

Monoklonale Antikörper (mAk) mit Spezifität für Zelloberflächenstrukturen sind wichtige Hilfsmittel für die Untersuchung der Pathophysiologie des Immunsystems bei Mensch und Tier. Differenzierungsantigene (CD = **cluster of differentiation**) stellen eine Untergruppe funktionell bedeutsamer Zelloberflächenstrukturen dar. Dieser Terminus wurde für eine Gruppe antigen wirksamer Plasmamembrankomponenten geprägt, deren Expression ein bestimmtes Differenzierungs-und/oder Funktionsstadium der Antigen-tragenden Zelle anzeigt. Im Gegensatz zum Menschen ist bisher nur eine vergleichsweise geringe Zahl mAk gegen Determinanten auf Leukozytensubpopulationen von Haustieren verfügbar. Bei Wiederkäuern, Pferden und Hunden sind daher bis heute nur wenige CD-homologe Strukturen definiert. Diese werden bei Rind, Schaf und Pferd als bovine CD (BoCD)-, ovine CD (OvCD)- beziehungsweise equine CD (EqCD)-Moleküle bezeichnet.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zum Nachweis von Differenzierungsantigenen auf hämatopoetischen Zellen des Rindes mit Hilfe monoklonaler Antikörper (mAk). Dazu wurden zwei monoklonale Antikörper Bo 42 (IgG<sub>3</sub>, kappa) und Bo 116 (IgM, kappa) näher charakterisiert.

Mittels indirekter Membranfluoreszenz und UV-mikroskopischer oder durchflußzytometrischer Auswertung wurde die Bindung der Antikörper an Oberflächenstrukturen auf peripheren mononukleären Zellen (MNC), Granulozyten (PMN), Erythrozyten und Thrombozyten der Spezies Rind, Schaf, Pferd, Hund und Mensch geprüft. Die Analyse der biochemischen Eigenschaften der von diesen Antikörpern erkannten Zelloberflächenstrukturen erfolgte mit der Immunoblot-Technik nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie mittels SDS-PAGE nach Präzipitation radioaktiv markierter Zellmembranproteine.

Der mAk Bo 42 reagierte ausschließlich mit Subpopulationen mononukleärer Zellen (MNC) von Rindern und Schafen sowie mit *Theileria annulata*-transformierten bovinen lymphoblastoiden Zellen (BoLCL). Eine Reaktion mit Granulozyten (PMN), Thrombozyten und Erythrozyten derselben Spezies war nicht nachweisbar. Der Antikörper reagierte nicht mit den peripheren Blutzellen von Mensch, Hund und Pferd. Das erkannte Epitop-tragende Molekül wurde im Immunoblot nach SDS-PAGE auf Membranproteinen von mononukleären (MNC) und lymphoblastoiden Zellen des Rindes (BoLCL) nachgewiesen. Es handelt sich um ein stark glykosiliertes Glykoprotein mit relativen Molekulargewichten (M<sub>r</sub>) von 220, 205 und 180-190 kD. Den Molekülen scheinen intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zu fehlen.

Die Antikörperavidität reichte nicht aus, um radioaktiv markierte Zelloberflächenmoleküle aus Lösungen zu präzipitieren.

Das Reaktionsmuster, die biochemischen Eigenschaften des erkannten Moleküls, sowie das Ergebnis einer umfangreichen vergleichenden Untersuchung mit über 180 Antikörpern im 2. BoCD-Workshop lassen darauf schließen, daß der mAk Bo 42 beim Rind und vermutlich auch beim Schaf Moleküle erkennt, die dem humanen CD45R entsprechen.

Mit dem mAk Bo 42 steht somit ein Antikörper zur Verfügung, mit dessen Hilfe eine weitergehende phänotypische und funktionelle Differenzierung boviner und oviner T-Lymphozyten möglich ist.

Das von dem mAk Bo 116 erkannte Antigen wird auf verschiedenen Zellpopulationen des peripheren Blutes von Rindern, Schafen und Menschen exprimiert. Auf hämatopoetischen Zellen von Pferden und Hunden war das Epitop nicht nachweisbar.

Das Reaktionsmuster des mAk Bo 116 mit bovinen, ovinen und humanen Blutzellen zeigte intra- und interspezies-spezifische Besonderheiten. Mit den Granulozyten aller Spezies reagierte der Antikörper monomorph. Während das Reaktionsmuster mit humanen Thrombozyten ebenfalls einen Monomorphismus aufwies, war die Reaktivität mit bovinen Thrombozyten polymorph. Auf ovinen Thrombozyten fehlte das Bo 116-bindende Epitop.

