich von mAk 4-13 gebunden worden. 8% der Zellen ließen sich gar nicht markieren.

4.11 MAk 4-39

Der monoklonale Antikörper 4-39 gehört der Immunglobulinsubklasse IgG1 an. In durchflusszytometrischen Untersuchungen bindet er durchschnittlich an 19% der Peripheren Blutlymphozyten und 74% der Granulozyten. Lymphknotenlymphozyten werden im Mittel zu 31% erkannt und unter den Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten sind durchschnittlich 34% positiv. Zellen der Zelllinie EqT8888 können zu 6% angefärbt werden. Bei der Untersuchung eines Equinen Lymphoms war der Antikörper bei 51% der Zellen positiv (vgl. Tabelle A.3).

In einer Zellpopulation von Peripheren Blutlymphozyten wurden vor der Stimulation mit Concanavalin A mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse ein mAk 4-39-positiver Anteil von 20%, nach drei Tagen Stimulation ein Anteil von 10% ermittelt (vgl. Tabelle 4.3).

Untersuchungen mit Hilfe der Zwei-Farben-Durchflusszytometrie mit Peripheren Blutlymphozyten führten zu folgenden Ergebnissen (vgl. Abbildung 4.18):

Beim Vergleich mit mAk 4-13 war zu erkennen, dass nur ein Prozentsatz von 14 % der Zellen Epitope für beide Antikörper besaß. Dagegen existierten zwei große Populationen von 43% (mAk 4-13) bzw. 49% (mAk 4-39), an die nur einer der beiden Antikörper gebunden hatte. 12% der Zellen wurden von keinem der beiden Antikörper erkannt.

Die Doppelfärbung mit mAk 1-19 zeigte das umgekehrte Bild: Hier war eine Mehrheit von 43% der Leukozyten doppelt positiv. 2% der Zellen ließen sich ausschließlich von mAk 1-19 anfärben, während 19% nur von mAk 4-39 erkannt wurden. 36 % der Lymphozyten waren keinem der beiden Antikörper zuzuordnen.

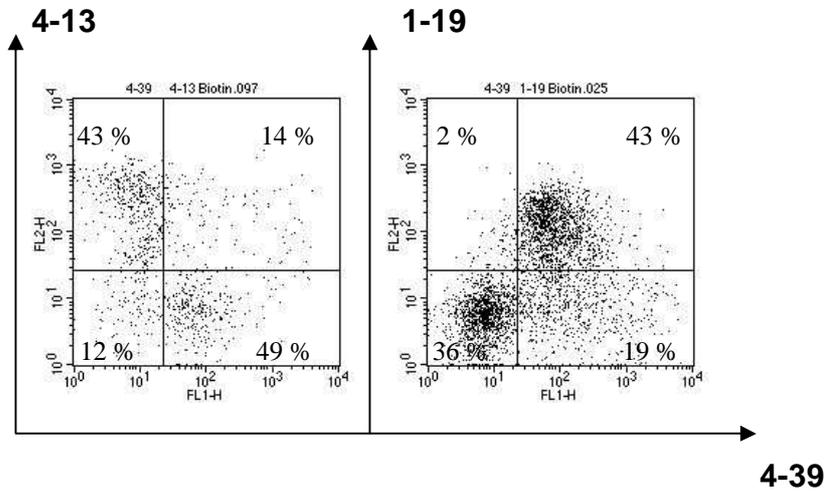


Abbildung 4.17: 2-Farben-Immunfluoreszenzanalyse mit PBL (mAk 6-39)

Als ein vorläufiges Ergebnis ist die Verwendung des Antikörpers in der Immunhistologie zu betrachten. Für die Färbung von tiefgekühlten Lymphknotenschnitten wurde der Überstand des mAk 4-39-Klons 1:10 mit PBS verdünnt. Es zeigte sich, dass einzelne Lymphozyten, sowie Endothelzellen der Blutgefäße im Lymphknoten stark angefärbt werden konnten.

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Im Folgenden soll versucht werden, die neu hergestellten Antikörper auf Grund der beschriebenen Ergebnisse bestimmten Leukozytensubpopulationen zuzuordnen. Für die Immunisierung wurden Periphere Blutleukozyten, Leukozyten aus Lymphknoten und Intestinale Intraepitheliale Leukozyten verwendet. Einerseits sollten dadurch mit einer Immunisierung monoklonale Antikörper gegen viele verschiedene Strukturen auf der Leukozytenoberfläche produziert werden. Andererseits entstand gerade dadurch die Gefahr, dass keine initiale Zuordnung der Antikörper zu einem bestimmten Antigen möglich ist. Sie kann nur durch eine intensive Charakterisierung der monoklonalen Antikörper in einer Vielzahl von Versuchen erreicht werden. Erschwerend kommt hinzu, dass nur wenige Leukozytenantigene beim Pferd bekannt sind, so dass die Antikörper durchaus gegen noch unbekannte Antigene gerichtet sein können. In diesem Fall ist der Vergleich mit den Verhältnissen bei anderen Tierarten, insbesondere beim Menschen und der Maus, erforderlichlich.

Aber selbst die Zuordnung bekannter Antigene ist problematisch: Übereinstimmungen bei den Bindungsmustern in der Immunfluoreszenzanalyse, Funktionstests, wie die Untersuchung des Einflusses auf die Proliferation von Zellen in der Zellkultur, ebenso wie die Immunhistologie und vor allem die Analyse der Molekulargewichte in der Immunpräzipitation können gute Hinweise auf das gesuchte Antigen geben. Jedoch eignen sich viele Antikörper nur für bestimmte Analysemethoden, so dass es oft nicht möglich ist, sich ein vollständiges Bild über die Eigenschaften des Antikörpers bzw. des zugehörigen Antigens zu verschaffen.

Der endgültige Beweis, dass ein monoklonaler Antikörper ein bestimmtes Antigen erkennt, wird heute ausschließlich über Transfektionsexperimente geführt. Dabei wird das Gen, das die in Frage kommende Oberflächenstruktur kodiert, in Zellen transfiziert. Diese werden dann mit dem monoklonalen Antikörper gefärbt. Hier besteht das Problem, dass beim Pferd bisher nur wenige Gene, die Leukozytenantigene kodieren, kloniert wurden.

Ein Ausweg könnte die Etablierung von EST-Datenbanken (expressed sequence tag) für das Pferd bieten, in denen gewebespezifische Sequenzen erfasst werden.

Momentan ist der Aufwand, um eine endgültige Aufklärung des gebundenen Antigens zu erreichen noch außerordentlich groß und nicht immer von Erfolg gekrönt.

5.2 MAk 4-13

Der monoklonale Antikörper 4-13 konnte, vor allem nach Aufreinigung und Biotinylierung, umfassend charakterisiert werden. Eine Vielzahl von Immunfluoreszenzanalysen sprechen dafür, dass er spezifisch T-Lymphozyten markiert.

Der Mittelwert der jeweils mAk 4-13-positiven Zellen entspricht in etwa der Summe der Mittelwerte von CD4-positiven und CD8-positiven Leukozyten bei Untersuchungen von Peripheren Blutleukozyten (PBL), Lymphknoten-Leukozyten (Lkn) und Intestinalen Intraepithelialen Leukozyten (IEL), was Tabelle 5.1 verdeutlicht. Wie in Kapitel 2 beschrieben ist, lassen sich T-Lymphozyten in CD8-positive und CD4-positive Zellen aufteilen. Außerdem entspricht die durchschnittlich gemessene Prozentzahl von Zellen, die im peripheren Blut durch mAk 4-13 markiert werden, in etwa dem Wert, der während des ELAW II [66] für T-Lymphozyten, beispielsweise durch Antikörper gegen EqCD3 ermittelt wurde (vgl. Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Vergleich der Mittelwerte an positiven Zellen bei durchflusszytometrischen Untersuchungen in Prozent

	PBL	Lkn	IEL
CD4+CD8	65	45	50
mAk 4-13	73	50	57
mAk 4-58	78	49	53
EqCD3	75	-	-

Bei Doppelfärbungen mit dem Anti-Ig-Pferd-Antikörper, der als B-Zellmarker eingesetzt wurde, konnten nie mehr als 5% doppelt positive Zellen gefunden werden (vgl. Abbildungen 4.3 bis 4.6). CD4-positive Zellen konnten fast immer als Subpopulation der mAk 4-13-positiven Zellen dargestellt werden (vgl. Abbildungen 4.3 und 4.5). Lediglich im peripheren Blut war eindeutig eine Gruppe von Zellen zu erkennen, die zwar mit dem Anti-CD4-Antikörper reagierte, nicht aber mit mAk 4-13 (vgl. Abbildung 4.4).

Vergleicht man die hier erhaltenen Ergebnisse in der Durchflusszytometrie, mit denen des ELAW II [66] (vgl. Tabelle A.1), so fallen Analogien zu Antikörpern gegen EqCD2, EqCD3 und EqCD5 auf.

Ein Blick auf Anzahl und Gewicht der durch die Immunpräzipitation ermittelten Moleküle (reduziert: 100, 69, 35 kDa; nicht reduziert: 35, 100, 200 kDa; vgl. Abbildung 4.2), lässt aber vermuten, dass mAk 4-13 eher an ein bisher unbekanntes, T-Zell-spezifisches Epitop bindet, da die Molekulargewichte der oben genannten Antigene 69 kDa nicht überschreiten (vgl. Tabelle A.1).

5.3 MAk 4-58

Legt man die Ergebnisse der Ein-Farben-Immunfluoreszenzanalyse zu Grunde, so kann man bereits vermuten, dass mAk 4-58 ebenfalls spezifisch an T-Zellen bindet: In allen untersuchten Geweben stimmt der Prozentsatz an, durch diesen Antikörper gebundenen Zellen mit dem erwarteten Wert an T-Lymphozyten überein (vgl. Tabelle 5.1).

