

ZÁRÓJELENTÉS

Összefoglaló

A pályázat révén jelentősen bővítettük a szarvasmarha FcRn (bFcRn) szerepéről alkotott ismereteinket arról hogyan szabályozza ez a receptor az IgG homeosztázisát. Egyik legfontosabb eredményünknek tartjuk, hogy tisztáztuk a bFcRn szerepét tőgy IgG transzport folyamatában. Felületi plazmon rezonancia elemzéseinkkel kimutattuk, hogy a receptor lényegesen nagyobb affinitással kötődik a bovin IgG2, mint az IgG1 izotípushoz. A tejmirigyben kifejeződő bFcRn transzgenikus egerek elemzésével pedig megállapítottuk, hogy a nagyobb mértékű receptor kifejeződés jelentősen növeli az állatok szérum IgG szintjét, és csak kismértékben a tej IgG koncentrációját. E két megfigyelés alapján kijelenthető, hogy a bFcRn a tőgyben nem az IgG1-et szekretálja, hanem az IgG2-t juttatja vissza a keringésbe, megakadályozza ennek az izotípusnak a tejbe történő kiürülését. Szarvasmarhában végzett IgG kiürülési vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a bFcRn aktívan közreműködik az IgG lebomlásának szabályozásában. A bFcRn-t faj-specifikus, test szerte kifejeződő transzgenikus egerekben végzett elemzéseink kimutatták, hogy az FcRn kifejeződésének fokozása csökkenti az IgG lebomlását és immunizálást követően fokozza az antigén specifikus B limfociták termelődését. Ennek köszönhetően ezeknek az állatoknak az antigén specifikus ellenanyag termelése lényegesen meghaladja a hagyományos állatokét. Ez utóbbi felismerés gazdasági hasznosítására a kutatók létrehozták az ImmunoGenes Kft-et (www.immunogenes.com).

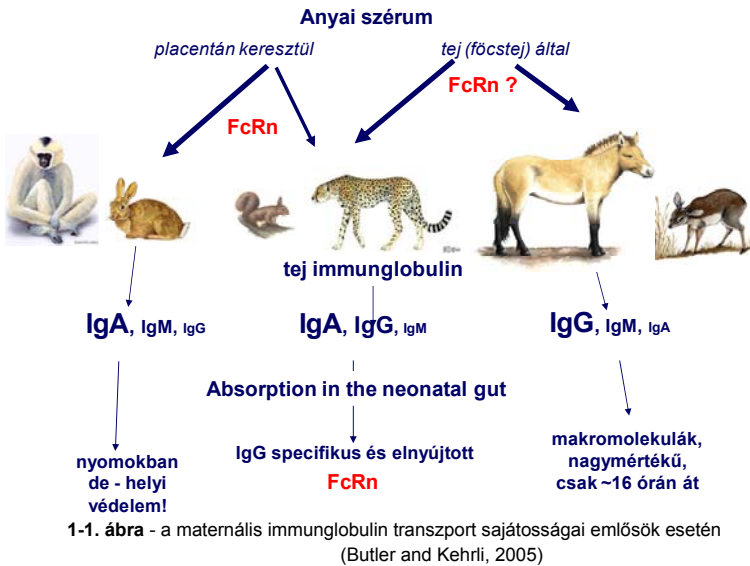
Summary

In the frame of this grant, we significantly extended our knowledge about the role of the bovine FcRn (bFcRn) in the IgG homeostasis. One of our most important results was to clarify the role of this receptor in the IgG transport during colostrum formation. By using surface plasmon resonance assay, we could show that the FcRn binds to bovine IgG2 at a much higher affinity as compared to the IgG1 isotype. Transgenic mice that express bFcRn exclusively in their mammary gland during lactation showed significantly higher serum IgG level, while the IgG concentration in the milk was only slightly increased. Based on these two observations, we concluded that the bFcRn recycles IgG2 to the blood from the mammary gland, instead of secreting IgG1 into colostrums/milk. Results on IgG clearance studies in cattle showed that the bFcRn plays an important role in IgG protection regulating its catabolism. Our other transgenic mice that express the bFcRn in species specific mode throughout the body showed reduced IgG catabolism and enhanced antigen specific B cell production upon immunization. Due to these two effects the antigen specific antibody production is significantly improved in these animals. Based on this latter observation researchers founded ImmunoGenes Kft (www.immunogenes.com) to execute a plan towards creating a profitable company.

1. Bevezetés

Ismeretes, hogy a neonatális Fc receptor (FcRn) szerepet játszik az IgG molekulák intra- és transzcelluláris szállításában az epithelsejteken keresztül, illetve megvédi az IgG és albumin molekulákat a gyors lebomlástól. Ez egyben magyarázza e két esszenciális fehérje kiemelkedően hosszú szérumbeli fél-életidejét is (Roopenian and Akilesh, 2007).

Bár a humán és a rágcsálók FcRn mediált folyamatait számos ponton tisztázták, fontos hangsúlyoznunk, hogy az IgG homeosztázisával kapcsolatban a kérődzők és egyéb háziállatok,



valamint a humán, ill. rágcsálók között alapvető különbségek vannak. Ezek közé tartozik a maternális IgG transzport, amely a patásokban kizárólag az ellést követő órákban a kolosztrum révén valósul meg, míg az ember esetén szinte kizárólag a placentán keresztül jut át az anyai keringésből a magzatba. A rágcsálók, húsevők esetén ez a folyamat részben a magzati élet során, részben azt követően a főcstej közvetítésével valósul meg. A rágcsálókban végzett és a humán vizsgálatok rámutattak arra, hogy a maternális IgG transzportjában az FcRn fontos

