

VI. SUMMARY

Analysis of monoclonal antibody cross-reactivity with leukocytes from equids and cloning of CD28

Monoclonal antibodies identifying leukocyte antigens are highly important tools for studying equine leukocyte biology. The rationale of the present study was to provide domestic and wild equine immunology with new antibodies to leukocyte markers filling gaps of available reagents and establish a leukocyte tool-box for some members of family *Equidae*. To achieve the target, a large panel of mostly commercially available anti-leukocyte mAbs was analyzed for reactivity with equid leukocytes and cell lines.

Analysis of 534 mAbs demonstrated for 31 mAbs a clear positive reactivity, for 2 mAbs a weak positive reactivity; for 23 mAbs a positive "+"; but possibly valuable staining; for 15 mAbs an alternate expression pattern from that expected from human immunology; for 6 mAbs a questionable staining; for 45 mAbs a weak-positive reactivity and alternate expression pattern, and 356 mAbs remained negative. In 53 cases, more appropriate target cells, such as thymocytes or bone marrow stem cells, were not available for screening. Positive mAbs were directed against CD2, CD5, CD11a, CD11b, CD14, CD18, CD21, CD34, CD44, CD45, CD49d, CD68, CD83, CD91, CD163, CD172a, CD206, CD283, MHCI, MHCII, and canine B cell molecule.

22 mAbs spanning 16 different CD antigens were analyzed with Somali wild ass (*Equus africanus somalicus*), Grevy's zebra (*Equus grevyi*), and Hartmann's mountain zebra (*Equus zebra hartmannae*) leukocytes using one colour flow cytometry. Most but not all mAbs cross reacted with the three species. Cross-reactive mAbs analyzed at this part of the study may be considered the basis to establish an immune tool-box for these wild equids but require further analysis.

In addition, a broad panel of mAbs predominantly reactive with equine PBMC were applied on equine cell lines (EqT8888 and eCAS). A limited number of these mAbs reacted positively with the equine cell lines. Based on the obtained data, eCAS may represent a very early stage of a myeloid cell line and EqT8888 may be a B cell lymphoma.

Analysis of CD28 was performed for some members of the order *Perissodactyla*, including three members of family *Equidae*: Somali wild ass, Hartmann's mountain zebra, and Grevy's zebra. In addition, a member of family *Rhinocerotidae*, the Greater one-horned rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) was included beside the Asian elephant (*Elephas maximus*)

representing order *Proboscidae*, family *Elephantidae* and members of order *Artiodactyla*, family *Bovidae*, such as European bison (*Bison bonasus*) and African Buffalo (*Syncerus caffer*) and one member of family *Giraffidae*, Nubian Giraffe (*Giraffa camelopardalis*). Comparison of CD28 aa sequence revealed a high degree of interspecies conservation with aa identity ranging from 68-99%. Animal sequences were more closely related between each other than to humans and mice represented the out-group. 18 aa mismatches between equids and human were detected in the extracellular domain and could explain the inability of six human CD28 specific clones to stain horse leukocytes.

Anti-human polyclonals were used as another tool to detect important equine CD antigens like CD28 and CD25 to which none of the submitted mAbs were positive with horse leukocytes. The anti-human CD28 polyclonal Ab detected a protein likely to be EqCD28 on a small population of lymphocytes in flow cytometry only, but precipitated it as two proteins of 57 and 46 kDa from surface biotinylated horse lymphocytes. Cloning and expression of EqCD28 in insect cells also resulted in two proteins of 57 and 46 kDa. Equine CD25 expression was detected using a goat anti-human IL-2R α polyclonal antibody in flow cytometry. In addition, equine CD25 was immunoprecipitated using this Ab as a molecule of approximately 55 kDa molecular weight which is analogous to human CD25.

Although just a few mAbs were positive on equine cells (31/534), the approach may be considered useful, especially as their specificity has been resolved in this study. In addition, this study supports the use of highly purified anti-human polyclonal antibodies as an alternative approach in the analysis of equine leukocyte if their cross-reactivity can be confirmed and background signals eliminated.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Analyse der Kreuzreaktivität monoklonaler Antikörper mit Leukozyten von Equiden und Klonierung von CD28

Monoklonale Antikörper (mAk), die Leukozyten Antigene identifizieren sind wichtig um die Biologie von equinen Leukozyten studieren zu können. Das Ziel dieser Studie war es, neue Antikörper, die sich als Marker für equine Leukozyten eignen, zu etablieren, um vorhandene Lücken in dem schon bestehenden Sortiment der equinen Immunologie zu füllen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein großes Feld von weitgehend kommerziell erhältlichen anti-Leukozyten mAk auf ihre Reaktionsfähigkeit mit equinen Leukozyten und Zelllinien untersucht.