Auch die Zwei-Farben-Durchflusszytometrie bestätigt dies: In Abbildung 4.8 ist zu sehen, dass in der Doppelfärbung mit dem Anti-Ig-Pferd-FITC-Antikörper die Lymphozyten im Wesentlichen in zwei Populationen geteilt werden. Dabei sind praktisch alle CD4-positiven Zellen auch durch mAk 4-58 markiert. Die Untersuchungen zeigen aber auch, dass mAk 4-58 an ein anderes Epitop bindet, als mAk 4-13: Häufig lässt sich eindeutig eine kleine Zellpopulation abgrenzen, die nur durch einen der beiden Antikörper markiert werden kann. In Abbildung 4.8 (Lkn) sind immerhin 8% und in Abbildung 4.5 (IEL) 19% aller Zellen ausschließlich für mAk 4-13 positiv. Gelegentlich existieren aber auch Leukozyten, die zwar durch mAk 4-58 gebunden werden, aber nicht für mAk 4-13 positiv sind (Abbildung 4.4).

Außerordentlich interessant ist die Fähigkeit des Antikörpers, Leukozyten zur Proliferation anzuregen. Häufig übertraf die Stimulation durch mAk 4-58 die Stimulation, die durch bekannte Mitogene wie Concanavalin A hervorgerufen wurde um ein Vielfaches (vgl. Abbildung 4.6). Im Gegensatz zu Leukozyten, die mit SEB stimuliert worden waren und bei denen sich mRNA von Interleukin-2, Interleukin-4, Interferon gamma und Tumor-Nekrose-Faktor alpha nachweisen ließ, regt die Stimulation mit mAk 4-58 die Zellen zur Produktion der mRNA von Interleukin-4 und Interferon gamma an (vgl. Abbildung 4.7).

Aus der Literatur [61][48][68] sind Antikörper gegen EqCD5 bekannt, die ebenfalls proliferativ auf Leukozyten wirken. Da EqCD5 jedoch 69 kDa schwer ist (vgl. Tabelle A.1) und die Immunpräzipitation des monoklonalen Antikörpers 4-58 mehrere unterschiedlich schwere Moleküle, mit einem Gewicht von bis zu 100 kDa zeigte, scheint auch dieser Antikörper gegen ein bisher unbekanntes Epitop auf T-Lymphozyten des Pferdes gerichtet zu sein.

5.4 MAk 5-50

Auch mAk 5-50 bindet an ein Epitop auf equinen T-Lymphozyten. In der Zwei-Farben-Immunfluoreszenz ist eine klare Abgrenzung zu Antikörpern zu sehen, die B-Zellen färben (s.u.). Möglicherweise existiert eine kleine Population von 3-5%, die sich von mAk 5-50 und gleichzeitig von B-Zellmarkern anfärben lassen (vgl. Abbildung 4.9).

Da die Prozentsätze der mAk 5-50-positiven Zellen konstant etwa 10 bis 20 Prozentpunkte unter den Werten für T-Lymphozyten liegen (vgl. Tabelle A.3), muss davon ausgegangen werden, dass der Antikörper nur an eine Teilgruppe der T-Zellen bindet. Dabei kommt als Bindungspartner auch das CD4-Molekül in Frage. Da der zur Verfügung stehende Anti-CD4-Antikörper ebenfalls zur Immunglobulinsubklasse IgG1 gehört, und noch nicht genügend Material für eine Aufreinigung und Biotinylierung des mAk 5-50 gesammelt werden konnte, war der Beweis durch eine spezifische Doppelfärbung im FACScan bisher noch nicht möglich. Auch eine Immunpräzipitation des Antikörpers konnte bisher noch nicht erfolgreich durchgeführt werden.

5.5 B-Zell-spezifische Antikörper

Mit Hilfe der durchgeführten Untersuchungen konnten fünf Antikörper herausgefiltert werden, die Strukturen auf B-Lymphozyten erkennen: mAk 1-19, mAk 2-52, mAk 4-36, mAk 4-55 und mAk 6-39.

Sie alle zeigen eine gute Übereinstimmung in der Durchflusszytometrie, sowohl untereinander, als auch mit der Kontrolle, dem Anti-Ig-Pferd-FITC-Antikörper. In Doppelfärbungen mit T-Zell-spezifischen Antikörpern sind kaum doppelt positive Zellen zu erkennen, so dass die Spezifität im peripheren Blut und im Lymphknoten als zufrieden stellend zu beurteilen ist.

Die Antikörper mAk 1-19, mAk 4-36 und mAk 6-39 reagieren allerdings auch mit Antigenen im Darmepithel von Pferden (vgl. Tabelle A.3).

Da bisher noch keine Daten über die Molekulargewichte der gebundenen Strukturen vorliegen und funktionelle Studien bisher kein Ergebnis erbrachten, wird die genaue Identität der Antigene bis auf weiteres ungeklärt bleiben.

5.6 Panleukozytenmarker

Die monoklonalen Antikörper 6-5 und 6-17 binden spezifisch an alle Leukozyten. Da sie jedoch nicht mit EqT8888-Zellen reagieren, kann ausgeschlossen werden, dass sie die bisher bekannten Antigene EqCD44 und EqMHCI markieren, die auf diesen Zellen vorhanden sind [66]. Von anderen Tierarten ist die Existenz eines „Leucocyte common antigens“ (LCA) bekannt, das auch als CD45 bezeichnet wird und auf allen Leukozyten, einschließlich der Dendritischen Zellen, vorkommt. Das CD45-Molekül könnte daher als Bindungspartner dieser Antikörper in Frage kommen.

Interessanterweise bindet mAk 6-17 bei einigen wenigen Pferden nur an B-Lymphozyten (vgl. Abbildung 4.15). Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass das gesuchte Antigen in unterschiedlichen Formen auf B- und T-Zellen vorkommen kann.

Beim Menschen und bei der Maus ist bekannt, dass das CD45-Molekül in unterschiedlichen Isoformen auf B- und T-Lymphozyten existiert [23]. In der Maus gilt die als B220 bezeichnete Isoform als B-Zell-spezifisch [16]. Sollte sich der Bindungspartner der Antikörper tatsächlich als CD45-Molekül herausstellen, könnten die Antikörper einen Beitrag zur Aufklärung der „Leucocyte common Antigenes“ beim Pferd liefern.

Die Antikörper 6-5 und 6-17 eignen sich in der Durchflusszytometrie als Panleukozytenmarker. Außerdem können sie sehr gut als Kontrollen eingesetzt werden, beispielsweise um die Reinheit der Zellpräparation zu überprüfen oder um während der zytometrischen Analyse die Position der Leukozyten besser zu bestimmen.

5.7 Weitere Antikörper

Die monoklonalen Antikörper 4-18 und 4-19 binden an Antigene auf Granulozyten. Sie können ebenfalls als Kontrolle in der Durchflusszytometrie verwendet werden. Erste Versuche weisen darauf hin, dass sie sich auch für die Immunhistologie eignen könnten.

MAk 4-39 konnte zwar nicht eindeutig eine Bindung an B-Zellen oder T-Zellen zugeordnet werden, jedoch zeichnet sich dieser Antikörper durch gute Bindungseigenschaften, auch in der Immunhistologie aus. Als Bindungspartner könnte ein Integrin in Frage kommen, das hauptsächlich auf B-Lymphozyten vorkommt. Sollte sich die in der Immunhistologie beobachtete Bindung an Endothelzellen als richtig erweisen, so wäre auch eine Rolle in der Zelladhäsion, wie bei dem Molekül ICAM 1, denkbar.

Für die übrigen Antikörper konnten die Bindungseigenschaften nicht genauer beschrieben werden. Probleme bereiteten besonders die wenig spezifischen sekundären Antikörper für die Immunglobulinsubklassen IgG2b und IgM, sowie unterschiedliche Ergebnisse bei Doppelfärbungen. Eine Zuordnung als B- oder T-Zell-spezifisch war nicht möglich.

5.8 Ausblick

Die Schwierigkeiten, die es zu überwinden gibt, um eine exakte Zuordnung der monoklonalen Antikörper zu erreichen, wurden in dieser Arbeit ausführlich beschrieben. Nun stellt sich die Frage nach alternativen Möglichkeiten:

Ein Weg könnte darin bestehen, Mäuse gezielt mit bekannten Antigenen zu immunisieren. Dazu würde man eine EST-Datenbank für das Pferd benötigen und müsste die gespeicherten ESTs mit den bekannten Sequenzen bei anderen Tieren vergleichen. Sobald ein EST-Klon einem bestimmten Antigen zugeordnet werden kann, ist es möglich, das Gen in Zellen zu exprimieren und mit diesen direkt zu immunisieren. In diesem Fall ist zu erwarten, dass die spezifische Zuordnung der gewonnenen Antikörper wesentlich gezielter und erfolgreicher verläuft. Da das Antigen von Anfang an vorgegeben ist, müssen die Immunfluoreszenzdaten nur durch Transfektionsexperimente bestätigt und Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden. Momentan gibt es nur wenige Daten zu ESTs beim Pferd. Jedoch werden auf diesem Gebiet große Fortschritte erzielt, wodurch es bald möglich sein sollte, dieses Verfahren anzuwenden.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Antikörper zur Charakterisierung von Leukozytenpopulationen des Pferdes herzustellen. Zur Immunisierung wurden Leukozyten aus der peripheren Blutbahn, aus Lymphknoten und aus dem intestinalen Epithel von Pferden verwendet. Aus sechs Zellfusionen konnten 78 Klone gewonnen werden. Die wichtigste Methode zur Charakterisierung der mAk war die Immunfluoreszenzanalyse. Die monoklonalen Antikörper der Klone 4-13, 4-58, 1-19 und 6-39 wurden mit Hilfe einer G-Sepharose-Säule gereinigt und, mit Ausnahme von mAk 4-58, biotinyliert.