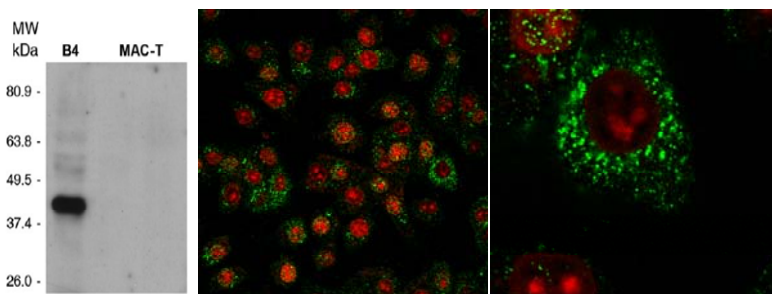
szereppel bír, így a humán placentában, a rágcsálók szízcacsoksejtjeiben biztosítja a prenatalis IgG átvitelt, illetve újszülött rágcsálók vékonybél enterocitáiban ez a receptor felelős a tejben lévő IgG keringésbe juttatásában. Egérben végzett vizsgálatok alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a rágcsálók tejmirigyében kifejeződő FcRn a tejmirigy hámsejtjeibe került IgG-t a keringésbe juttatja vissza, azaz nem a tejbe történő IgG szekréciót támogatja, hanem a keringő IgG kiürülését gátolja (Ward and Ober, 2009) (1-1. ábra).

E kérdés vizsgálatának állatorvosi, állattenyésztési (Godden, 2008), sőt humán terápiás jelentősége vitathatatlan (Hammarstrom and Weiner, 2008; Kacskovics, 2003). Korábbi vizsgálataink során klónoztuk és karakterizáltuk a szarvasmarha, birka, sertés FcRn-t (Kacskovics et al., 2000; Mayer et al., 2002; Zhao et al., 2003) és különböző, az IgG szekrécióban résztvevő epithel sejten mutattuk ki e gén expresszióját (tüdő, újszülött vékonybél, emlőmirigy) (Mayer et al., 2005; Mayer et al., 2004). E vizsgálatok révén feltételeztük, hogy a kérődzők tejmirigyében kifejeződő receptor – ellentétben a rágcsálókkal - az IgG szekrécióban vesz részt (Kacskovics, 2004). Mindazonáltal a receptor funkcionális szerepének igazolását korábban nem volt lehetőségünk elvégezni, így a szóban forgó pályázatban ezt a kérdést tudományos adatokkal kiegészítve terveztük megválaszolni.

Nem volt ismert az sem, hogy a szarvasmarha esetében az IgG katabolikus folyamataiban részt vesz-e, illetve milyen módon ez a receptor. További fontos kérdésként merült fel, hogy milyen módon szabályozódik a receptor kifejeződése az érintett sejtekben. Pályázatunkban tehát a szarvasmarha FcRn (bFcRn) IgG-homeosztázisban betöltött szerepét terveztük - több oldalról is - részletesen elemezni.

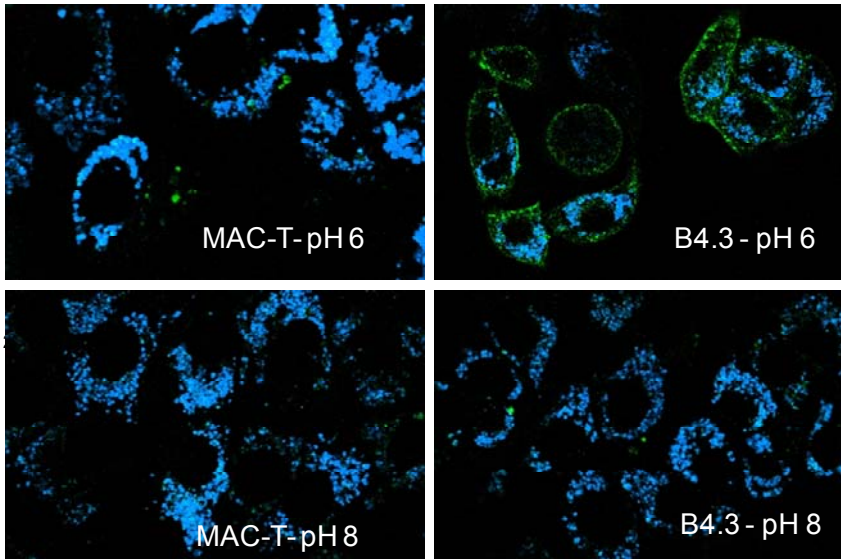
2. *In vitro* elemzések az FcRn transzepitheliális transzport és génextpressziójával kapcsolatban

a) az FcRn lokalizációjával, funkciójával kapcsolatos eredmények



2-1. ábra – az FcRn intracelluláris vezikulumokban lokalizálódik (nyúl anti-FcRn detekció)

A bFcRn epithel sejtekben történő lokalizációjának és funkciójának elemzéséhez kezdetben a korábban előállított nyúl anti-FcRn poliklonális reagensünket (Mayer et al., 2004) alkalmaztuk a szintén általunk előállított bFcRn-t magas szinten kifejező B4 sejteken, amelyeket MAC-T (tőgyhám-sejtvonal) CMV-bFcRn konstrukcióval transzfektáltunk, majd egy stabil klónt G418 szelekciót követően megőriztünk (B4.3). Megállapítottuk, hogy a sejtekben a receptor főként intracelluláris vezikulumokban lokalizálódik (2-1. ábra) és így nem mutat eltérést a humán, ill. rágcsálók epithelsejtjeivel összehasonlítva.



2-2. ábra – Az IgG nem kerül be a tőgyepithel sejtek lizoszómáiba. A MAC-T és a bFcRn-t nagymértékben kifejező B4.3 (MAC-T deriváns) sejtek pH dependens IgG (zöld) felvétele látható. (Az ábrán a lizoszómákat a kék színű LysoTracker-el jelöltük).

