

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers (mAk), der gegen equines follikelstimulierendes Hormon (eFSH) generiert wurde.

Der Hintergrund für die Entwicklung eines mAk gegen eFSH lag in dem Fehlen von spezifischen homologen Radioimmunoassays (RIA) begründet. Die Bestimmung der eFSH-Serumkonzentration mit verschiedenen heterologen Meßsystemen birgt Unsicherheiten in sich, da das zirkulierende FSH nicht aus einer homogenen Gruppe von Glykoproteinen besteht, sondern eine Mikroheterogenität aufweist. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich in ihrer biologischen Aktivität und spiegeln im Verlauf des Zyklusgeschehens unterschiedliche reproduktive Stadien wider. Die Veränderungen des Isoformmusters können aber auch Ausdruck pathologischer Zustände sein. Die Erkennung der Isoformen durch unterschiedliche Antikörper ist variabel. Es erscheint daher notwendig, nicht nur eine quantitative Bewertung zu treffen, sondern mit geeigneten mAk auch eine qualitative Bestimmung durchzuführen.

Das zur Immunisierung verwendete Antigen wurde aus equinen Hypophysen isoliert, mit einer hydrophoben-Interaktions-Chromatographie (HIC) aufgetrennt und durch Geffiltration von Fremdproteinen getrennt. Die Immunisierung der Balb/c Mäuse erfolgte intraperitoneal über einen Zeitraum von 108 Tagen. Die aus der Milz der immunisierten Maus gewonnenen B-Lymphoblasten wurden mit NS-O-Zellen fusioniert. Es konnten 15 Hybridome, die Antikörper gegen equine Gonadotropine produzieren, etabliert werden. Von diesen Antikörper-produzierenden Hybridomen zeigten sechs eine Affinität für eLH, sieben für eLH und eFSH und zwei eine Affinität für eFSH.

Der mAk 1F12 zeichnete sich durch seine hohe Spezifität für eFSH aus. Der Antikörper zeigte in dem entwickelten RIA keine Kreuzreaktivität mit pFSH, hFSH, hLH, cLH, rLH, bLH und eLH an. Lediglich ovines LH kreuzreagierte zu 3,5% (relativ zum eFSH Referenz-Standard).

Der Einfluß der Markierung mit J<sup>125</sup> nach der Chloramin T Methode auf die Konformation der Glykoproteine konnte an eLH nachgewiesen werden. Nach der Markierung von eLH lag eine Kreuzreaktivität von 37,5% vor, im Gegensatz zu dem nativen eLH.

Bei der Überprüfung der Reaktivität mit den equinen Gonadotropinuntereinheiten zeigte der mAk nur eine Kreuzreaktivität mit der eCG $\alpha$ -Untereinheit von 12%, anzeigend, daß eine hohe Affinität für das intakte eFSH-Dimer vorliegt. Im Immunoblot konnte belegt werden, daß es sich bei der erkannten Determinante um ein Struktur-epitop handelt.

Der Gebrauch des mAk 1F12 wurde in dem entwickelten Radioimmunoassay bei der Bestimmung von Plasma eFSH validiert. Hierbei zeigte sich eine deutliche Differenzierung der Hormonkonzentrationen im Verlauf des Zyklusgeschehens von Stuten (n=4) und bei Hengsten (n=4) nach GnRH-Stimulation, die eine Beurteilung der Hormonwerte zuließ.

Der Vergleich des Verlaufs der gemessenen Hormonkonzentrationen nach GnRH-Stimulation zwischen dem homologen (mAk 1F12) und einem etablierten heterologen RIA, zeigte eine hochsignifikante Korrelation ( $r=0,919$ ,  $p<0,001$ ,  $n=29$ ).