MAk 4-13, mAk 4-58 und mAk 5-50 binden spezifisch an equine T-Zellen. In durchflusszytometrischen Analysen steigt die Frequenz der positiven Zellen nach Stimulation mit Concanavalin A an. MAk 4-13 und mAk 4-58 binden an so viele Lymphozyten, wie CD4-positive und CD8-positive Zellen zusammen in der Präparation vorkommen. Die Anzahl der durch mAk 5-50 markierten Zellen liegt knapp darunter. Mit hoher Wahrscheinlichkeit erkennen sie drei verschiedene, bisher nicht beschriebene Antigene. MAk 4-58 regt in vitro Leukozyten zur Proliferation an, in denen nach der Stimulation mRNA von Interleukin-4 und Interferon gamma nachgewiesen werden konnte.

Dagegen können die Antikörper der Klone 1-19, 2-52, 4-36, 4-55 und 6-39 als B-Zell-spezifisch bezeichnet werden, wie die Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalyse mit dem Kontrollantikörper Anti-Ig-Pferd-FITC belegt.

MAk 6-5 und 6-17 markieren alle equinen Leukozyten. Möglicherweise binden sie an ein equines CD45-Molekül. Die Antikörper des Klons 4-18 erkennen ein Antigen auf Granulozyten. Einige Daten weisen darauf hin, dass mAk 4-39 an ein Lektin bindet, welches überwiegend auf B-Zellen und auf Endothelzellen vorkommt. Den übrigen Antikörpern konnte keine Gruppe von Leukozyten und kein Antigen zugeordnet werden.

Mit Hilfe der hier beschriebenen monoklonalen Antikörper lassen sich zukünftig verschiedene Lymphozytenpopulationen des Pferdes in der Durchflusszytometrie klar unterscheiden.

7 Summary

Production and characterization of monoclonal antibodies specific for equine leucocytes

This work was initiated to produce new monoclonal antibodies for the characterization of equine leucocyte-subpopulations. For immunisation, leucocytes isolated from the peripheral blood, lymph nodes and the intestinal epithelium of horses, have been used. Out of six cell-fusions 78 clons were isolated. To characterize the mAbs, the attention was focused on immunofluorescence analysis. Antibodies of the clones 4-13, 4-58, 1-19 and 6-39 have been purified by protein G-sepharoses chromatography and, except mAb 4-58, biotinylated.

MAb 4-13, mAb 4-58 and mAb 5-50 are binding specifically to equine T-cells. Flow cytometer analyses demonstrated an increased frequency following the stimulation with Concanavalin A. The frequency of mAb 4-13- and mAb 4-58-positive cells matched the total frequency of CD4- and CD8-positive cells. The number of cells, marked by mAb 5-50, is slightly lower. Most likely these three mAbs recognize three different, as yet unknown antigens. MAb 4-58 stimulated the in vitro proliferation of leucocytes. Moreover mRNA for interleukin-4 and interferon gamma was detected in these cells after the stimulation.

By contrast the antibodies 1-19, 2-52, 4-36, 4-55 and 6-39 are B-cell-specific, since they were present on cells that were Ig-positive.

The monoclonal antibodies 6-5 and 6-17 stain all equine leucocytes. Possibly they are binding to an equine CD45-molecule. The antibodies of clone 4-18 recognize an antigen on granulocytes. Preliminary data suggests that mab 4-39 is binding to a lektin, that can be found mainly on B-Lymphocytes and endothelial cells. No group of leucocytes and no antigen could be assigned to the other antibodies.

The antibodies described here will be valuable tools to characterize different equine leucocyte-subpopulations by flow cytometry.

Anhang A: Tabellen

Tabelle A.1: Zusammenfassung der Resultate von ELAW II

WS	Klon	MG (kDa)	Prozentsatz der positiven Zellen im FACS										
			PBL (Lymph.)			PBL (Gran.)			Thymozyten			EqT 8888	Fetale Nierenzellen
			MW	Spanne	n	MW	Spanne	n	MW	Spanne	n		
EqCD2													
103	MAC288	-	67	29-100	13	2	0-7	4	60	53-72	4	1	1
110	IFA6	-	85	82-88	2	-	-	-	-	-	-	-	-
111	HB88a	58	88	85-91	2	-	-	-	-	-	-	-	-
EqCD3													
98	F6G.3(G12)	22, 27	75	54-92	13	2	0-7	5	79	58-93	4	3	5
EqCD4													
38	CVS4	58	57	42-70	13	4	0-14	5	67	51-80	4	5	1
46	CVS4	58	58	41-71	13	5	0-17	5	70	54-83	4	7	1
EqCD5													
51	F13C.3(D9)	69	77	55-88	13	6	0-19	5	92	90-94	4	0	1
71	TH2A10	69	79	53-93	13	7	0-28	5	94	92-96	4	16	1
81	CVS5	69	77	48-92	13	11	0-34	5	93	92-97	4	14	1
EqCD8													
84	CVS8	32, 69	24	9-56	13	4	0-16	4	78	69-96	4	0	1
92	CVS21	32, 69	15	4-27	13	5	0-14	5	66	53-96	4	4	-
97	F18P.2	32, 69	14	8-32	13	2	0-7	5	63	54-71	4	2	1
101	F18H.2	32, 69	18	0-35	13	2	0-6	5	67	59-77	4	4	0
EqCD11a/18													
45	CZ3.1	100, 180	25	2-68	12	95	88-99	6	95	93-97	3	3	2
65		-	86	55-99	13	38	0-99	6	97	95-98	4	0	5
77	CZ3.2	100, 180	80	52-99	13	78	61-96	6	98	97-98	4	0	1
EqCD13													
54	CVS19	140-150	5	0-17	13	66	34-86	6	14	0-35	4	13	1
EqCD44													
53		-	92	70-100	13	95	84-99	6	98	97-99	4	99	99
63	CZ5.15	-	77	28-100	12	71	23-99	6	92	80-98	4	15	93
72	CVS18	76 (100)	92	58-99	13	90	68-99	6	97	96-98	4	86	99
75		-	95	87-100	13	87	55-99	6	98	96-99	4	99	99
EqMHC I													
37	CVS22	45, 12	94	75-100	13	86	74-99	6	97	97-98	4	99	99
57	CZ6	44	95	72-100	13	71	38-98	6	89	76-94	4	99	97
105	MAC291	45, 12	92	49-100	13	43	6-99	6	88	66-98	4	99	97
EqMHC II													
43	CZ11	34	70	24-99	13	6	0-21	6	64	45-79	4	97	1
74	F13A.3(B8)	33	45	9-84	13	8	0-24	6	56	51-61	4	99	1
99	CVS20	34	77	55-99	13	4	0-13	6	7	49-82	4	99	6

Anhang A: Tabellen

EqWC1													
49		-	51	21-78	13	33	0-85	6	49	37-59	4	0	2
61		-	47	19-69	12	54	27-82	6	39	29-48	4	0	1
80		-	53	34-78	13	44	16-85	6	49	35-59	4	0	1
89	CVS11	22	58	37-88	13	56	29-86	6	51	37-62	4	0	0
EqWC2													
35		-	89	67-100	13	70	52-90	6	89	79-98	4	40	3
36		-	80	37-99	13	75	60-88	5	89	77-98	4	70	7
58		-	44	12-69	13	78	31-99	6	7	0-14	4	32	2
59		-	60	34-78	13	90	67-99	6	43	33-51	4	60	3
68	CVS6	172	82	64-97	13	85	69-99	3	97	95-99	4	70	2
90	CZ1.5	180	82	62-99	13	84	85-98	6	97	94-99	4	87	4
96	CZ1.3	160	78	54-95	13	15	0-36	6	89	71-99	4	76	1
EqWC4													
112	HB86a	46	12	12-13	2	-	-	-	-	-	-	-	-
113	HB65a	46	11	11-12	2	-	-	-	-	-	-	-	-
B-Zellen													
67		-	15	3-32	12	4	0-12	5	4	2-6	4	13	2
73	CZ2.1	85	13	1-56	13	7	0-23	5	1	0-3	4	1	3
104	MAC292	240	20	9-66	13	6	0-30	6	13	3-25	4	6	3
Makrophagen													
50	CZ2.2	-	10	0-28	13	2	0-7	6	1	0-2	4	14	0
102	CZ3.3	-	3	0-23	12	1	0-4	5	0	0-1	3	1	1

WS: Workshopnummer
 MG: Molekülgewicht in kDa
 PBL: Periphere Blutleukozyten

MW: arithmetisches Mittel
 n: Anzahl der Untersuchungen

Tabelle A.2: Auszug aus dem Angebot der Fa. Serotec (Katalog 2003)

Spezifität	Klon	Spezies	Isotyp	Ziel-Spezies
CD1w2	CC20	Maus	IgG2a	Rind
CD2	MAC288	Ratte	IgG2a	Pferd
CD3	CD3-12	Ratte	IgG1	Mensch
CD4	CVS4	Maus	IgG1	Pferd
CD5	CVS5	Maus	IgG1	Pferd
CD8	CVS21	Maus	IgG2a	Pferd
CD9	MM2/57	Maus	IgG2b	Mensch
CD11a	NR185	Maus	IgG1	Ziege
CD11a/18	CVS9	Maus	IgG1	Pferd
CD13	CVS19	Maus	IgG1	Pferd
CD18	CA1.4E9	Maus	IgG1	Hund
CD31	CO.3E1D4	Maus	IgG2a	Schaf
CD41/CD61	CO.35E4	Maus	IgG1	Schaf
CD44	CVS18	Maus	IgG1	Pferd
	MAC329	Ratte	IgG1	Schwein
CD68	Ki-M6	Maus	IgG1	Mensch
MHC I	CVS22	Maus	IgG1	Pferd
MHC II	CVS20	Maus	IgG1	Pferd
B-Zellen	CA2.1D6	Maus	IgG1	Hund
	CVS36	Maus	IgG1	Pferd
Makrophagen	MAC387	Maus	IgG1	Mensch