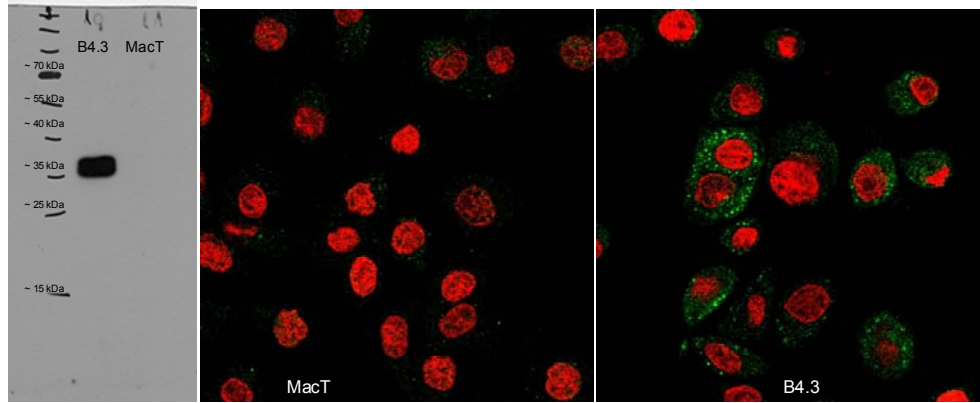
Az elemzést konfokális mikroszkóppal végeztük. Megállapítottuk, hogy az IgG valóban nem kerül be a sejtek lizoszómáiba, amiért feltételezhetően az FcRn felelős (az FcRn detektálását ugyanebben a sejtben technikai okok miatt nem tudtuk egy időben elvégezni).

A receptor detektálásához célszerű volt egy további ellenanyagot is előállítanunk, hiszen a korábbi nyúlból származó reagens fokozatosan vesztett aktivitásából, valamint a mennyisége is folyamatosan csökkent. Az új ellenanyag előállításához csirkét immunizáltunk rekombináns módon termeltetett (Baculovírus rendszer; CalTech) bFcRn molekulával. A csirke IgY előnye, hogy nem kötődik az emlős Fc receptorokhoz, azaz nem kell számolnunk a korábbi években többször zavaró hatásként megjelenő nem-specifikus reakcióval. Az immunizált 4 állat közül az egyik jelentős titerben termelt FcRn specifikus ellenanyagot, amelyet vérből, ill. a továbbiakban tojásból tisztítottunk. A tojásból tisztított reagens még 1:10.000-szeres hígításban is kiválóan működik (2-4. ábra), amit további vizsgálatainkban tervezünk felhasználni.

A bFcRn epithel sejtekben történő lokalizációjának és funkciójának elemzéséhez kezdetben a korábban előállított nyúl anti-FcRn poliklonális reagensünket (Mayer et al., 2004) alkalmaztuk a szintén általunk előállított bFcRn-t magas szinten kifejező B4 sejteken, amelyeket MAC-T (tőgyhám-sejtvonal) CMV-bFcRn konstrukcióval transzfektáltunk, majd egy stabil klónt G418 szelekciót követően megőriztünk (B4.3).

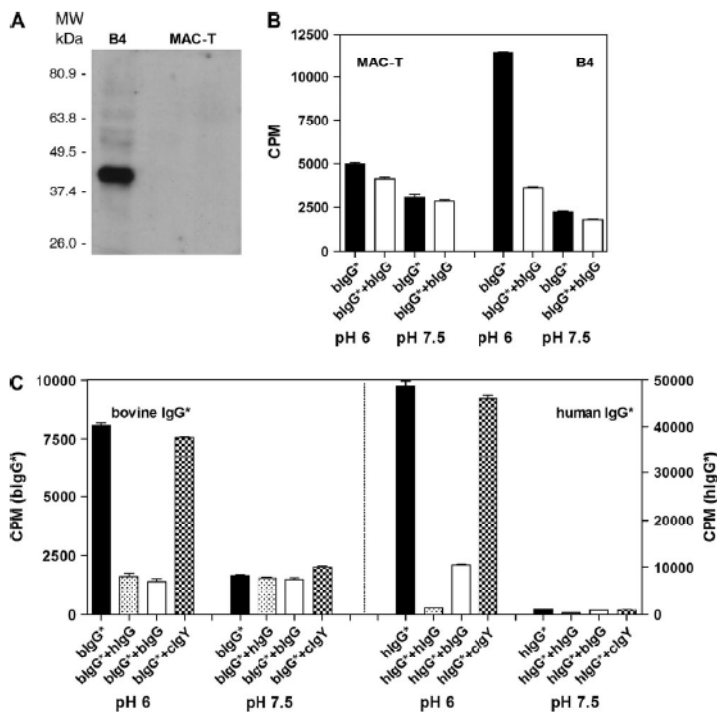
A továbbiakban ellenőriztük, hogy az IgG kötés a sejtekben pH dependensen zajlik (az FcRn-IgG kapcsolódás pH 6 értéken történik) valamint azt, hogy az IgG molekulák bekerülnek-e a lizoszómába (az FcRn ez ellen védi az IgG-t). Ennek érdekében fluoreszcen jelölt IgG-t adtunk a B4.3 sejtekhez és pH6 ill. pH8 közegű médiumban inkubáltuk őket. Ezt követően vizsgáltuk az IgG lokalizációját,

illetve ugyanezen sejtekben egy speciális markerrel (LysoTracker) jelöltük a



2-4. ábra – a (rekombináns) bFcRn specifikus csirke poliklonális ellenanyag (IgY) Western blotban és immuncitokémiai vizsgálat során is nagy érzékenységgel jelöli a bFcRn molekulát