Ebenso wie der mAk Bo 42 reagierte der mAk Bo 116 mit verschiedenen *Theileria annulata*-transformierten bovinen lymphoblastoiden Zelllinien (BoLCL). Ein biochemischer Nachweis der von Bo116 erkannten Moleküle gelang nicht. Das Reaktionsverhalten läßt vermuten, daß es sich bei der erkannten Struktur um ein dem humanen CD31, CD15 oder CDw17 verwandten Molekül des Rindes handelt.

Mit Bo 116 liegt ein Antikörper vor, der nach Analysen im 2. BoCD-Workshop bislang einzigartig dasteht. Seine Reaktivität beschränkt sich auf Zellen der myelomonozytären Reihe und erlaubt daher deren weitergehende phänotypische und funktionelle Charakterisierung.

**K. Rönsch: Studies on leucocyte surface markers in cattle by means of monoclonal antibodies**

Monoclonal antibodies (mab) specific for cell surface structures are important tools for studying the pathophysiology of the immune system in humans as well as in animals.

Differentiation antigens (**CD = cluster of differentiation**) form a subgroup of functionally significant cell surface structures. The term was coined for a group of antigenic plasma membrane components, whose expression indicates a certain differential and/or functional stage of the antigen-carrying cell.

Contrary to the human system, only a limited library of monoclonal antibodies against rather few determinants on leucocyte subpopulations in domestic animals is available up to now. A relatively small number of molecules homologous to the human CD determinants has been defined in ruminants, horses and dogs. The molecules in cattle, sheep and horses are referred to as bovine CD (BoCD)-, ovine CD (OvCD)- or equine CD (EqCD)-antigens, respectively.

This thesis contributes to the characterization of differentiation antigens on haematopoietic cells in cattle by means of monoclonal antibodies. Two mabs were characterized in detail: **Bo 42** (IgG<sub>3</sub>, kappa) and **Bo 116** (IgM, kappa).

By means of indirect immunofluorescence staining and evaluation by fluorescence microscopy or flow cytometry (FACS) analysis, the binding of the antibodies to peripheral blood mononuclear cells (MNC), granulocytes (PMN), erythrocytes and platelets of cattle, sheep, horses, dogs and humans was investigated. Analysis of the biochemical properties of the detected molecules was performed using the immunoblot technique and by precipitation of radioactive labeled cellmembrane molecules.

The mab Bo 42 reacted exclusively with a subpopulation of freshly isolated peripheral mononuclear cells (MNC) of sheep and cattle and with *Theileria annulata* transformed subpopulations of bovine lymphoid cells. No reactivity was seen with granulocytes, platelets or erythrocytes. The mab Bo 42 was nonreactive with human, canine or equine cells. The recognized epitope was detected on membrane proteins of bovine mononuclear and lymphoblastoid cells by means of immunoblotting. The target structure of Bo 42 seems to be a heavy glycosylated protein with a relative molecular weight of 220, 200 and 180-190 kD, which apparently does not contain any inter- and intramolecular disulfide bonds. Antibody

avidity was not strong enough to precipitate solubilized radioactive labeled cell membrane proteins.

Reaction pattern, biochemical properties of the target molecule, and the comparison with other mabs during the 2. BoCD workshop indicate that Bo 42 recognizes the bovine and ovine homologue of the human CD45 molecule.

This antibody will allow further phenotypical differentiation and functional characterization of bovine and ovine T cell subpopulations.

The antigen detected by Bo 116 is expressed on subpopulations of blood cells of cattle, sheep and humans. It was not expressed on hematopoietic cells of horses and dogs.

The reaction pattern of Bo 116 with bovine, ovine and human cells showed remarkable intra- and interspecies differences. The antibody displayed a monomorphic reactivity pattern with granulocytes of all three species. Human thrombocytes were always positive, while the reactivity with bovine thrombocytes appeared to be polymorphic. Thrombocytes of all sheep donors tested were negative.

Similar to Bo 42, the mab Bo 116 reacted with several *Theileria annulata* transformed bovine lymphoblastoid cell lines (BoLCL). All attempts to characterize the biochemical properties of the target structure of Bo 116 failed.

However, the reaction pattern of Bo 116 shows some striking similarities to mabs specific for the human CD31, CD15 or CDw17. Bo 116 may therefore recognize a bovine homologue of one of these molecules.

On comparison with other mabs during the 2. BoCD workshop, Bo 116 showed unique features. Its reactivity is restricted to cells of the myelomonocytic lineage and thus will allow their extended phenotypic and functional characterization.