

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen equines follikelstimulierendes Hormon beschrieben. Die produzierten eFSH-spezifischen Antikörper und der bereits existierende monoklonale Antikörper 1F12 wurden zur Messung von FSH beim Pferd mit einem homologen ELISA eingesetzt.

Grundlage für die Antikörperproduktion und die Assayentwicklung war, daß ein homologer ELISA zur Messung von Serum-FSH beim Pferd bisher nicht verfügbar war. Bei der Konzentrationsbestimmung mit verschiedenen heterologen Systemen besteht das Problem, daß das zirkulierende FSH nicht aus einer homogenen Gruppe besteht, sondern ein Spektrum verschiedener Isoformen aufweist. Diese Mikroheterogenität variiert je nach Reproduktionsstatus des Tieres und kann sich auch bei pathologischen Zuständen ändern. Bei der Konzentrationsbestimmung mit heterologen Meßsystemen besteht daher das Problem, daß es zur Diskriminierung einzelner Isoformen kommen kann, die dann nicht gemessen werden können, da sie sich in ihrer biologischen Aktivität und ihrer Bindungsaffinität zum verwendeten Antikörper unterscheiden. Es bestand daher die Notwendigkeit, monoklonale Antikörper gegen eFSH herzustellen, um dieser Diskriminierung bei der Hormonzentrationsbestimmung entgegenzuwirken und um neben einer quantitativen auch eine qualitative Bestimmung durchzuführen.

Die Immunisierung der Balb/c Mäuse erfolgte mit intaktem eFSH, das aus equinen Hypophysen isoliert wurde. Die aus der Milz gewonnenen B-Lymphozyten wurden mit NS-O-Zellen fusioniert. Insgesamt konnten 10 Hybridome etabliert werden, die Antikörper gegen equine Gonadotropine produzieren. Davon zeigten vier (10F1, 9G4, 8D3 und 2E11) eine Affinität für eFSH, sechs konnten nicht zwischen eFSH und eLH differenzieren. Bei der Immunglobulinisotypenbestimmung zeigte sich, daß nur die vier eFSH-spezifischen Antikörper monoklonale Antikörper der Immunglobulinklasse G<sub>1</sub> sind. Bei den anderen sechs konnte nur IgM oder mehrere Immunglobulinklassen nachgewiesen werden.

Die eFSH-spezifischen mAk wurden auf serumfreie Produktion umgestellt und anschließend durch Ultrafiltration konzentriert und mittels Gelfiltration gereinigt.

Die so aufbereiteten Antikörper wurden im Immunoassay eingesetzt. Bei der Verwendung als Fängerantikörper zur Messung von eFSH mit dem mAk 1F12 als Nachweisantikörper war eine Konzentrationsbestimmung nicht möglich.

Die produzierten Antikörper 10F1, 9G4 und 8D3 wurden, ebenso wie der bereits existierende mAk 1F12, für den Einsatz als Nachweisantikörper im ELISA biotinyliert. Die Biotinylierung gelang bei 1F12 und 10F1. Die eFSH-Konzentrationsbestimmung in Serumproben aus Zyklen von Stuten mit dem biotinylierten 10F1 als Nachweisantikörper erbrachte keine Werte, die mit denen anderer Meßsysteme vergleichbar sind. Dabei kann eine Kreuzreaktivität mit eTSH als Ursache vermutet werden.

Im Gegensatz dazu konnte der Gebrauch des biotinylierten mAk 1F12 in dem entwickelten ELISA bei der Bestimmung von zirkulierendem eFSH validiert werden. Im Verlauf des Zyklusgeschehens von Stuten (n=3) und bei Hengsten (n=6) nach GnRH-Stimulation zeigte sich eine deutliche Differenzierung der Hormonkonzentrationen, die eine Beurteilung der FSH-Werte zuließ. Der Vergleich der gemessenen Hormonkonzentrationen mit einem heterologen RIA zeigte einen signifikanten Zusammenhang. Vereinzelt ist ein divergierender Kurvenverlauf im Vergleich heterologer RIA / homologer ELISA festzustellen. Die Ursache dafür kann eine Veränderung des Isoformenmusters von FSH im Zyklusverlauf bzw. nach GnRH-Stimulation sein, was zu einer differenzierten Erkennung der Isoformen in den beiden Assaysystemen führt.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, daß mit dem biotinylierten mAk 1F12 eine FSH-Konzentrationsbestimmung im ELISA möglich ist. Eine qualitative Variation des FSH-Isoformenmusters im Serum von Pferden ist mit dem homologen ELISA (mAk 1F12) detektierbar.