Anhang A: Tabellen

mAk	SK	PBL					Lkn			IEL			DE	Milz	EQT 8888	Lymphom
		Lymph.		Gran.			MW		Spanne		n					
		MW	Spanne	MW	Spanne	n	MW	Spanne	n	MW	Spanne	n				
Anti-CD4	IgG1	51	35-66	5	1-25	21	36	13-55	8	32	28-36	3	0	-	0	14
Anti-CD8	IgG2a	14	2-44	4	0-6	18	9	2-25	9	18	16-19	2	0	50	0	45
Anti-Ig-Pfd- FITC		20	8-34	11	3-21	14	33	18-50	7	26	10-22	3	0	-	0	8
1-2	IgG1	68	21-100	50	30-100	6	85	39-100	4	100	100-100	2	-	100	83	41
1-3	IgG1	72	28-100	16	3-34	13	62	40-100	4	31	29-32	2	-	25	83	64
1-5	IgG1	72	52-90	94	71-100	6	90	73-100	4	27	13-41	2	-	100	40	70
1-6	IgG1	55	36-90	21	5-42	5	57	14-100	2	8	4-12	2	-	24	-	4
1-7	IgG1	16	7-31	8	2-32	13	27	0-58	4	2	0-58	2	-	13	60	17
1-9	IgG1	72	44-100	76	36-100	6	66	25-100	4	100	100-100	2	-	60	20	-
1-10	IgG1	14	6-20	1	0-2	4	34	-	1	0	-	1	-	20	-	-
1-13	IgG2b	63	24-100	56	4-100	11	85	59-100	4	84	67-100	2	-	80	0	23
1-14	IgG1	24	11-37	8	3-12	3	10	-	1	0	-	1	-	5	-	-
1-18	IgG1	16	0-66	5	3-13	8	1	0-3	3	0	-	1	-	6	0	0
1-19	IgG1	23	8-48	13	5-26	20	32	0-44	9	15	0-42	4	76	21	1	5
1-20	IgG1	77	57-93	98	90-100	5	84	80-88	2	19	-	1	-	28	17	-
2-19	IgG1	26	8-42	70	43-100	4	91	81-100	2	3	-	1	-	4	34	-
2-52	IgG2b	23	8-50	6	2-19	19	12	0-32	7	6	0-16	3	0	26	0	5
2-72	IgG2a	57	27-78	66	51-100	5	92	76-100	4	85	70-100	2	-	100	51	-
4-1	IgG1	14	6-33	5	3-15	9	9	0-25	3	1	-	1	-	-	4	7
4-3	IgG2b	23	8-64	5	2-21	18	28	2-58	8	23	3-36	3	80	-	28	6
4-5	IgM	15	4-23	6	0-18	9	3	0-5	3	1	-	1	-	-	23	7
4-6	IgG3	6	4-9	32	8-81	9	1	0-3	3	1	-	1	-	-	0	1
4-7	IgM	9	1-18	6	1-14	9	1	0-3	3	1	-	1	-	-	8	2
4-10	IgG1	13	7-23	18	3-38	9	5	0-14	3	1	-	1	-	-	0	3
4-13	IgG1	73	46-90	6	1-23	18	50	17-76	8	57	43-72	3	2	-	0	90

Tabelle A.3: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzanalysen

Anhang A: Tabellen

mAk	SK	PBL			Lkn			IEL			DE	Milz	EqT 8888	Lymphom		
		Lymph. MW	Spanne	Gran. MW	Spanne	n	MW	Spanne	n	MW					Spanne	n
4-16	IgG1	12	6-31	6	0-18	9	4	0-9	3	1	-	1	-	-	0	8
4-17	IgG2b	15	8-34	12	1-45	9	12	0-34	3	1	-	1	-	-	0	4
4-18	IgG1	9	2-25	92	74-100	17	5	2-16	7	4	1-9	3	0	-	0	21
4-19	IgG1	5	1-10	91	71-100	9	8	1-18	3	2	1-2	2	0	-	0	17
4-20	IgG2a	13	8-28	37	3-70	9	9	0-14	3	1	-	1	-	-	0	4
4-21	IgM	1	0-6	1	0-4	8	0	-	3	1	-	1	-	-	0	0
4-24	IgM	7	3-10	6	1-10	7	13	0-36	3	2	-	1	-	-	6	3
4-28	IgG1	5	3-11	56	23-74	6	2	0-4	3	1	-	1	-	-	0	0
4-29	IgG2a	12	2-29	20	3-47	9	0	-	3	1	-	1	-	-	0	1
4-32	IgM	10	1-29	8	0-15	8	17	2-45	3	0	-	1	-	-	4	1
4-34	IgG2b	11	5-17	65	14-100	9	6	0-9	3	1	-	1	-	-	0	3
4-35	IgM	15	1-63	9	1-29	14	17	5-37	5	15	3-26	2	74	-	12	5
4-36	IgG1	25	8-83	16	7-38	17	23	1-37	8	13	1-32	3	24	-	0	0
4-38	IgG1	9	1-26	2	0-8	9	0	-	3	1	-	1	-	-	0	0
4-39	IgG1	19	6-45	74	64-100	16	31	13-61	6	34	1-67	2	-	-	6	51
4-40	IgG1	9	2-19	76	14-100	9	2	0-5	3	1	-	1	-	-	0	4
4-42	IgM	10	1-30	75	6-100	8	10	0-15	3	2	1-2	2	1	-	0	5
4-43	IgM	5	0-14	20	0-70	9	0	0-1	3	0	-	1	-	-	0	0
4-44	IgG1	12	1-21	11	1-23	9	2	1-3	3	1	-	1	-	-	0	1
4-45	IgG1	7	4-18	70	10-100	7	1	0-3	3	0	-	1	-	-	0	0
4-46	IgM	7	2-17	82	55-100	8	1	0-2	3	1	-	1	-	-	0	3
4-47	IgG2a	9	0-18	51	2-100	6	0	0-1	3	1	-	1	-	-	0	2
4-48	IgG1	13	8-23	16	4-30	9	1	0-3	3	1	-	1	-	-	0	0
4-49	IgG1	9	3-18	15	3-35	9	1	0-2	3	0	-	1	-	-	0	0
4-50	IgM	18	8-28	90	75-100	9	41	18-66	3	6	3-8	2	-	-	9	65
4-51	IgG2b	9	2-21	59	4-100	9	1	0-2	3	1	-	1	-	-	0	2
4-53	IgM	9	0-25	1	0-4	9	0	-	3	1	-	1	-	-	0	0
4-54	IgM	5	1-13	72	50-100	9	1	0-1	3	1	-	1	-	-	0	2
4-55	IgG2a	15	7-31	3	0-6	12	14	0-27	8	6	0-15	3	0	-	0	4

Tabelle A.3 Zusammenfassung der Immunfluoreszenzanalysen

Anhang A: Tabellen

mAk	SK	PBL					Lkn			IEL			DE	Milz	EqT 8888	Lymphom			
		Lymph.		Gran.			MW	Spanne	n	MW	Spanne	n					MW	Spanne	n
		MW	Spanne	MW	Spanne	n													
4-56	IgG2a	14	7-25	23	4-61	9	4	0-13	3	1	-	1	-	-	0	2			
4-57	IgG1	8	5-10	54	5-100	8	0	-	3	1	-	1	-	-	0	0			
4-58	IgG2a	78	45-93	5	0-23	18	49	20-64	8	53	38-62	3	0	-	0	70			
5-4	IgM	40	1-64	58	9-82	9	42	11-56	5	33	24-41	2	93	-	0	87			
5-5	IgG3	23	7-51	13	4-23	8	23	10-36	5	27	26-27	2	71	-	13	43			
5-17	IgM	20	10-38	9	0-28	8	16	6-29	5	23	19-26	2	44	-	0	72			
5-21	IgG2a	30	14-54	12	0-42	9	42	14-54	5	27	25-29	2	80	-	12	8			
5-22	IgM	12	1-40	8	1-20	9	18	2-30	5	24	23-24	2	77	-	13	35			
5-32	IgM	23	7-53	10	1-34	8	17	6-26	5	16	13-18	2	73	-	3	12			
5-45	IgG3	17	4-45	12	1-26	9	25	8-37	5	30	27-33	2	82	-	25	60			
5-47	IgM	30	15-50	20	14-40	8	42	12-59	5	57	39-74	2	90	-	16	43			
5-50	IgG1	50	29-74	5	1-14	9	30	12-48	5	37	16-57	2	1	-	0	84			
5-53	-	22	6-43	12	5-14	8	29	11-40	5	31	25-36	2	40	-	16	22			
5-80	IgG2a	35	16-53	12	1-35	9	37	12-55	5	36	35-36	2	68	-	16	34			
5-86	IgG1	18	1-48	9	1-25	9	31	15-51	5	35	28-41	2	74	-	21	31			
5-88	IgM	80	52-92	92	10-100	9	82	47-96	5	68	44-92	2	42	-	17	97			
6-4	IgM	28	9-51	9	1-25	8	23	5-31	4	24	20-28	2	40	-	6	10			
6-5	IgG1	76	33-100	62	17-100	9	74	52-94	5	81	77-85	2	4	-	0	98			
6-8	IgM	21	6-58	10	3-22	9	26	7-45	5	44	32-56	2	78	-	16	39			
6-10	IgM	16	9-40	11	1-33	8	23	2-35	5	25	22-28	2	24	-	21	38			
6-17	IgG2a	89	32-100	78	41-100	9	98	95-100	4	94	91-97	2	3	-	0	100			
6-23	IgM	39	8-72	21	3-45	8	41	25-64	5	52	26-78	2	54	-	14	95			
6-24	IgM	47	22-78	27	4-70	8	44	6-63	4	81	-	1	90	-	44	41			
6-29	-	10	0-22	8	1-29	7	21	3-42	5	31	25-36	2	83	-	0	10			
6-33	IgM	21	19-27	19	8-60	7	28	4-40	5	33	30-35	2	76	-	8	31			
6-39	IgG2a	28	15-52	5	0-11	9	26	6-42	5	10	-	1	86	-	0	3			
6-59	IgG1	16	4-30	6	0-27	8	6	0-13	5	10	9-11	2	83	-	0	2			