Zwischen den im homologen (mAk 1F12) und heterologen RIA bestimmten Hormonkonzentrationen im Zyklus der Stuten (S) bestand ein signifikanter Zusammenhang (S1  $r=0,691$ ,  $p<0,001$ ; S2  $r=0,627$ ,  $p<0,001$ ; S3  $r=0,867$ ,  $p<0,001$ ; S4  $r=0,504$ ,  $p<0,01$ ). Eine Unterteilung des Zyklus in zwei Phasen (Phase I: Tag 0-10 und Phase II: Tag 11 bis Ende) zeigte eine differenzierte Messung der eFSH Konzentration durch die zwei Meßsysteme an. Zwischen den homolog und heterolog ermittelten Hormonwerten besteht in der Phase I eine höhere Korrelation (S1  $r=0,785$ ,  $p<0,005$ ; S2  $r=0,437$ , n.s.; S3  $r=0,974$ ,  $p<0,005$ ; S4  $r=0,736$ ,  $p<0,01$ ) als in der Phase II (S1  $r=0,658$ , n.s.; S2  $r=0,39$ , n.s.; S3  $r=0,528$ , n.s.; S4  $r=0,283$ , n.s.). Die Ursache hierfür wird auf die Veränderung des Isoformmusters im Zyklusverlauf zurückgeführt, die somit zu einer differenzierten Erkennung der Isoformen durch die zwei Antikörper führt.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, daß eine qualitative Variation des eFSH im zyklischen Geschehen mit dem homologen RIA (mAk 1F12) detektierbar ist. Dieses Ergebnis gibt den Anlaß für weitergehende Versuche in der Produktion von Isoform-spezifischen Antikörpern, die in der Lage sind, Veränderungen der Mikroheterogenität im Plasma von Pferden mit immunologischen Methoden nachzuweisen, so daß eine exaktere Aussage über den Reproduktionszustand ermöglicht wird.

Hendrik R. Froin

Production of monoclonal antibodies against equine follicle-stimulating hormone.

## 6. Summary

The present thesis describes the development and characterization of a monoclonal antibody (mab) generated against equine follicle-stimulating hormone (eFSH).

Equine follicle stimulating hormone consists of different isoforms which may vary in their biological activity. Changes in the isohormone patterns have been described within the ovarian cycle of the mare, and have been related to disturbances in equine reproduction.

Assays currently available for measuring eFSH are heterologous or homologous systems employing polyclonal antibodies and lack specificity and/or sensitivity.

So far no monoclonal antibodies have been described which specifically detect eFSH.

The aim of the present study was to establish a homologous radioimmunoassay (RIA) system for eFSH using specific eFSH monoclonal antibodies.

The antigen used for immunization, was isolated from equine pituitary glands and purified by hydrophobic interaction chromatography (HIC) and subsequent gel-filtration chromatography. Balb/c mice were immunized over a time span of 108 days by intraperitoneal injections with eFSH. The B-lymphoblasts collected from the immunized mice spleens were fused with NS-0-cells. Fifteen hybridomas producing mab against equine gonadotropins were established. Six of these mab producing hybridomas showed affinity for eLH only, seven for both eLH and eFSH, and two for eFSH only, one of which (mab 1F12) had high specificity for eFSH.

The RIA developed with this mab did not show crossreactivity with pFSH, hFSH, hLH, cLH, rLH, bLH or eLH, only oLH crossreacted with 3.5% relative to the reference standard.

Only the eCG $\alpha$ -subunit crossreacted (12%) with mab 1F12. The other intact or dissociated equine gonadotropins did not crossreact indicating a high affinity for intact eFSH. The immunoblot using mab 1F12 indicated that the recognized determinant consisted of a structural epitope.

Surprisingly  $^{125}\text{J}$ -labelled eLH showed 37.5% binding to mab 1F12, after the chloramin T iodinating procedure. As this binding could not be displaced by eLH but only by eFSH it is assumed that the labelling procedure had changed the eLH molecule to an artefact which was detected by the eFSH binding sites of mab 1F12.

Using the mab 1F12 a RIA procedure could be developed for the measurement of eFSH in equine plasma (sensitivity: 0.1 ng/ml, intraassay coefficient of variation: 2.4%, n=10).

The new assay was validated by following the established hormone patterns during the ovarian cycle of mares (n=4) and after GnRH challenge tests in stallions (n=4), and by comparing the data with those of an established heterologous FSH-RIA.

Highly significant correlations were found between the 2 assays for stallions ( $r=0.917$ ,  $p<0.001$ ,  $n=29$ ) and for the cycles of mares (m) (m1  $r=0.691$ ,  $p<0.001$ ; m2  $r=0.627$ ,  $p<0.001$ ; m3  $r=0.867$ ,  $p<0.001$ ; m4  $r=0.504$ ,  $p<0.01$ ).

Interestingly, a better correlation between the 2 assays was observed early in the cycle (days 1-10) than at later stages of the cycle (days 11-20), indicating a possible change of the eFSH isohormone patterns during the cycle.

This study shows that quantitative and qualitative variations of eFSH in the cyclic changes of mares and in stallions are detectable with the newly established homologous RIA. These results may give the basis for future experiments in the production of isoform-specific mab's able to detect changes of the microheterogeneity of eFSH in the plasma of horses allowing a more precise monitoring of their reproductive states.