

## 6. Zusammenfassung

Kenntnisse über Regulationsvorgänge im Immunsystem, über Mechanismen der Interaktion zwischen Zellen und deren Bedeutung unter physiologischen wie pathologischen Bedingungen wachsen in dem Maß, in dem Komponenten des Immunsystems ausreichend genau und vollständig charakterisiert sind. Einen wesentlichen Teil dieser „Bestandteile“ stellt die große und heterogene Gruppe der Differenzierungsantigene (CD-Moleküle, *cluster of differentiation*) unter den Zelloberflächenmolekülen auf Leukozyten dar. Der Nachweis ihrer Expression und Expressionsdichte erlaubt weitgehende Aussagen über Art, Differenzierungsgrad und Funktionszustand von Zellen des Immunsystems. Ihre Bedeutung für das Verstehen von Immunmechanismen, neben der reinen Identifizierung zellulärer Subpopulationen, macht es unabdingbar, sie auch für veterinärmedizinisch wichtige Spezies, wie dem Hund, möglichst umfangreich zu erfassen. Nicht zuletzt macht man sich Antikörper gegen solche Strukturen in der Diagnostik, Prognose und der Therapie verschiedener Erkrankungen zunutze. Dabei stehen derzeit jedoch nur 12 definierte canine CD-Moleküle weit über 166 humanen CD-Determinanten gegenüber.

Um zu einem erweiterten und verbesserten Nachweis caniner CD-Moleküle zu gelangen, wurden in dieser Arbeit hunde- ( $n=19$ ), rinder- ( $n=308$ ) und schweinespezifische monoklonale Antikörper ( $n=164$ ) auf ihre Reaktion mit caninen Leukozyten des peripheren Blutes untersucht. Die Bindungsanalysen erstreckten sich zudem auf zwei canine Zelllinien (MDCK, DH82) und auf *in vitro* stimulierte canine mononukleäre Zellen, um Aussagen über die (Nicht-) Identität mehrerer mAk mit gleicher nomineller Spezifität zu erhalten. Über die Prüfung auf *in vitro* stimulierten Zellen sollten zudem aktivierungsabhängig neu oder differentiell exprimierte Zelloberflächenstrukturen erfaßt werden.

Das für den Hund geeignetste *in vitro* Mitogen stellte Concanavalin A (Con A) dar. Basierend auf durchflußzytometrischen Mehrparameteranalysen induzierte Con A deutlich mehr vitale, blastisch transformierte Zellen nach 3-tägiger *in vitro* Kultur verglichen mit Pokeweed Mitogen (PWM) und Phytohämagglutinin (PHA). Con A wurde infolgedessen für die Prüfung aktivierungsabhängig exprimierter Antigene als Stimulus für canine mononukleäre Zellen eingesetzt.

Die durchflußzytometrische Prüfung der mAk nach indirekter Membranimmunfluoreszenz ließ die Reaktivität der hundespezifischen CD4-, CD8-, CD5- und Thy-1-(CD90) reaktiven mAk als plausibel erscheinen. Hingegen wiesen mAk mit nomineller Spezifität für das canine CD45R und CDw41 Unterschiede im Reaktionsverhalten auf, die ihre Spezifität fraglich erscheinen lassen.

Von den insgesamt 472 geprüften rinder- und schweinespezifischen mAk erwiesen sich etwa 10% ( $n=48$ ) als kreuzreaktiv mit caninen Leukozyten. Unter anderem befanden sich dar-

unter Antikörper gegen bovine und porcine CD-Strukturen, für die noch kein Homolog im caninen System definiert wurde (CD1w2, CD14, CD22, wCD29 und CD81) sowie gegen rinder- (WC9) und schweinespezifische Determinanten (SWC7, SWC8), für die keine homologe Struktur im humanen System existiert. Mit Hilfe dieser mAk erweitert sich der derzeit mögliche Nachweis caniner CD-Moleküle beträchtlich.

Einen anwendungsbezogenen Aspekt dieser Studie stellte die Prüfung aller in dieser Untersuchung charakterisierten hundereaktiven mAk auf Knochenmarkszellen (KMZ) von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) dar, um die mögliche differentialdiagnostische Aussagekraft dieser Untersuchungsform beim Hund zu beleuchten.

Bereits durchflußzytometrische, morphologische Analysen der KMZ belegten a) Unterschiede zwischen ALL- und gesunden Patienten einerseits und b) Unterschiede innerhalb der ALL-Patientengruppe.