Tabelle A.3: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzanalysen

Anhang A: Tabellen

Legende zu Tabelle A.3:

mAk:	monoklonaler Antikörper	Lymph.:	Lymphozyten
SK:	Immunglobulin-Subklasse	Gran.:	Granulozyten
PBL:	Periphere Blutzellen	MW:	arithmetisches Mittel
Lkn:	Lymphknotenlymphozyten	n:	Anzahl der Messungen
IEL:	Intraepitheliale Leukozyten	DE:	Darmepithelzellen

Tabelle A.4: Proliferationsassays mit mAk 4-58 (Messwerte)

	M (mAk) in µg	SI	STABW (SI)	MW	STABW (MW)
Pferd 1	PBS			1480,0	496,4
	Medium	1,0		3531,7	6146,7
	ConA	4,9	1,7	17204,2	7168,0
	2,0	11,0	2,0	38851,0	17504,6
	1,0	14,2	5,0	50065,2	24275,7
	0,5	15,8	6,2	55742,0	18667,4
	0,2	12,6	5,6	44414,0	14049,4
	0,1	10,2	4,0	36125,7	12052,6
	0,05	5,4	3,1	18974,5	6378,2
	0,02	4,2	2,4	14848,0	11594,5
	0,01	0,3	0,1	972,5	523,2
Pferd 2	PBS			1175,7	1018,0
	Medium	1,0		8557,5	1903,1
	ConA	4,1	2,0	35173,0	17001,7
	2,0	17,0	6,2	145244,5	84738,0
	1,0	13,9	4,2	119161,2	67152,7
	0,5	14,5	2,9	123703,7	66893,7
	0,2	15,1	2,1	129642,0	68891,7
	0,1	15,3	1,5	131163,5	69127,3
	0,05	10,8	4,4	92137,3	55076,3
	0,02	5,6	3,6	48269,5	33171,0
	0,01	0,5	0,5	4061,5	3458,7

Pferd 3	M (mAk) in	SI	STABW (SI)	MW	STABW (MW)
	μg				
	PBS			217,3	116,5
	Medium	1,0		3549,7	409,3
	ConA	0,4	0,1	1415,6	303,3
	2,0	30,8	12,6	109454,0	42990,6
	1,0	27,8	6,9	98811,5	24328,5
	0,5	31,0	3,1	109970,3	11117,5
	0,25	29,3	2,9	103940,5	10186,6
	0,13	26,6	2,9	94490,0	10165,8
	0,06	23,9	6,0	84889,0	21336,8
	0,03	20,0	9,0	71060,3	31783,2
	0,02	7,7	3,8	27264,0	13617,4

M (mAk): Masse an eingesetztem monoklonalen Antikörper
 PBS: Puffer (ohne Zellen)
 Medium: Standardmedium mit Zellen
 ConA: Concanavalin A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
 SI: Stimulationsindex (arithmetisches Mittel)
 STABW (SI): Standardabweichung de Stimulationsindex
 MW: Arithmetisches Mittel der Messwerte
 STABW (MW): Standardabweichung der Messwerte

Anhang B: Verwendete Materialien und Geräte

Materialien:

Acrylamid 30%	BioRad, München
Agarosegel-Marker (100bp DNA Ladder plus)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)	Bio-Rad, CA, USA
Ammoniaklösung 25%	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
AmpliTaq DNA Polymerase	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Aqua dest. (RNase frei)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA) (= Sera bovine, Fraction V powder)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Centricon 30 concentrator	Amicon Inc., Beverly, MA, USA
Complete™ (Proteaseinhibitor)	Boehriner-Mannheim-GmbH, Mannheim
Chemolumineszenz-Substrat	Pierce, Rockford Illinois, USA
Chloroform (ad analysis)	Merck, Darmstadt
Dialyseschlauch (VISKING, Typ 8/32)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
ddNTP-Set (ultrapur, 100mM)	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Dübendorf, Schweiz
Dulbeco´s Modified Eagles Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Eisen, gepulvert	Merck, Darmstadt
Eisessig 96% ig	Merck, Darmstadt
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Köln
Elektrophoresekammer (Mini-Protean II)	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer (für Agarosegele)	Bio-Rad, München
70% Ethanol (für RNA-Präparation)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
FACS-Röhrchen	Micronic Systems, Lelystad, Holland
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
FICOLL-Plaque™	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Filter (Easy-Tab-C Self-Aligning Filters)	Packard Instrument Company, Frankfurt
Filterpapier #3	Whatman, Maidstone, England
Folie (TopSeal™-A Adhaesive Sealing Film)	Packard, Dreieich
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt
HAT-Lösung	Seromed Biochrom KG, Berlin
HT-Lösung	Seromed Biochrom KG, Berlin
IL6-Lösung	zur Verfügung gestellt von Dr. T. Göbel ,

Imidazol	München
Isobutanol	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol (für RNA-Präparation)	Fluka, Neu-Ulm
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl_2)	AppliChem, Darmstadt
Kryoröhrchen 2ml	Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden
96-Lochplatten	Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden
96-well-Mikroplates, Packard	Packard Instrument Company, Frankfurt
Top-Seal™-A (Folie)	Packard Instrument Company, Frankfurt
F96-Maxisorp-Platte	Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden
6-Lochplatten	Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden
24-Lochplatten	Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Bio-Rad, München
Metallsieb	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Modifizierte Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Milchpulver (= non-fat dry milk)	Bio-Rad, München
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO_2)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	AppliChem, Darmstadt
Natronlauge, Tabl.	Merck, Darmstadt
Nitrozellulose (BA83; 0,2 μm)	Schleicher und Schüll, Dassel
Nomidet® P40	Boehringer Mannheim, Mannheim
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
PERCOLL-Plaque™	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Pferde-Serum	zur Verfügung gestellt von Dr. Cornelia Deeg, München
Phosphorsäure (H_3PO_4)	AppliChem, Darmstadt
Protein G-Sepharose® for fast flow	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Dübendorf, Schweiz
Polyethylenglycol (PEG 1500)	Boehringer Mannheim, Mannheim
10x Puffer (für Taq-Polymerase)	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Reverted Aid™ H Minus First Strand cDNA Synth Kit	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
RPMI 1640 mit Glutamax	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Salzsäure 1 N (HCl)	AppliChem, Darmstadt
SDS-Marker (BENCHMARK Prestained Protein Ladder)	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Sodiumdocecylsulfat (SDS)	Bio-Rad, München
Starfrost®-Adhaesivobjektträger	Langenbrinck, Emmerdingen
Sucrose	Merck, Darmstadt
Sulfo-NHS-Biotin (200 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Szintilationsflüssigkeit (Microscint O)	Packard Instrument Company, Frankfurt

Anhang B: Verwendete Materialien und Geräte

Taq-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Tetramethylbenzidin (TMB)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Trishydroxymethylaminoethan (Tris)	Bio-Rad, München
TritonX-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)	AppliChem, Darmstadt
Trizol©-Reagenz	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	AppliChem, Darmstadt
³ H-Thymidin ([6- ³ H]Thymidin, 1 mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Ultra low IgG FCS	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Vectastain® ABC-AP-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	AppliChem, Darmstadt
Xylencyanol FF	Bio-Rad, München
Zellkulturflaschen (versch. Größen)	Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden
Ziege-anti-Maus-Ig-(H+L)-mAk	Serotec, Oxford, UK
Zitronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt

Geräte:

Brutschränke:

CO2-Auto-Zero

Heraeus Instruments GmbH, München

Fluorescence activated cell scanner

FACScan

Becton Dickinson, Heidelberg

Software: CellQuest pro™

Becton Dickinson, Heidelberg

Geldokumentation:

Gel Doc 2000

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Software: Quantity One 4.1.1

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Mikroskope:

Leica, Bensheim

Proliferationsassay:

Harvester (Filtermate Harvester)

Packard Instrument Company, Frankfurt

β-Counter

Packard Instrument Company, Frankfurt

(TopCount NXT™ Microplate Scintillation
and Luminescence Counter)

Photometer:

Photometer (Biophotometer)

Eppendorf, Köln

Küvette

Sigma, USA

(Spectrophotometer Quartz-Küvette)

Sterile Werkbänke

Mikroflow

Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden

LaminAir®

Heraeus Instruments GmbH, München

PCR:

Thermocycler

Biotron, Göttingen

(Biometra, TRIO Heated Lid)

Zentrifugen:

Zentrifuge (Sigma 4K15C)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Mikrozentrifuge (Centrifuge 5415 R)

Eppendorf, Köln

Literaturverzeichnis

- [1] Antczak, D.F., Bright, S.M., Remick, L.H., Bauman, B.E. (1982)
Lymphocyte alloantigens of the horse: I. Serologic and genetic studies.
Tissue Antigens 20, 172-187

- [2] Antczak, D.F. (1989)
Biology of the major histocompatibility complex.
In: Veterinary Clinical Immunology (eds, Halliwell, R.E.W., Gorman, N.T.), pp.473-492. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA

- [3] Antczak, D.F. (1992)
The major histocompatibility complex of the horse.
In: Equine infectious diseases IV: Proceedings of the Sixth International Conference, Cambridge 1991 (eds, Plowright, W., Rosedale, P.D., Wade, J.F.), pp-99-112. R & W Publications, Newmarket, UK

- [4] Baker, J.M., Bamford, A.I., Antczak, D.F. (1999)
Modulation of allospecific CTL responses during pregnancy in equids: an immunological barrier to interspecies matings?
J. Immunol. 162, 4496-4501

- [5] Band, I., Chess, L. (1985)
Perturbation of the T4 molecule transmits a negative signal to T cells.
J. Exp. Med. 162, 1294-1303.

