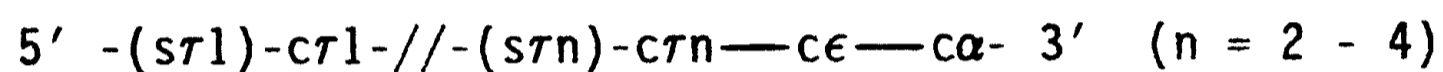


Für die Untersuchung des Immunglobulinsystems des Pferdes stehen bisher nur wenige geeignete Nachweisreagenzien und Referenzsubstanzen zur Verfügung. Auch ist die Organisation der Immunglobulingene für das Pferd noch nicht bekannt, so daß eine endgültige Bestimmung der Anzahl und die eindeutige Benennung der vorhandenen equinen Isotypen noch aussteht. Da in allen untersuchten Spezies verschiedene Isotypen für unterschiedliche Effektorfunktionen im Organismus verantwortlich sind, sind weiterführende grundlegende Kenntnisse über die equinen Immunglobuline notwendig, um eine bessere ätiologische und pathogenetische Abklärung von Erkrankungen beim Pferd, insbesondere Immundefekten, Autoaggressionserkrankungen und Allergien zu ermöglichen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden deshalb equine monoklonale Referenzantikörper hergestellt und charakterisiert. Dazu wurden durch Zellfusion von peripheren Blutlymphozyten vom Pferd mit der Maus Myelomlinie x63-Ag8.653 Heterohybridome erzeugt. Von den daraus entwickelten stabilen Heterohybridomlinien produzierten vier equines IgG (EqG1, EqG2, EqG3 und EqG4) und eine, die jedoch zur Zeit noch als instabil angesehen werden muß, equines IgM (EqM1). Bei sechs weiteren Heterohybridomlinien wurden leichte equine Immunglobulinketten ohne nachweisbare schwere Ketten gefunden (EqL1, EqL2, EqL3, EqL4, EqL5 und EqL6). Für die Charakterisierung equiner Immunglobuline in Zellkulturüberständen oder Lysaten von gewaschenen Heterohybridomzellen wurden verschiedene Formen von Sandwich-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) und Immunoblots nach SDS-PAGE (Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) mit verschiedenen kommerziell erhältlichen polyklonalen Anti-Pferde-Immunglobulin Antikörpern durchgeführt. Es besteht aber nur eine geringe Chance durch Zellfusion seltene Isotypen wie z.B. equines IgE zu erhalten. Zudem gibt es keine geeigneten Nachweisreagenzien, wie definierte monoklonale Antikörper oder Antisera, um seltene Isotypen zu erfassen.

Deshalb wurden im zweiten Teil der Arbeit erste Untersuchungen am equinen Igh-Locus, der die Gene für die schweren Ketten der Immunglobuline enthält,

durchgeführt. Dazu wurde Pferde DNA mit humanen und murinen DNA-Sonden für den Igh-Locus hybridisiert. Dabei konnten homologe Gene des Pferdes nachgewiesen werden: Beim Pferd kommen vermutlich mehrere (bis zu vier) konstante Gene für verschiedene IgG-Isotypen ($c\tau$ -Gene), sowie für eine schwere IgE- ($c\epsilon$ -Gen) und eine schwere IgA-Kette ($c\alpha$ -Gen) vor, die hintereinander auf einem DNA-Fragment liegen. Außerdem ergaben sich Hinweise auf Gene für die Switchregionen von $c\tau$ -Genen ($s\tau$ -Gene). In Anlehnung an die Organisation des Igh-Locus der Maus wurde daraus ein erstes hypothetisches und noch unvollständiges Modell für die Anordnung von Gensegmenten, die für den konstanten Bereich schwerer Immunglobulinketten codieren (c_H -Gene), sowie deren Switchregionen (s_H -Gene) im Bereich des Igh-Locus des Pferdes erstellt:



Nach genauerer Klärung des equinen Igh-Locus erscheint es anhand der hier durchgeführten Untersuchungen aussichtsreicher, seltene Immunglobulinisotypen, wie z.B. IgE, durch Gewinnung, Klonierung und Expression des equinen $c\epsilon$ -Gens, als durch weitere Zellfusionen zu gewinnen. Die bislang entwickelten monoklonalen equinen Immunglobulinisotypen sollen als Referenzsubstanzen, sowie zur Immunisierung und Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Pferdeimmunglobuline verwendet werden. Mit diesen dann eindeutig definierbaren equinen Immunglobulinisotypen können zuverlässige quantitative und funktionelle Untersuchungen bei Pferden durchgeführt werden.