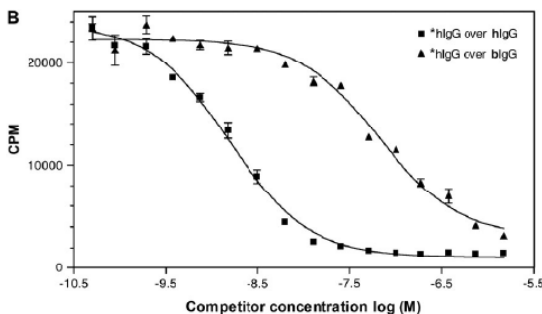
b) az FcRn pH dependens kapcsolódása bovin és humán IgG molekulákkal



2-5. ábra – In vitro radioreceptor assay, amelyben a bovin FcRn bovin és human IgG molekulák interakciójának elemzését végeztük el.

Vizsgálataink következő lépéseként elemeztük a bFcRn transzfektált sejtek IgG megkötését, illetve felvételét. A radiojóddal jelölt bovin és humán IgG molekulákat a B4 sejtek jelentős mértékben, míg az alapexpresszióval rendelkező MAC-T sejtek kis mértékben vették fel pH6 értéken. Ugyanakkor pH7.5 értéken a sejtek csak minimális IgG felvételt mutattak. Megállapíthattuk azt is, hogy a sejtek lényegesen nagyobb mértékben kötötték a humán IgG-t, a bovin IgG felvételével összehasonlítva. A csirke IgY-t nem vették fel a sejtek, azok a tehát nem kapcsolódnak a bovin FcRn-hez (2-5. ábra).

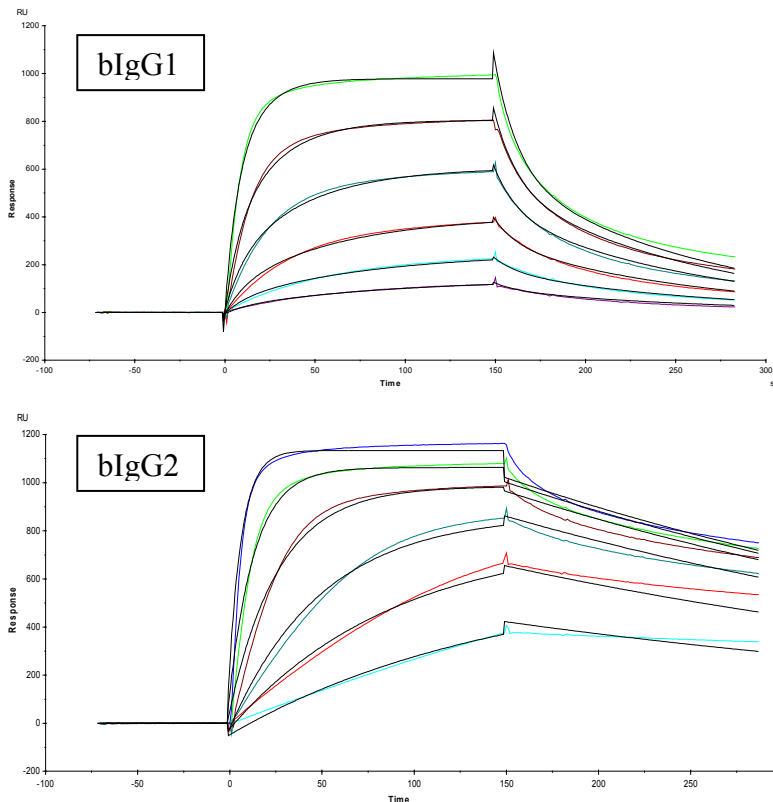
A bFcRn és a bovin ill. humán IgG interakcióját tovább elemeztük a már leírt sejtmodellben kompetitív felvételi vizsgálattal, valamint az ún felületi plazmon rezonancia (SPR) méréssel (első lépésként a bFcRn nehéz és könnyű-láncát egy Baculovírus rendszerben kifejeztettük; ld. fenn), az SPR mérést Pamela Bjorkman munkacsoportjával (CalTech, USA) együttműködve végeztük. Elemzéseink kimutatták, hogy a bFcRn sokkal erősebb kötéssel kapcsolódik a humán IgG, mint a bovin IgG molekulához (2-6. ábra) (Kacs Kovics et al., 2006).



	Immobilized bFcRn				Immobilized hFcRn			
	K_{D1} (nM)	f_1 (%)	K_{D2} (nM)	f_2 (%)	K_{D1} (nM)	f_1 (%)	K_{D2} (nM)	f_2 (%)
Bovine IgG	2.0	89	380	11	430	43	4600	57
Human IgG	0.45	98	130	2	4.9	65	650	35

2-6. ábra – a bFcRn interakciója a bovin és human IgG molekulákkal (A) in vitro felvételi rendszerben (B) és felületi plazmon rezonancia (SPR) elemzéssel

c) a bFcRn pH dependens kapcsolódásának jellemzése a bovin IgG1 és IgG2 molekulákkal (SPR)



2-7. ábra – a bFcRn interakciója a bIgG1 és bIgG2 molekulákkal. Az IgG2 nagyobb affinitással kötődik a bFcRn-hez, mint az IgG1.

Mivel a kolosztrumban (sőt a tejben is) a bovin IgG1 mennyisége lényegesen meghaladja a bovin IgG2 mennyiségét, régóta feltételezik, hogy a tögyben IgG1-et szekretáló receptor – hipotézisek szerint az FcRn – lényegesen erősebben köti az IgG1, mint az IgG2 molekulát. E kérdés eldöntésére a közelmúltban végeztünk SPR vizsgálatokat Shin-ichiro Nishimura munkacsoportjával (Hokkaido University, Sapporo, Japan).