- [6] Barbis, D.P., Bainbridge, D., Crump, A.L., Zhang, C.H., Antczak, D.F. (1994)
Variation in expression of MHC class II antigens on horse lymphocytes determined by MHC haplotype.
Vet. Immunol. Immunopathol. 42, 103-114.

- [7] Barbis, D.P., Maher, J.K., Stanek, J., Klaunberg, B.A., Antczak, D.F. (1994)
Horse cDNA clones encoding two MHC class I genes.
Immunogenetics 40, 163.

- [8] Barclay, A.N., Birkeland, M.L., Brown, M.H., Beyers, A.D., Davis, S.J., Somoza, C., Williams, A.F. (1993)
The Leucocyte Antigen FactsBook.
London, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich.
- [9] Beadle, R.E., Horohov, D.W., Gaunt, S.D. (2002)
Interleukin-4 and interferon-gamma gene expression in summ pasture-associated obstructive pulmonary disease affected horses.
Equine Vet. J. 34(4), 389-394.
- [10] Benarfa, C., Cunningham, F.M., Hamblin, A., Horohov, D.W., Collins, M.E. (2000)
Cloning of equine chemokines eotaxin, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, MCP-2, MCP-4, m-RNA expression in tissues and induction by IL-4 in dermal fibroblasts.
Vet. Immunol. Immunopath. 76,283-298
- [11] Blanchard-Channell, M., Moore, P.F., Stott, J.L. (1994)
Characterization of monoclonal antibodies specific for equine homologues of CD3 and CD5.
Immunology 82, 548–554.
- [12] Bowles, K.S., Beadle, R.E., Mouch, S., Pourciau, S.S., Littlefield-Chabaud, M.A., Le Blanc, C., Mistic, L. Fermaglich, D., Horohov, D.W. (2002)
A novel model of equine recurrent airway obstruction.
Vet. Immunol. Immunopathol. 76, 285-389
- [13] Byrne, K., Davis, W., Holmes, M., Brassfield, A., McGuire, T. (1997)
Cytokine RNA expression in an equine CD4+ subsets differentiated by expression of a novel 46 kDa surface protein.
Vet. Immunol. Immunopath. 56, 191
- [14] Carter, N.P. (1990)
Measurement of cellular subsets using antibodies.
In: Ormerod, M.G. Ed. , Flow Cytometry, A Practical Approach. IRL Press, Oxford, pp. 45–68.
- [15] Celis, J.E., Lauridsen, J.B., Basse, B. (1994)
Determination of antibody specificity by Western blotting and immunoprecipitation.
In: Celis, J.E. (ed.), *Cell Biology. A Laboratory Handbook*, Academic Press, New York, Vol. 2, pp. 305-313.

- [16] Coffman, R.L., Weissman I.L. (1981)
B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family.
Nature 19; 289(5799): 681-683
- [17] Crameri, R. (1998)
Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergenes: from the nucleotid sequence to clinical applications.
Int. Archiv. Allergy Immunol. 115, 99-114
- [18] Crepaldi, T., Crump, A., Newman, M., Ferrone, S., Antczak, D.F. (1986)
Equine T lymphocytes express MHC Class II antigens.
J. Immunogen. 13, 349–360.
- [19] Crump, A.I, Davis, W.C., Antczak, D.F. (1988)
A monoclonal antibody identifying a T-cell marker in the horse.
Anim. Genet. 19, 349-357
- [20] Deeg, C.A., Thureau, S.R., Gerhards, H., Ehrenhofer, M., Wildner, G., Kaspers, B. (2002)
Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease.
Eur J Immunol. 32(9):2598-2606.
- [21] Dohmann, K., Wagner, B., Horohov, D.W., Leibold, W. (2000)
Expression and characterisation of equine interleukin 2 and Interleukin 4.
Vet. Immunol. Immunopathol. 77, 243-256
- [22] Donaldson, W.L., Crump, A.L., Zhang, C.H., Kornbluth, J., Kamoun, M., Davis, W.C., Antczak, D.F. (1988)
At least two loci encode polymorphic class I MHC antigens in the horse.
Anim. Genet. 19, 379–390.
- [23] Donovan, J.A., Koretzky, G.A. (1993)
CD45 and the immune response.
J. Am. Soc. Nephrol. 4(4): 976-985
- [24] Dustin, M.L., Springer, T.A. (1991)
Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion.
Ann. Rev. Immunol. 9, 27–66.

- [25] Eder, C. Curik, I., Brem, G., Cramer, R., Bodo, I., Habe, F., Lazary, S., Solkner, J., Marti, E. (2001)
Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lippizian horses.
Equine Vet. J. 33, 714-720
- [26] Farr, A.G., Nakane, P.K. (1981)
Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review.
J. Immun. Meth. 47, 129
- [27] Franchini, M., Gill, U., von Fellenberg, R., Bracher, V.D. (2000)
Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay.
Am. J. Vet. Res. 61, 1369-1374
- [28] Grünig, G., Himmler, A., Antczak, D.F. (1994a)
Cloning and sequencing of horse interferon- γ cDNA.
Immunogenetics 39, 448-449
- [29] Grünig, G., Barbis, D.P., Zhang, C.H., Davis, W.C., Lunn, D.P., Antczak, D.F. (1994b)
Correlation between monoclonal Antibody reactivity and expression of CD4 and CD8 α genes in the horse.
Vet. Immunol. Immunopathol. 42, 61-69
- [30] Harris, D.T., Camenisch, T.D., Jaso-Friedmann, L., Evans, D.L. (1993)
Expression of an evolutionarily conserved function associated molecule on sheep, horse and cattle natural killer cells.
Vet. Immunol. Immunopathol. 38, 273-282.
- [31] Hayward, A.R., Lee, J., Beverly, P.C.L. (1989)
Ontogeny of expression of UCHL1 antigen on Ter-1+ (CD4/8) and TcR δ + T cells.
Eur. J. Immunol. 19, 771-773
- [32] Hildreth, J.E.K., August, J.T. (1985)
The human lymphocyte function-associated (HLFA) antigen and a related macrophage differentiation antigen (Hmac-1): functional effects of subunit-specific monoclonal antibodies.
J. Immunol. 134, 3272-3280

- [33] Hildreth, J.E.K., Gotch, F.M., Hildreth, P.D.K., McMichael, A.J. (1983)
A human lymphocyte-associated antigen involved in cell-mediated lympholysis.
Eur. J. Immunol. 13, 202-208
- [34] Himmler, A., Grünig, G. (1997)
The cloning of equine type I and type II interferons.
In Schijns, V.E.C.J., Horzinek, M.C. (Eds.), *Cytokines in Veterinary Medicine*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 177-190
- [35] Holmes, M.A., Lunn, D.P. (1994)
Variation of MHC II expression on canine lymphocytes with age.
Tissue Antigens 43, 3927-3936
- [36] Hormanski, C.E., Truax, R., Pourciau, S.S., Folsom, R.W., Horohov, D.W. (1992)
Induction of lymphokine-activated killer cells of equine origin: specificity for equine target cells.
Vet. Immunol. Immunopathol. 32, 25–36.
- [37] Jacobsen, C.N., Aasted, B., Broe, M.K., Petersen, J.L. (1993)
Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species.
Vet. Immunol. Immunopathol. 39, 461–466.
- [38] Jones, M., Cordell, J.L., Beyers, A.D., Tse, A.G., Mason, D.Y. (1993)
Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies.
J. Immunol. 150, 5429–5435.
- [39] Jose-Cunilleras, E. Kohn, C.W., Hillier, A., Saville, W.J., Lorch, G. (2001)
Intradermal testing in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease, recurrent urticaria, or allergic dermatitis.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 219, 1115-1121
- [40] Joubert, P., Silversides, D.W., Lavoie, J.P. (2001)
Equine neutrophils express mRNA for tumour necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, macrophage-inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon-gamma.
Equine Vet J. 33(7):730-733
- [41] Kabat, F.A. (1939)
The molecular weight of antibodies.
J. Exp. Med. 69, 103–119.
- [42] Kato, H., Ohashi, T., Nakamura, N., Nishimura, Y., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H., Hasegawa, A (1995)
Molecular cloning of equine interleukin-1 alpha and beta cDNA.
Vet. Immunol. Immunopathol. 48, 221-231

- [43] Kearsey J.A., Stadnyk A.W. (1996)
Isolation and characterisation of highly purified rat intestinal intraepithelial lymphocytes.
J. Immunol. Methods. 194 (1):35-48.
- [44] Kipps, T.J. (1989)
The CD5 B cell.
Adv. Immunol. 47, 117–185.
- [45] Klinman, N.R., Rockey, J.H., Karush, F. (1965)
Equine anti-hapten antibody: II. The gG 7Sg components and their specific interaction.
Immunochemistry 2, 51–60.
- [46] Köhler, G., Milstein, C. (1975)
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 256(5517):495-7
- [47] Kürzinger, K., Reynolds, t., Germain, R.N., Davignon, D., Martz, E., Springer, T.A. (1981)
A novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): cellular distribution, quantitative expression and structure.
J. Immunol. 127, 596-602
- [48] Kydd, J.H., Antczak, D.F., Allen, W.R., Barbis, D., Butcher, G., Davis, W., Duffus, W.P.H., Edington, N., Grunig, G., Holmes, M.A., Lunn, D.P., McCulloch, J., O'Brien, M.A., Perryman, L.E., Tavernor, A.S., Williamson, S., Zhang, C. (1994)
Report of the First International Workshop on Equine Leucocyte Antigens, Cambridge, UK, July 1991.
Vet. Immunol. Immunopathol. 42, 1–60.
- [49] Laemmli, U. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685
- [50] Lanzavecchia, A. (1990)
Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T-lymphocytes.
Annu. Rev. Immunol. 8, 773-793
- [51] Lanzavecchia, A., Roosnek, E., Gregory, T., Berman, P., Abrignani, S. (1988)
T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted on their own surface molecules.
Nature 334, 530-532