7. SUMMARY

B. Wagner:

Investigation of the equine immunoglobulin system:

Generation and characterisation of monoclonal immunoglobulins and initial molecular analysis of genes encoding immunoglobulin heavy chains.

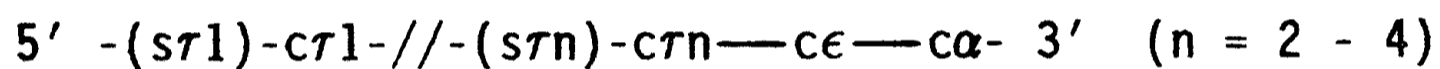
The lack of well defined immunoglobulin isotypes as reference material and of specific antibodies as detection reagents prohibits reliable diagnostic or functional investigations of the equine immunoglobulin system. Moreover, nothing is known about the number and organisation of immunoglobulin genes. Thus, it is presently impossible to number or designate equine immunoglobulin isotypes and to develop specific reagents. In all species investigated so far various immunoglobulin isotypes have been shown to differ considerably in their effector functions. In order to elucidate their role in physiological and pathological mechanisms, in particular in immunodeficiency, autoimmun or allergic diseases, in horses it is necessary to obtain more basic knowledge about the equine immunoglobulin system. This was approached by working on two topics.

The first topic comprised the generation and characterisation of equine monoclonal immunoglobulins. This was achieved by fusing peripheral blood lymphocytes from a healthy horse with the mouse myeloma line x63-Ag8.653 followed by limiting dilution cloning. Out of nine fusions several rather stable heterohybridoma lines were established. Four of them produced equine IgG (EqG1, EqG2, EqG3 and EqG4) and one, instable line equine IgM (EqM1). In six additional heterohybridoma clones only equine immunoglobulin light chains could be found without any detectable heavy chain (EqL1, EqL2, EqL3, EqL4, EqL5 and EqL6).

Various forms of sandwich enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) and immunoblotting upon sodiumdodecylsulfate-polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) applying commercially available polyvalent anti-horse-immunoglobulin antisera served as monitoring and analytical systems for characterization of equine immunoglobulins in cell culture supernatants or in lysates of washed heterohybridoma cells. Unfortunately this approach

provided little chance to generate and detect heterohybridomas producing rare isotypes such as IgE.

Therefore the second topic dealt with an initial analysis of the locus comprising the gene segments coding for equine immunoglobulin heavy chains (Igh-locus). Isolated horse DNA was hybridized with various human and mouse cDNA probes specific for distinct sequences of the Igh-locus. Several homologous DNA-fragments could be detected suggesting that up to four constant genes for different IgG-isotypes ($c\tau$ -genes) in addition to one gene for heavy IgE-chains ($c\epsilon$ -gen) plus one gene for heavy IgA-chains ($c\alpha$ -gen) might exist in horses. Moreover, there were units for up to four genes for switch regions of $c\tau$ -genes ($s\tau$ -genes). They seemed to be located on a single DNA-fragment. Thus, in analogy to the murine Igh-locus a preliminary model of the equine Igh-locus is proposed regarding the sequence of gene segments encoding the constant region of immunoglobulin heavy chains (c_H -genes) and some of their corresponding switch region genes (s_H -genes):



These results suggest that upon further analysis of the equine Igh-locus it might be more efficient to define and generate rare immunoglobulin isotypes such as IgE by isolation, cloning and expression of the relevant equine gene, e.g. the $c\epsilon$ -gene, than to pursue their isolation by unpredictable numbers of cell fusions.

The monoclonal equine immunoglobulins which have been generated up to now could be used as reference material as well as for immunization and generation of monoclonal antibodies against different equine immunoglobulin isotypes. These well defined reagents will then permit reliable quantitative and functional investigations of the role of different immunoglobulin isotypes in horses.