

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, monoklonale Antikörper gegen Endothelzelloberflächenmoleküle zu produzieren. Dazu wurden mit Hilfe standardisierter Hybridomatechniken monoklonale Antikörper (MAk) produziert. Als Immunogen diente zum einen Ganzzellextrakt boviner *Corpora rubra* (ein Gewebe reich an angiogenen Endothelzellen) und des weiteren Zellmembranvesikel aktivierter/migrierender boviner Aortenendothelzellen (BAEC) *in vitro*. Überstande heranwachsender Hybridome wurden im vergleichenden Zell- oder Vesikel-ELISA an BAEC und fixierten Gefriergewebeschnitten boviner *Corpora rubra* auf ihre Bindungsfähigkeit an Endothelzellen (EC) getestet. Relevante Hybridome wurden basierend auf ihrer Endothelzellspezifität selektiert. Zur Untersuchung der Organexpression der durch diese MAk erkannten Antigene wurden immunhistologische Untersuchungen an folgenden Organen des Rindes durchgeführt: Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, Lunge, Niere, Aorta, Nabelarterie und -vene, Haut, Skelett- und Herzmuskulatur, Dünn- und Dickdarm, Kleinhirn, Ovar und Uterus.

Insgesamt wurden von 1288 getesteten Hybridomaüberständen 4 Hybridome (IgM 18A9F9, IgM 28C6G6, IgM 38G6D3 und IgM 48A11E10) aufgrund ihrer spezifischen Bindung an EC und ersten funktionellen Untersuchungen (Migrationsinhibitionstest an BAEC) selektiert.

Der MAk 18A9F9 identifiziert ein endothelzellspezifisches Molekül, welches mit Ausnahme der Niere, des Dunndarms und der Lebersinusoiden in jedem der oben aufgeführten Organe bovinen Ursprungs exprimiert wird. Im zyklischen *Corpus luteum* bindet er in den ersten vier Gelbkörperstadien (*Corpus haemorrhagicum*, *Corpus rubrum*, Blutegelkörper und Regressionsgelbkörper) an Gefäßendothelzellen. In vergleichenden zytochemischen Untersuchungen an kultivierten BAEC bindet der MAk 18A9F9 mit gleicher Intensität an ruhende/konfluente und migrierende/subkonfluente BAEC.

Der MAk 28C6G6 identifiziert ein endothelzellspezifisches Molekül, welches mit Ausnahme der Aorta, Nabelarterie und -vene, der Hautgefäße und der Gefäße des Dünn- und Dickdarms in den oben aufgeführten Organen bovinen Ursprungs exprimiert wird. Im zyklischen *Corpus luteum* bindet der MAk 28C6G6 im Blute-, Regressions- und Residualgelbkörper an

Gefäßendothelzellen Erste zytochemische Untersuchungen an kultivierten BAEC zeigen, daß der MAK 28C6G6 präferentiell an der Zelloberfläche migrierender/subkonfluenter BAEC bindet

Der MAK 38G6D3 identifiziert ein endothelzellspezifisches Molekul Vergleichende zytochemische Untersuchungen an kultivierten BAEC zeigen, daß der MAK 38G6D3 ausschließlich an migrierende und präferentiell an proliferierende BAEC bindet Eine Darstellung des durch den MAK 38G6D3 erkannten Antigens in Gefriergewebeschnitten des Rindes gelang nicht Erste funktionelle Untersuchungen ergeben, daß der MAK 38G6D3 die Endothelzellmigration *in vitro* eindeutig hemmt

Der MAK 48A11E10 identifiziert ein endothelzellspezifisches Molekul Die Organexpression dieses Antigens ist dem durch den MAK 28C6G6 erkannten Antigen sehr ähnlich (Ausnahme: Der MAK 48A11E10 bindet an die EC der Nierenglomerula und nicht an kapillare EC des Kleinhirns) Außerdem wird das durch den MAK 48A11E10 definierte Antigen nichtendothelial auf glatte Muskelzellen von Arterien und Arteriolen, sowie der *Lamua muscularis* von Dünn- und Dickdarm exprimiert Im zyklischen *Corpus luteum* bindet der MAK 48A11E10 in jedem Stadium an Gefäßendothelzellen, in den ersten drei Stadien (C H, C R und C L) ausschließlich an Kapillaren Zytochemische Untersuchungen an kultivierten BAEC zeigen, daß der MAK 48A11E10 präferentiell an migrierende Endothelzellen bindet, seine Antikörperbindung ist überwiegend in Kernnahe lokalisiert Außerdem bindet er an proliferierende BAEC Erste funktionelle Untersuchungen ergeben, daß der MAK 48A11E10 die Endothelzellmigration *in vitro* hemmt