- [52] Lavoie, J.P., Maghni, K., Desnoyers, M., Taha, R., Martin, J.G., Hamid, Q.A. (2001)
Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a TH2-type cytokine profile.
Am. J. Resp. Crit. Care Med. 164, 1410-1413
- [53] Lazary, S., Gerber, H., Glatt, P.A., Straub, R. (1985)
Equine leukocyte antigens in sarcoid-affected horses.
Equine Vet. J. 17, 283-286
- [54] Lazary, S., Antczak, D.F., Bailey, E., Bell, T.K., Bernoco, D., Byrns, G., McClure, J.J. (1988)
Joint report of the Fifth International Workshop on Lymphocyte Alloantigenes of Horse, Baton Rouge, Louisiana, 31 October-1 November 1987.
Anim. Genet. 19, 447-456.
- [55] Lazary, S., Marti, E., Szalai, G., Gaillard, C., Gerber, H. (1994)
Studies on the frequency and associations of equine leukocyte antigens in sarcoid and summer dermatitis.
Anim. Genet. 25 (Suppl 1), 75-80
- [56] Lew, A.M., Bailey, F., Valas, R.B., Coligan, J.E. (1986)
The gene encoding the equine soluble class I molecule is linked to horse MHC.
Immunogenetics 24, 128-130
- [57] Lew, A.M., Valas, R.B., Maloy, W.I., Coligan, J.E. (1986)
A soluble class I molecule analogous to mouse Q10 in horse and related species.
Immunogenetics 23, 277-283
- [58] Lunn, D.P., Holmes, M.A., Duffus, W.P.H. (1991)
Three monoclonal antibodies identifying antigens on all equine T-lymphocytes, and two mutually exclusive T-lymphocyte subsets.
Immunology 74, 251-257.
- [59] Lunn, D.P., Holmes, M.A., Duffus, W.P.H. (1993)
Equine T lymphocyte MHC II expression: variation with age and subset.
Vet. Immunol. Immunopathol. 35, 225-238.
- [60] Lunn, D.P. (1993)
A comparative review of human and equine leukocyte differentiation antigens.
Br. Vet. J. 149 (1), 31-49
- [61] Lunn, D.P., Holmes, M.A., Duffus, W.P.H. (1994a)
Polymorphic expression of an equine T lymphocyte and neutrophil subset marker.
Vet. Immunol. Immunopathol. 42, 83-89.
- [62] Lunn, D.P., Schram, B.R., Vagnoni, K.E., Schobert, C.S., Truax, R., Horohov, D.W. (1994b)
Receptor interactions in equine lymphokine-activated killing. In: Nakajima, H., Plowright, W. Eds., *Equine Infectious Diseases VII. Proceedings of the Seventh International Conference, Tokyo 1994.* R&W Publications, Newmarket, pp. 133-138.

- [63] Lunn, D.P., Holmes, M.A., Schram, B.R., Duffus, W.P.H. (1995a)
Monoclonal antibodies specific for equine IgG sub-isotypes including an antibody which recognizes B lymphocytes.
Vet. Immunol. Immunopathol. 47, 239–251.
- [64] Lunn, D.P., McClure, J.T., Schobert, C.S., Holmes, M.A. (1995b)
Abnormal patterns of equine leucocyte differentiation antigen expression in SCID foals suggests the phenotype of normal equine NK cells.
Immunology 84, 495–499.
- [65] Lunn, D.P., Schram, B.R., Vagnoni, K.E., Schobert, C.S., Horohov, D.W., Ginther, O.J. (1996)
Positive selection of EqCD8 precursors increases equine lymphokine-activated killing.
Vet. Immunol. Immunopathol. 53, 1–13.
- [66] Lunn, D.P., Holmes, M.A., Antczak, D.F., Agerwal, N., Baker, J., Bendali-Ahcene, S., Blanchard-Channell, M., Byrne, K.M., Cannizzo, K., Davis, W., Hamilton, M.J., Hannant, D., Kondo, T., Kydd, J.H., Monier, M.C., Moore, P.F., O'Neil, T., Schram, B.R., Sheoran, A., Stott, J.L., Sugiura, T., Vagnoni, K.E. (1998)
Report of the Second Equine Leucocyte Antigen Workshop, Squaw Valley, California, July 1995.
Vet. Immunol. Immunopathol., 62(2):101-43.
- [67] Lunn, D.P., Wade, J.F. (2001)
Proceedings of the Workshop on Equine Immunology. Havemeyer Foundation Monographs.
R&W Publications Limited, Newmarket
- [68] Lydyard, P.M., Mackenzie, L. (1989)
Lymphocyte activation by CD5 mAb.
In: Knapp, W., Dorken, B., Rieber, E.P., Stein, H., Gilks, W.R., Schmidt, R.E., von dem Borne, A.E.G.Kr. Eds. , Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 338.
- [69] Marti, E., Horohov, D.W., Antzak, D.F., Lazary, S., Lunn, D.P. (2003)
Advances in equine immunology: Havemeyer workshop reports from Santa Fe, New Mexico, and Hortobagy, Hungary.
Vet. Immunol. Immunopathol. 91, 233-243
- [70] Mayall, S., Siedek, E., Hamblin, A.S. (2001)
The anti-human CD21 antibody, BU33, identifies equine B-cells.
J. Comp. Pathol. 124(1), 83-87
- [71] Matthews, A.G., Imlah, P., McPherson, E.A. (1983)
A reagin-like antibody in horse serum: 1. Occurrence and some biological properties.
Vet. Res. Commun. 6, 13–23.

- [72] McGorum, B.C., Dixon, P.M., Halliwell, R.E.W. (1993)
Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after “natural (hay and straw) challenges.”
Vet Immunol Immunopathol. 36:207-222
- [73] McGorum, B.C., Ellison, J., Cullen, R.T. (1998)
Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems.
Equine Vet. J. 30, 430-434
- [74] McGuire, T.C., Poppie, M.J. (1973)
Hypogammaglobulinaemia and thymic hypoplasia in horses: a primary combined immunodeficiency disorder.
Infect. Immunity 8, 272-277
- [75] McGuire, T.C., Leib, S.R., Lonning, S.M., Zhang, W., Byrne, K.M., Mealey, R.H. (2000)
Equine infectious anaemia virus proteins with epitopes most frequently recognized by cytotoxic T lymphocytes from infected horses.
J. Gen. Virol. 81, 2735-2739
- [76] McMonagle, E.L., Taylor, S., van Zuilekom, H., Sandres, L., Scholtes, N., Keanie, L.J., Hopkins, C.A., Logan, N.A., Bain, D., Argyle, D.J., Onions, D.E., Schijns, V.E., Nicolson, L. (2001)
Production of biological active equine interleukin 12 through expression of p35, p40 and single chain IL-12 in mammalian and baculovirus expression systems.
Equine Vet. J. 33, 693-698
- [77] Mealey, R.H., Fraser, D.G., Oaks, J.L., Cantor, G.H., McGuire, T.C. (2001)
Immune reconstitution prevents continuous equine infectious anemia virus replication in an Arabian foal with severe combined immunodeficiency: lessons for control of lentiviruses.
Clin. Immunol. Immunopathol. 101, 237-247
- [78] Monos, D.S., Wolf, B., Radka, S.F., Rifat, S., Donawick, W.J., Soma, L.R., Zmijewski, C.M., Kamoun, M. (1989)
Equine class II MHC antigens: identification of two sets of epitopes using anti-human monoclonal antibodies.
Tissue Antigens 34, 111–120.
- [79] Moore, B.R. Krakowa, S., Robertson, J.T., Cummins, J.M. (1995)
Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from standardbred racehorses with inflammatory airway disease.
Am. J. Vet. Res. 56, 562-567.

- [80] Nevalainen, M., Raulo, S.M., Brazil, T.J., Pirie, R.S., Sorsa, T., McGorum, B.C., Maisi, P. (2002)
Inhalation of organic dusts and lipopolysaccharide increases gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMPs) in the lung of heaves horses.
Equine Vet. J. 34, 150-155.
- [81] O'Brien, M.A., Holmes, M.A., Lunn, D.P., Duffus, W.P.H. (1991)
Evidence for MHC class-I restricted cytotoxicity in the one-way, primary mixed lymphocyte reaction.
Equine Vet. J. 12, 30–35, Supplement.
- [82] Olszewski, M.A., Robinson, N.E., Zhu, F.X., Zhang, X.Y., Tithof, P.K. (1999)
Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways.
Am. J. Physiol. 276, L522-L529
- [83] Parnes, J.R. (1989)
Molecular biology and function of CD4 and CD8.
Adv. Immunol. 44, 265–312.
- [84] Pastoret, P.P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (1988)
Handbook of vertebrate immunology.
Academic Press Inc, New York, USA
- [85] Pedersen, L.G., Castelruiz, Y., Jacobsen, S., Aasted, B. (2002)
Identification of monoclonal antibodies that cross-react with cytokines from different animal species.
Vet. Immunol. Immunopathol. 88, 111-122
- [86] Perryman, L.E., Wyatt, C.R., Magnuson, N.S., Mason, P.H. (1988)
T lymphocyte development and maturation in horses.
Animal Genetics 19, 343-348
- [87] Pescovitz, M.D., Lunney, J.K., Sachs, D.H. (1985)
Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferation and cytotoxic T cells.
J. Immunol. 134, 37-44
- [88] Pintado, C.O., Friend, M., Llanes, D., 1995.
Characterisation of a membrane receptor on ruminants and equine platelets and peripheral blood leukocytes similar to the human integrin receptor glycoprotein IIb r IIIa CD41 r 61 .
Vet. Immunol. Immunopathol. 44, 359–368.
- [89] Raulet, D.H., Eisen, H.N. (1990)
Cellular Basis for immune responses.
In: General Immunology, 2nd edn (ed. Eisen, H.N.), pp.81-124. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, USA.