Eredményeink egyértelműen jelzik, hogy az IgG2 mintegy 6-25-ször erősebben kötődik az FcRn-hez, mint az IgG1. Ennek az eredménynek igen nagy jelentősége van, hiszen ennek alapján elmondhatjuk, hogy a bovin FcRn a tögyben visszatartja az IgG2 molekulákat a kiürüléstől, nem pedig szekretálja az IgG1-t.

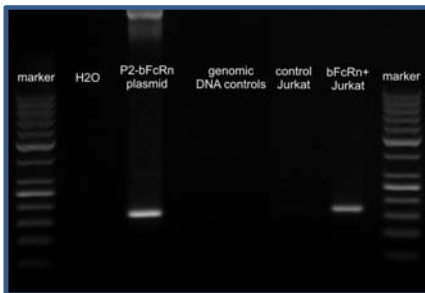
Ez az eredményünk jól támasztja alá in vivo transzgenikus egérmodellünkben kapott adatainkat és az azokból levont következtetéseinket (ld. 3.b. fejezet). Elmondható tehát, hogy valamennyi eddig vizsgált fajban a tejmirigyben kifejeződő FcRn megakadályozza a hozzá erősebben kapcsolódni képes IgG molekulák tejbe irányuló transzportját.

d) az FcRn szerepe a transzepithelialis IgG transzportban

Egy másik vizsgálat sorozatunkban az epithel sejtek transzcelluláris transzport elemzését terveztük. Ehhez olyan sejtmodellt kívántunk létrehozni, amelyben az FcRn lokalizációját és az IgG transzepithelialis transzportját elemezhetjük. A makromolekulák sejten keresztüli transzportjának in vitro vizsgálatát (transcytosis assay) ún. „transwell” rendszerben terveztük elvégezni. Ebben a formában a sejttenyészet apicalis és basolateralis oldala a tenyésztőedény elkülönült rekesze felé néz. E rendszer feltétele, hogy a membránra tenyésztett sejtek a teljes konfluencia elérése után, a makromolekulák számára átjárhatatlan „monolayer”-t képezzenek. Ehhez elengedhetetlen, hogy a sejtek között funkcionálisan ép „tight junction” típusú sejt-kapcsoló struktúrák jöjjenek létre, ugyanis csak ezek gátolják meg hatékonyan a makromolekulák intercellularis diffúzióját. Fontos továbbá, hogy a sejtek érésük során polarizálódjanak, azaz speciális apicalis ill. basolateralis oldallal rendelkezzenek. E tulajdonságok meglétét a sejtek transzepithelialis elektromos ellenállás (TER) változásának mérésével, ill. félvékony metszetben és transzmissziós elektronmikroszkóp technikával ellenőrizzük. Tekintettel arra, hogy a vizsgálati célkitűzéseinknek leginkább megfelelőnek tűnő szarvasmarha tögyepithel sejt vonal (MAC-T) nem alkalmas a transzport vizsgálatokra (tenyészetben több sejtrétegben nő, a sejtek közötti szoros kapcsolat, ún. „tight-junction” nem alakul ki, ill. nem válik polarizálttá, ld. korábbi OTKA jelentéseink), kísérleteinkben többször is megkíséreltünk egy szarvasmarha vesehámsejt vonalat (MDBK) transzfektálni a

szarvasmarha FcRn-t tartalmazó konstrukcióval. A korábbi években sikerrel használt pCI-neo eukarióta konstrukció (G418 szelekciót biztosít) azonban nem vezetett eredményre. Ezt követően egy új konstrukciót állítottunk elő, amely hygromicin rezisztenciát biztosít (pcDNA3.1/Hygro). Kísérleteink azonban többszöri próbálkozás ellenére ismételen elakadtak.

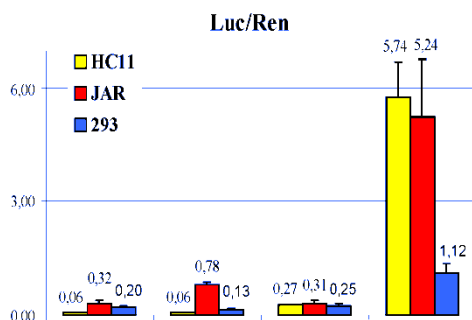
Egy további megoldási kísérletként, Dr. Kvell Krisztián és Dr. Czömpöly Tamás közreműködésével (Pécsi Tudományegyetem, Immunbiotechnológiai Tanszék, illetve ImmunoGenomikai Kft) lentivírus konstrukciót állítottunk elő, amely az irodalom alapján lényegesen hatékonyabb transzdukciót tesz lehetővé. Ezt a munkafázist összekapcsoltuk a szóban forgó pályázathoz kapcsolódóan elnyert OTKA nemzetközi pályázata (IN71293) keretében végzett munkával, amelynek célja az volt, hogy a bFcRn túltermelés hatását a kiskérődző juhban is ellenőrizzük, ill. a kérődzőkre jellemző kérdésekben – főgy IgG szekréció – pontosítsuk. Kutatásainkat ennek alapján egy kollaborációs együttműködés keretében a Roslin Intézettel közösen valósítottuk meg, és míg a nemzetközi pályázat valódi célja az volt, hogy ún. lentivírus transzgenézis (tg) révén bFcRn-t túltermelő juhokat hozzunk létre és ezeket az állatokat elemezzük (együttműködés Dr. Bruce Whitelaw és Dr. Simon Lillico - Division of Gene Function and Development, Roslin Institute, Edinburgh, UK; és erről sikeres zárójelentésben számoltunk be), addig a szóban forgó pályázatban a sejtbeli folyamatokat kívántuk ezzel a technikával nyomon követni.