534 mAk wurden untersucht, davon zeigten 31 mAk eine deutliche positive Reaktion, 2 mAk eine schwach positive Reaktion; 23 mAk eine positive, möglicherweise anwendbare Färbung; 15 mAk ein anderes Expressionsmuster als aus der human Immunologie erwartet. Für 6 mAk zeigte sich eine fragwürdige Färbung, für 45 mAk eine schwach positive Reaktion und abweichendes Expressionsmuster und 356 mAk blieben negativ. In 53 Fällen standen geeignete Zielzellen, wie Thymozyten oder Stammzellen nicht zur Verfügung. Positive mAk waren gegen CD2, CD5, CD11a, CD14, CD18, CD21, CD34, CD44, CD45, CD49d, CD68, CD83, CD91, CD163, CD172a, CD206, CD283, MHCI, MHCII, und ein canines B Zell Molekül gerichtet.

22 mAk, die 16 unterschiedliche CD Antigene umfassten, wurden auf Leukozyten von Somali Wild Esel (*Equus africanus somalicus*), Grevy's Zebra (*Equus grevyi*), und Hartmann's Zebra (*Equus zebra hartmannae*) mittels Durchflusszytometrie getestet. Die meisten Antikörper haben mit den drei Spezies kreuzreagiert. Die in diesem Teil der Studie untersuchten mAk können als Basis für die immunologische Untersuchung dieser wilden Equiden dienen. Sie benötigen aber weitergehende Untersuchungen um die Ergebnisse zu bestätigen.

Zusätzlich wurde eine breite Auswahl von mAk, die zumeist mit equinen PBMC reagiert haben, auf equinen Zelllinien (EqT8888 und eCAS) getestet. Eine geringe Zahl dieser mAk zeigte eine positive Reaktion auf diesen. Basierend auf den erhaltenen Daten wäre es möglich dass eCAS einem sehr frühen Stadium einer myeloiden Zelllinie entspricht und EqT8888 der eines B-Zell Lymphoms.

Die Analyse von CD28 wurde bei einigen Tieren der Ordnung Perissodactyla, einschließlich dreier Mitglieder der Familie *Equidae*, Somali Wild Esel, Hartmann's Zebra, und Grevy's

Zebra durchgeführt. Zusätzlich wurde das Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*) als ein Angehöriger der Familie *Rhinocerotidae* einbezogen. Weiterhin wurden ein asiatischer Elefant (*Elephas maximus*) als Vertreter der Ordnung *Proboscidae*, Familie *Elephantidae*, ein europäisches Bison (*Bison bonasus*) und ein afrikanischer Büffel (*Syncerus caffer*) der Ordnung *Artiodactyla*, Familie *Bovidae* und eine Nubische Giraffe (*Giraffa camelopardalis*) als Angehörige der Familie Giraffidae einbezogen. Der Vergleich von CD28 Aminosäure Sequenz zeigte eine hohe Identität zwischen den Aminosäuren (68-99%) der einzelnen Spezies. Das Unvermögen der sechs human-spezifischen CD28 Ak-Klone, Pferde-Leukozyten zu färben, lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass 18 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne abweichen. Die verschiedenen tier-spezifischen Sequenzen zeigten untereinander eine größere Ähnlichkeit als zur humanen oder Maussequenz, letztere bildete die Außengruppe.

Polyklonale anti-humane AK wurden als ein weiteres Werkzeug eingesetzt, um andere wesentliche CD-Antigene wie CD28 und CD25 nachzuweisen, da keiner der bereits getesteten mAk mit den Pferde Leukozyten reagiert hatte. Der polyklonale anti-humane CD28 Ak konnte ein Protein, welches wahrscheinlich EqCD28 ist, auf einer kleinen Population der Lymphozyten mittels Durchflusszytometer nachweisen, präzipitierte aber in zwei Proteine der Größe von 57 kDa und 46 kDa von der Oberfläche biotinylierter Pferde Lymphozyten. Die Klonierung und Expression von CD28 in Insektenzellen ergab ebenfalls zwei Proteine von 57 und 46kDa. Die Expression von CD25 wurde mittels einem polyklonalen Ziege anti-human IL-2R alpha Ak im Durchflusszytometer nachgewiesen. Zusätzlich wurde equines CD25 als ein Molekül mit dem ungefähren Gewicht von 55kDa mittels Immunpräzipitation dargestellt, analog zu dem humanen CD25.

Obwohl nur einige der monoklonalen Antikörper (31/534) auf equinen Zellen positiv reagiert haben, kann dieser Ansatz als wertvoll erachtet werden, vor allem da ihre Spezifität in dieser Studie geklärt wurde. Weiterhin, unterstützt diese Studie die Verwendung von gereinigten anti-human polyklonalen Ak als einen alternativen Ansatz für die Analyse equiner Leukozyten, sofern ihre Kreuzreaktivität bestätigt werden kann und Hintergrund-Signale eliminiert werden können.