- [90] Rauho, S.M., Sorsa, T.A., Kiili, M.T., Maisi, P.S. (2001)
Evaluation of collagenase activity, matrix metalloproteinase-8, and matrix metalloproteinase-13 in horses with chronic obstructive pulmonary disease.
Am. J. Vet. Res. 62, 1142-1148
- [91] Ridgley, S.L., McGuire, T.C. (2002)
Lipopeptide stimulation of MHC class-I-restricted memory cytotoxic T lymphocytes from equine infectious anaemia virus-infected horses.
Vaccine 20, 1809-1819
- [92] Roberts, M.C. (1975)
Equine immunoglobulins and the equine immune system.
In: Grunsell, C.S.G., Hill, F.W.G., Eds. , *The Veterinary Annual* 15th edn. Wright-Scientifica, Bristol, pp. 192–203.
- [93] Robinson, N.E. (2001)
International Workshop on Equine Chronic Airway Disease, Michigan State University, June 16-18, 2000
Equine Vet. J. 33, 5-19.
- [94] Rockey, J.H. (1967)
Equine antihapten antibody.
J. Exp. Med. 125, 249–275.
- [95] Rode, H.J., Janssen, W., Rosen-Wolff, A., Bugert, J.J., Thein, P., Becker, Y., Darai, G. (1993)
The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10)-like gene.
Virus Genes 7, 111-116
- [96] Rudd, C.E. (1990)
CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex: a novel class of protein-tyrosine kinase receptor. *Immunol. Today* 11, 400–406.
- [97] Schlossman, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J.M., Kishimoto, T., Morimoto, C., Ritz, J., Shaw, S., Silverstein, R., Springer, T., Tedder, T.F., Todd, R.F. (1995)
Leucocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens: Proceedings of the Fifth International Workshop and Conference, Boston, 1993,
Oxford University Press, Oxford, UK
- [98] Sellon, D.C., Cullen, J.M., Whetter, L.E., Gebhard, D.H., Coggins, L., Fuller, F.J., (1993)
Production and characterization of a monoclonal antibody recognizing a cytoplasmic antigen of equine mononuclear phagocytes.
Vet. Immunol. Immunopathol. 36, 303–318.
- [99] Sharpe, P.T. (1988)
Methods of Cell Separation.
Elsevier, Amsterdam, p. 211.

- [100] Shin, E.K., Perryman, L.E., Meek, K. (1997)
A kinase-negative mutation of DNA-PK(CS) in equine SCID results in defective coding and signal joint formation.
J. Immunol. 158, 3565-3569
- [101] Siedek, E.M., Honnah-Symns, N., Fincham, S.C., Mayall, S., Hamblin, A.S. (2000)
Equine macrophage identification with an Antibody (Ki-M6) to human CD68 and a new monoclonal antibody (JB10).
J. Comp. Pathol. 122(2-3), 145-155.
- [102] Springer, T.A. (1990)
Adhesion receptors of the immune system.
Nature 346, 425-434
- [103] Steinbach, F., Mauel, S., Beier, I. (2002)
Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity.
Vet. Immunol. Immunopathol. 84, 83-95
- [104] Stoll, M., Dalchau, R., Schmidt, R.E., (1989)
Cluster report: CD44.
In: Knapp, W., Dorken, B., Gilks, W.R., Rieber, E.P., Schmidt, R.E., Stein, H., von dem Borne, A.E.G.Kr. Eds. , Leucocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 619–622.
- [105] Su, X., Morris, D.D., Crowe, N.A., Moore, J.N., Fischer, K.J., McGraw, R.A. (1992)
Equine tumor necrosis factor alpha: cloning and expression in Escherichia coli, generation of monoclonal antibodies, and development of of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay.
Hybridoma 11, 715-727.
- [106] Swiderski, C.E., Horohov, D.W. (1995)
Molecular cloning and sequencing of equine interleukin 10 (IL-10) and beta-actin.
Proceedings of the 70th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, IL, Nov.13-14. Abstract 125
- [107] Szalai, G., Antczak, D.F., Gerber, H., Lazary, S. (1994a)
Molecular cloning and characterization of horse DQA cDNA.
Immunogenetics 40, 457.
- [108] Szalai, G., Antczak, D.F., Gerber, H., Lazary, S. (1994b)
Molecular cloning and characterization of horse DQB cDNA.
Immunogenetics 40, 458.
- [109] Tajima, M., Fujinaga, T., Mizuno, S., Otomo, K. (1990)
The distributions of phytohemagglutinin-P and concanavalin A binding sites on equine, bovine and canine peripheral blood lymphocytes.
Zentralbl. Veterinarmed. [B] 37(4), 290-296

- [110] Targowski, S.P. (1976)
Separation of mononuclear leukocytes and polymorphonuclear leukocytes from equine blood.
Can. J. Comp. Med. 40, 285-290
- [111] Tavernor, A.S., Allen, W.R., Butcher, G.W. (1993)
cDNA cloning of equine interleukin-2 by polymerase chain reaction.
Equine Vet. J. 25, 242-243
- [112] Tavernor, A.S., Deverson, E.V., Coadwell, W.J., Lunn, D.P., Zhang, C., Davis, W., Butcher, G.W. (1993)
Molecular cloning of equine CD44 by a COS cell expression system.
Immunogen 37, 474-477.
- [113] Tavernor, A.S., Kydd, J.H., Bodian, D.L., Jones, E.Y., Stuart, D.I., Davis, S.J., Butcher, G.W. (1994)
Expression cloning of an equine T-lymphocyte glycoprotein CD2 cDNA, structure-based analysis of conserved sequence elements.
Eur. J. Biochem. 219, 969-976.
- [114] Tizard, I.R. (2000)
Veterinary Immunology: An Introduction, 6th Edition
Saunders, Philadelphia, PA
- [115] Tschetter, J.R., Davis, W.C., Perryman, L.E., McGuire, T.C. (1998)
CD8 Dimer usage on $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes from Equine Lymphoid Tissues.
Immunobiology 198, 424-438
- [116] Tumas, D.B., Brassfield, A.L., Travennor, A.S., Hines, M.T., Davis, W.C., McGuire, T.C. (1994)
Monoclonal antibodies to the equine CD2 T lymphocyte marker, to a pan-granulocyte / monocyte marker and to a unique pan-B lymphocyte marker.
Immunobiology 192, 48-64.
- [117] Vandergriff, E.V., Horohov, D.W. (1993)
Molecular cloning and expression of equine interleukin 2.
Vet. Immunol. Immunopathol. 39, 395-406
- [118] Vandergriff, E.V., Horohov, D.W. (1994)
Molecular cloning and sequencing of equine interleukin 4.
Vet. Immunol. Immunopathol. 40, 379-384
- [119] Viceiros, M.M., Antczak, D.F. (1999)
Characterization of equine natural killer and IL-2 stimulated lymphokine activated killer cell populations.
Dev. Comp. Immunol. 23, 521-532

- [120] Wallace, D.L., Beverley, P.C.L. (1990)
Phenotypic changes associated with activation of CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T cells.
Immunology 69, 460–467.
- [121] Watson, J. L., Stott, J. L., Blanchard, M. T., Plavoie, J.-P., Wilson, W. D., Gershwin, L.J. (1997)
Phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease and in normal controls
Vet Pathol. 34:108-116
- [122] Wyatt, C.R., Davis, W.C., McGuire T.C., Perryman, L.E. (1988)
T lymphocyte development in horses: I. Characterization of monoclonal antibodies
Identifying three stages of T lymphocyte differentiation.
Vet. Immunol. Immunopathol. 18, 3-18
- [123] Zhang, C.H., Donaldson, W.L., Antczak, D.F. (1994)
An equine B cell surface antigen defined by a monoclonal antibody.
Vet. Immunol. Immunopathol. 42, 91–102.
- [124] Zhang, C.H., Davis, W.C., Grünig, G., Antczak, D.F. (1998)
The equine homologue of LFA-1 (CD11a/CD 18): cellular distribution and differential determinants.
Vet. Immunol. Immunopathol. 62, 167-183.
- [125] Zizzadoro, C., Belloli, C., Badino, P., Ormas, P. (2002)
A rapid and simple method for the separation of pure lymphocytes from horse blood.
Vet. Immunol. Immunopathol. 89, 99-104.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger danke ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Institut für Tierphysiologie.

Herrn Prof. Dr. T. Göbel gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die gute Betreuung, seine Ideen, seine konstruktive Kritik und die geduldige Unterstützung.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. B. Kaspers, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Allen Mitarbeitern, MTAs und Doktoranden am Institut für Tierphysiologie möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die stete und freundliche Hilfsbereitschaft danken.

Für die produktive Zusammenarbeit mit der Chirurgischen Tierklinik und dem Institut für Pathologie danke ich den dortigen Mitarbeitern, sowie Fr. Dr. C. Deeg, die ihre guten Kontakte zu diesen Instituten für mich eingesetzt hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Katzen und meiner Familie für die seelische Unterstützung und fleißiges Korrekturlesen.