2-8. ábra – a bFcRn lentivírus konstrukcióval fertőzött kontroll human sejtek cDNS / PCR elemzése

A létrehozott bFcRn lentivírus konstrukcióval sejteket fertőztünk és bennük a bFcRn mRNS/cDNS kifejeződést kimutattuk (2-8. ábra), addig a fehérjeszintű elemzéseink (Western blot) sajnos kudarcot vallottak. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy a bFcRn saját promotere nem bizonyult elegendő erősségűnek a gén fehérjeszintű detektálhatósága szempontjából. Mindezek alapján ezt a kísérleti irányt lezártuk és az amúgy is hitelesebb eredményt nyújtó *in vivo* vizsgálatainkra koncentráltunk.

e) az FcRn génexpressziójának elemzése

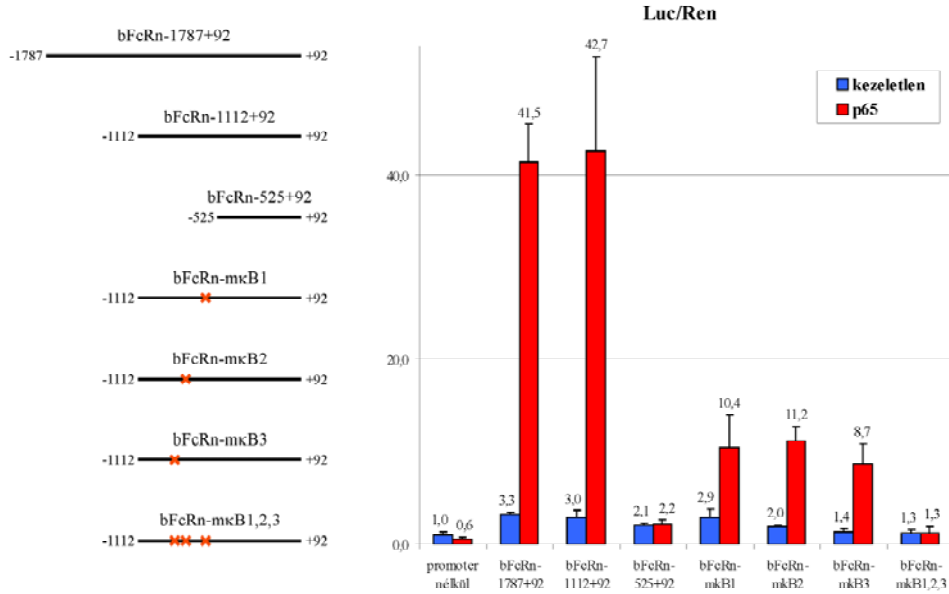


2-9. ábra – a bovin FcRn promotor tartalmazó luciferáz vektor érzékenyen reagál az NFkB transzkripciós faktorra.

Bár a génexpresszió szabályozása több szinten valósul meg, ezek egyik legfontosabb része a transzkripciós szabályozás. A humán FcRn nehéz lánc (hFcRn) promotor szekvenciáját korábban már meghatározták, a szarvasmarha FcRn nehéz lánc (bFcRn) genomikus szekvenciáját, és ezáltal a promotert (-1802 bp) a közelmúltban izoláltuk és elemeztük (Doleschall et al., 2005). A transzkripciós elemzésekhez különböző hosszúságú hFcRn és bFcRn promotor-luciferáz riporter gének expressziós vektorokat állítottunk elő, amelyeket transzkripciós faktort expresszáló konstrukciókkal együtt különböző

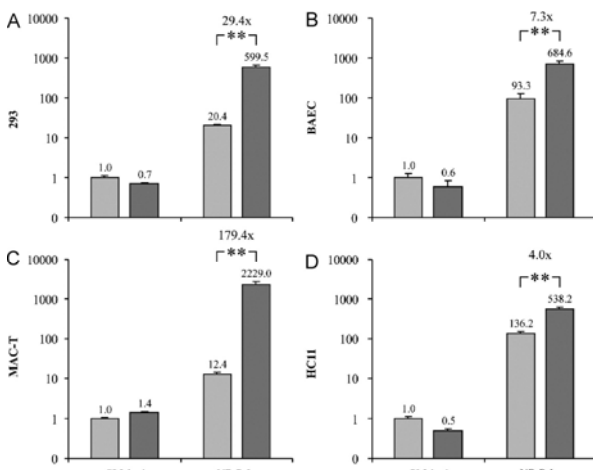
sejtvonalakba transzfektáltuk, majd a sejtek luciferáz aktivitását Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega) technikával mértük. A szekvencia elemzés kapcsán megállapítottuk, hogy a promotor nagy valószínűséggel NFkB transzkripciós faktor kötőhellyel rendelkezik, amit több sejtvonalban is validáltunk (2-9. ábra).

A lehetséges NFkB kötőhelyek kötőképességét a megfelelő konstrukciókban PCR alapú site-directed mutagenézissel töröltük, így a promoterek indukálhatósága csökkent vagy megszűnt (2-10. ábra).



2-10. ábra – a bFcRn promotor NFκB transzkripciós faktorral történő elemzése Dual-luciferáz rendszerben (HC11 egér emlősejtel sejtvonalban). A promotor három NFκB transzkripciós factor kötőhelyet tartalmaz, amelyek egyenként kimutálása csökkenti az aktiváció hatékonyságát, illetve egyszerre történő valamennyi deletálása teljesen megszünteti azt.

A funkcionálisan aktív kötőhelyeknek, és azok mutált változatainak kötőképességét Electrophoretic Mobility Shift Assay technikával (EMSA) is teszteltük.