Basierend auf charakteristischen mAk-Reaktivitäten (hier vor allem der kreuzreaktiven mAk) mit KMZ konnten vorwiegend ALL-Patienten näher differenziert werden. Ein Patient wies tentativ eine T-Zell-ALL und eine weitere eine B-Zell-ALL auf. Eine genauere Zuordnung zu bestimmten Zellentwicklungsstufen war nicht möglich, da beim Hund das differenzierungsabhängige Expressionsmuster der verschiedenen Antigene noch unbekannt ist.

In der Summe konnten in der vorliegenden Arbeit eine Vielzahl monoklonaler Antikörper zum Nachweis caniner Differenzierungsantigene charakterisiert werden. Sie erlauben in Zukunft einen verbesserten und erweiterten Nachweis dieser Zelloberflächenstrukturen in der Spezies Hund, dessen Wert in ersten vorläufigen Studien an Knochenmarkszellen von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie geprüft wurde.

## 7. Summary

### Anja Alexandra Beer: A contribution to the characterization of differentiation antigens on canine leukocytes

Knowledge about regulatory process within the immune system, about mechanisms of cellular interactions and their relevance under physiological and pathological conditions increases inasmuch as components of the immune system are characterized. An important part of these components is formed by the large and heterogeneous group of differentiation antigens (CD molecules, *cluster of differentiation*) as leukocyte surface structures. The demonstration of their expression and their expression density permits far-reaching conclusions concerning the differentiation and the functional status of immune cells. Based on their relevance for the understanding of immune mechanisms - besides the mere identification of cellular subpopulations - it is essential to characterize even those differentiation antigens of species important in veterinary medicine, like the dog, as extensively as possible. At present, however, only 12 defined canine CD molecules are facing more than 166 human CD determinants.

In this study; numerous monoclonal antibodies (mAb) specific for the canine (n=19), bovine (n=308) and porcine (n=164) were tested for reactivity with canine peripheral blood leukocytes in order to extend and to improve the detection of canine CD molecules. Binding analyses were further extended to canine cell lines (MDCK, DH82) and to *in vitro* stimulated canine mononuclear cells in order to acquire information about the (non-) identity of several mAb with the same nominal specificity. In addition, testing mAb on *in vitro* stimulated cells covered those cell surface structures which are differentially or newly expressed upon cellular activation.

Concanavalin A (Con A) proved to be the most suitable *in vitro* mitogen for the dog. Based on flow cytometrical multiparameter analyses Con A induced far more blast transformed cells after 3 days *in vitro* as compared with pokeweed mitogen (PWM) and phytohemagglutinin (PHA). Therefore, Con A was used as stimulus for canine mononuclear cells for the testing of antigens expressed upon activation.

The binding pattern of the mAb nominally specific for canine CD4-, CD8-, CD5- and Thy-1 (CD90) seemed plausible as tested by flow cytometry after indirect membrane immunofluorescence. However, several mAb with nominal specificity for canine CD45R and CDw41 displayed differences in their reaction pattern rendering their specificity questionable.

A total of 48 (10%) out of 472 tested bovine and porcine specific mAb proved to be cross reactive with canine leukocytes. Among others these included mAb against bovine and porci-

ne CD structures for which no homologue in the canine system has been defined yet (CD1w2, CD14, CD22, wCD29, and CD81) and against bovine (WC9) and porcine specific determinants (SWC7, SWC8) for which there is no homologous structure in the human system. With the aid of these mAb the possibilities for the detection of canine CD molecules are extended considerably.

One practical aspect of this study was to test all previously characterized canine reactive mAb on bone marrow cells (BMNC) of patients with acute lymphatic leukemia (ALL) as a potential diagnostic tool in dogs.

Already, flow cytometric, morphological analyses of BMC have supplied evidence for a) differences between ALL-patient and healthy individuals and b) differences within the ALL patient group.

Based upon characteristic mAb reactivities (mostly the cross reactive ones) with BMC, ALL patients could be further differentiated (one patient with T-cell ALL and another with a B-cell ALL). A more precise assignment to distinct cellular developmental stages was not possible, because the differentiation dependent expression pattern of antigens is still unknown in the dog.

In this work, a large panel of monoclonal antibodies reactive with canine differentiation antigens was characterized. In the future these mAb will allow an improved and increased detection of these cell surface structures in the canine species. This aspect was tested in preliminary studies with bone marrow cells of patients with lymphatic leukemia.