Auch die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten mAk sind eFSH-spezifisch, und ein Einsatz zur qualitativen eFSH-Bestimmung scheint nach weiterer Charakterisierung und entsprechender Modifikation des Assaysystems möglich.

Durch den Einsatz der vorhandenen mAk und die Produktion weiterer mAk gegen eFSH können somit Veränderungen der Mikroheterogenität nachgewiesen werden, so daß exaktere Aussagen über den Reproduktionsstatus und eventuell vorliegende pathologische Veränderungen gemacht werden können

Anja Pankatz

Monoclonal antibodies against equine follicle-stimulating hormone: production and use in immunoassay

## 6. Summary

In the present study the production of monoclonal antibodies (mab) against equine follicle-stimulating hormone is described. The produced eFSH-specific antibodies and the already existing antibody 1F12 were used for the measurement of FSH in the horse with a homologous ELISA.

Basis for the antibody production and the development of an assay was the deficit of a homologous ELISA for the measurement of equine serum-FSH.

Circulating FSH does not consist of a homologous group. It shows a spectrum of different isoforms which is a problem for measuring eFSH-concentrations with different heterologous systems. This microheterogeneity varies according to the reproductive state of the animal and can also change in pathological situations. That causes problems in measuring FSH-concentrations with heterologous assay systems.

A discrimination of some isoforms is possible which cannot be measured, because they differ in their biological activity and binding affinity to the used antibody. Therefore it is necessary to produce mab against eFSH to counteract this discrimination in determination of hormone concentrations and to carry out a qualitative besides the quantitative determination.

Balb/c mice were immunized with intact eFSH isolated from equine pituitaries. The B-Lymphocytes collected from the mice spleen were fused with NS-O-cells. Ten hybridomas producing mab against equine gonadotropins were established. Four of them (10F1, 9G4, 8D3 and 2E11) showed an affinity to eFSH, six could not differentiate between eFSH and eLH. The determination of the immunoglobuline isotypes showed that only the four eFSH-specific antibodies are mab of the

immunoglobuline class G<sub>1</sub>. In the other six only IgM or several Ig-classes were detected

The eFSH-specific mab were switched over to serumfree production and then concentrated with ultrafiltration and cleaned with gelfiltration

The prepared mab were used in the immunoassay. While using them as first antibody with the biotinylated mab 1F12 as second antibody, no measurement of FSH was possible

The produced antibodies 10F1, 9G4, 8D3 and the already existing mab 1F12 were biotinylated for using them in the ELISA. The biotinylation was successful for 10F1 and 1F12. The determination of the FSH-concentrations in serum from cyclic mares with biotinylated 10F1 as second antibody adduced no values which could be compared with other assay systems. Crossreactivity with eTSH may be the reason for that

The use of biotinylated 1F12 in the developed ELISA was validated for measurement of circulating FSH. During the ovarian cycle of mares (n=3) and after GnRh challenge tests in stallions (n=6) a clear differentiation of the hormone concentrations was shown which allowed the assessment of the FSH-values. A significant correlation was found by comparing the results with the data of a heterologous RIA.

Sporadically the curves comparing heterologous RIA / homologous ELISA showed a diverging course. The reason for this finding may be the changing isoform spectrum during the cycle and after GnRH challenge which leads to a different recognition of the isoforms in the two assay systems.

This study shows that FSH-concentrations are detectable with biotinylated mab 1F12 in an ELISA-system. Also qualitative variations of the FSH-isoforms in horse serum are detectable with this homologous ELISA (mab 1F12).

The mab produced in the present study are eFSH-specific and their use for qualitative measurement of eFSH-concentrations seems to be possible after further characterisation of the antibodies and modification of the assay system.

Differences in the microheterogeneity can be detected by the use of existing and the production of further more mab against eFSH. More precise informations about the reproductive state and perhaps existing pathological alterations are possible.