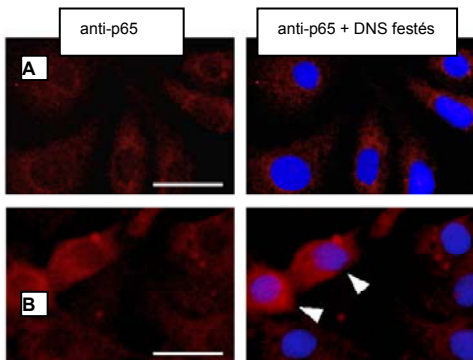


2-11. ábra – a bovin p65 aktivációt közvetítő hatásának elemzése különböző sejttípusban (bovin tőgy epithel sejtvonal: MAC-T ill. primer bovin endothel sejt: BAEC) Dual-luciferáz rendszert alkalmazva.

A vizsgálatok szarvasmarha-specifikusságának megteremtése érdekében klónoztuk és karakterizáltuk a szarvasmarha NFκB legfontosabb alegységét. Megállapítottuk, hogy a fajra jellemző eltérések mellett jelentős mértékű homológiát mutat – különös tekintettel a Rel homológia és transzaktiváló doménekre – a többi emlősfajjal összehasonlítva. A klónozott gén expresszálo vektorba integráltuk és luciferáz rendszerben (2-11. ábra) és immuncitokémiai módszerrel ellenőriztük funkcionális épségét (2-12. ábra) (Doleschall et al., 2007).

Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a szarvasmarha FcRn expresszióját egy, a fertőzés és gyulladások szempontjából kiemelt jelentőségű

transzkripciós mechanizmus befolyásolja. Hasonló megállapításra jutott az a kutatócsoport, amely a humán FcRn génexpresszióját elemezte (Liu et al., 2007). E vizsgálatok fiziológiai-patofiziológiai validálását *in vivo* kísérletekben kívánjuk a továbbiakban megerősíteni.

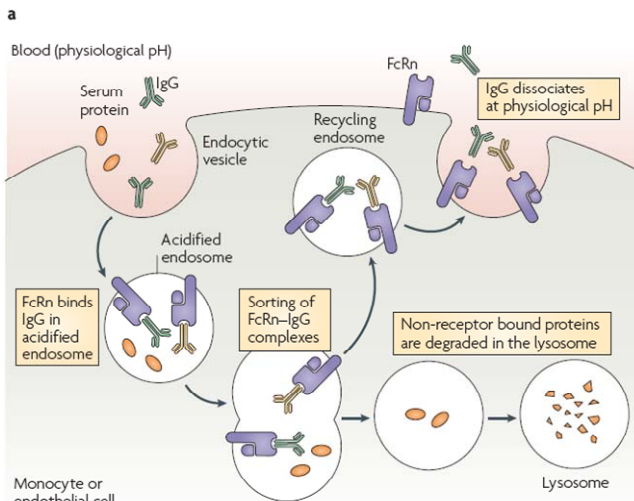


2-12. ábra – bovin p65 transzkripciós factorral történő transzfekció. A. nem-transzfektált MAC-T sejtek; B. transzfektált MAC-T sejtek – masszív p65 nukleáris lokalizáció (fehér nyilak). A p65 fehérjét anti-p65 ellenanyaggal detektáltuk, míg a sejtmagot egy DNS festéssel (Hoechst 33342) jelöltük.

3. *In vivo* elemzések

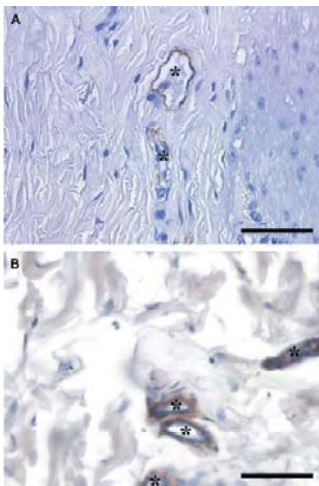
a) IgG katabolizmus vizsgálata szarvasmarhában

A maternális immuntranszport és az IgG katabolizmus folyamatainak biztosítását ugyanaz



3-1. ábra – az FcRn megakadályozza az IgG lebomlását az endothel sejtekben és monocitákban

a receptor – FcRn – valósítja meg, amely az evolúció során e két funkcióhoz rendkívüli mértékben adaptálódott. Amint erre korábban utaltunk, a receptor az epithelsejtek mellett az erek endothelsejtjeiben is kifejeződik, ahol az IgG (és albumin) lebomlását szabályozza. Mindkét sejtípusban a sejtek legtöbbször nem-specifikus pinocitózissal veszik fel a makromolekulákat, amelyek ezt követően az endoszómákba illetve a lizoszómákba kerülnek, és ott az alacsony kémhatás mellett, enzimek révén lebomlanak. A sejtbe került IgG molekula ebből a szempontból kivételnek számít. Amennyiben a sejt FcRn molekulát expresszál, az IgG a korai endoszómális vezikulumokban enyhén acidikus kémhatás mellett specifikusan kapcsolódik a receptorral, és a továbbiakban – az intracelluláris lebomlást elkerülve – transzcitózissal a sejt ellenoldalára kerül (epithelsejt), vagy visszajut a keringésbe (endothelsejt, monocita) (3-1. ábra). (Roopenian and Akilesh, 2007).