Die vier monoklonalen Antikörper identifizieren endothelzellspezifische Zelloberflächenmolekule boviner EC Die Expressionsmuster der durch diese monoklonalen Antikörper erkannten Antigene und die Ergebnisse erster funktioneller Untersuchungen *in vitro* legen die Vermutung nahe, daß sie geeignete Werkzeuge darstellen, die Heterogenität von Endothelzellen weiter zu untersuchen

Gabriela Fabig

„Production and characterization of monoclonal antibodies against endothelial cell surface molecules“

6. SUMMARY

The goal of the present experiments was the production of monoclonal antibodies against endothelial specific surface molecules. A panel of monoclonal antibodies was generated by standard hybridoma techniques using either homogenates of bovine ovarian corpora rubra (a tissue rich in angiogenic endothelial cells) or cell membrane vesicles of cultured activated/migrating bovine aortic endothelial cells (BAEC) as an active antigen.

Hybridoma supernatants were screened for their binding to cryostat sections of corpora rubra and cultured endothelial cells (differential cell ELISA or vesicle ELISA). Relevant hybridomas were selected based on their endothelial cell specificity. The tissue distribution of the antigens identified by these monoclonal antibodies was determined by indirect immunohistochemistry. Stained tissues were lymph node, thymus, spleen, liver, lungs, kidney, aorta, umbilical artery and -vein, skin, skeletal- and heart muscle, small and large intestine, cerebellum, ovary and uterus.

Of 1288 screened hybridoma supernatants, 4 hybridomas (IgM 18A9F9, IgM 28C6G6, IgM 38G6D3 and IgM 48A11E10) were selected based on their binding specificity to endothelial cells and initial functional analysis *in vitro* (endothelial cell migration assay).

Mab 18A9F9 identifies an endothelial cell specific molecule that is constitutively expressed by endothelial cells in all bovine organs except kidney, small intestine and liver sinusoidal endothelium. The binding of Mab 18A9F9 to vascular endothelial cells in the cyclic corpus luteum is restricted to the corpus hemorrhagicum (C H), corpus rubrum (C R), corpus luteum

(C.L.) and the regressing C.L. In culture, the antibody binds to both resting/confluent and migrating/subconfluent BAEC

Mab 28C6G6 identifies an endothelial cell specific molecule that is constitutively expressed by endothelial cells in all bovine organs except the aorta, umbilical artery and vein, vascular endothelium of the skin, the small and large intestine. The binding of Mab 28C6G6 to vascular endothelial cells in the cyclic corpus luteum is restricted to the corpus luteum, regressing C.L. and residual C.L. In culture, the binding of the antibody is strongly upregulated by migrating/subconfluent BAEC compared to the binding to quiescent, resting BAEC

Mab 38G6D3 identifies an endothelial cell specific molecule. In culture, the antibody binds preferentially to migrating and proliferating endothelial cells. The corresponding antigen of Mab 38G6D3 is not detectable in cryostat sections of bovine organs. Initial functional experiments revealed an inhibition of endothelial cell migration by Mab 38G6D3

Mab 48A11E10 identifies an endothelial cell specific molecule. The organ expression of the corresponding antigen is similar to that of Mab 28C6G6 (exception Mab 48A11E10 binds to renal glomerular capillaries and not to endothelial cells of capillaries of the cerebellum). The antigen identified by Mab 48A11E10 is also expressed by smooth muscle cells of arteries, arterioles and the lamina muscularis mucosae of the small and large intestine. Mab 48A11E10 binds preferentially to endothelial cells of capillaries in the growing corpus luteum (C.H., C.R. and C.L.), but also to all vascular endothelial cells in the regressing C.L. and the residual C.L. In culture, Mab 48A11E10 binds preferentially to migrating and proliferating endothelial cells. Initial experiments revealed an inhibition of endothelial cell migration by Mab 48A11E10

The 4 monoclonal antibodies identify endothelial specific surface molecules of bovine endothelial cells. Expression pattern of the antigens identified by these antibodies and the results of initial functional studies *in vitro*, suggest that they may be useful tools to further study the heterogeneity of different endothelial cell populations