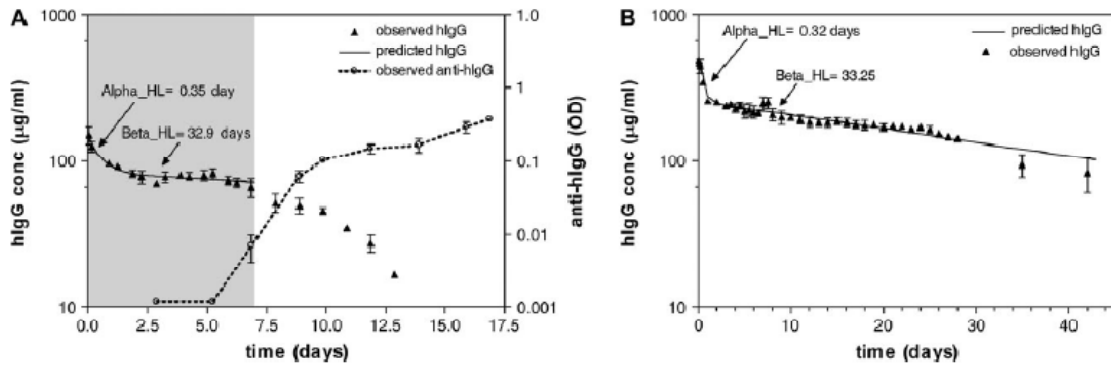


3-2. ábra – bFcRn kimutatása vékonybél és bőr kapilláris endothel sejteiben immunohisztokémiai vizsgálattal (nyúl anti-FcRn pAb)

Az endothelsejtek, monociták FcRn expresszióját egérben és emberben is igazolták, illetve szoros összefüggést mutattak ki az IgG - FcRn kapcsolódás erőssége, valamint az IgG vérbeli felezési ideje között. Ezt a kérdést azonban gazdasági haszonállatokban, így a kérődzőkben, korábban nem vizsgálták. Kísérletünk első fázisában RT-PCR módszerrel kimutattuk a bFcRn kifejeződését egy szarvasmarha endothel sejtvonalban (BAEC). Ezt követően elemeztük a különböző szövetek endothel sejteinek FcRn expresszióját immunohisztokémiai módszerrel. Elemzéseink kimutatták, hogy a szarvasmarha kapilláris endothel sejtek is kifejezik a bFcRn-t (3-2. ábra), illetve FcRn expressziót detektáltunk a vese tubulus sejteiben is (Kacskovics et al., 2006).

Az endothel sejten expresszálódó FcRn IgG katabolizmusában betöltött szerepét *in vivo* kísérletben is vizsgáltuk. Minthogy a bFcRn nagyobb affinitással köti a humán, mint a bovin IgG-t (ld. 2.b. fejezet) a kísérleti állatokban első lépésként a humán IgG lebomlását elemeztük (az állatokba fecskendezett humán IgG vérbeli koncentrációját egy ELISA módszerrel könnyen nyomon követhetjük). Hipotézisünk helytállósága esetén a humán IgG felezési ideje hosszabbnak bizonyul, mint a szarvasmarha immunoglobuliné tekintettel arra, hogy a humán IgG nagyobb eséllyel (affinitással) kapcsolódik a bFcRn-hez. (Az irodalmi adatok alapján a bovin IgG kiürülése kb. 16-20 nap felezési idővel jellemezhető.) Negatív kontrollként megvizsgáltuk a csirke IgY molekulájának felezési idejét is, tekintettel arra, hogy ez az immunoglobulin, *in vitro* receptor kötési vizsgálataink alapján nem kapcsolódik a szarvasmarha FcRn molekulához.

Vizsgálatainkat először a SZIE, ÁOTK, Nagyállat Klinikáján végeztük el úgy, hogy humán IgG készítményt fecskendeztünk borjakba i.v. A humán IgG vér koncentrációjának elemzéséhez rendszeresen vért vettünk, majd a savóból a humán IgG-t ELISA módszerrel határoztuk meg. Az elemzések kimutatták, hogy a befecskendezést követő mintegy 7 napig, a humán IgG tartósan kering és az ebben az időintervallumban meghatározott felezési ideje kb. 33 nap. Mindazonáltal a továbbiakban gyors kiürülés figyelhető meg, amit az időközben termelődött anti-humán IgG megjelenésével, és a bIgG-hIgG immunkomplex kialakulásával magyaráztunk (**3-3. ábra A**).

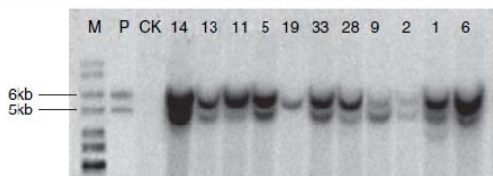


3-3. ábra – human IgG kiürülés normál (A), valamint human IgG-t expresszáló transzkromoszómális (B) borjakban

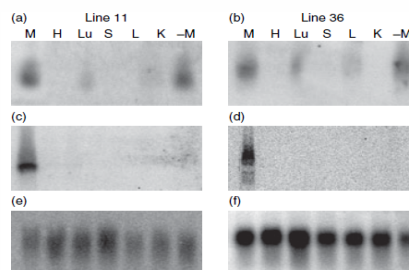
Annak érdekében, hogy a humán IgG kiürülését huzamosabb ideig vizsgálhassuk, a következő elemzést kollaborációban végeztük Richard A Goldsby-val és munkatársaival (Amherst College, Amherst, US), akik ugyanezt a vizsgálatot humán IgG-t endogén módon kifejező borjakban (Kuroiwa et al., 2002) végezték el. Mivel ezeknek az állatokban a humán IgG nem immunogén a korábban normális borjakban megfigyelt immunkomplex képződéssel összeköthető, gyors kiürülési fázissal nem kellett számolnunk. Az adatokat - immár hosszú ideig tartó egyenletes kiürülés alapján - értékelve megállapíthattuk, hogy a humán IgG kiürülése valóban 33 nap (**3-3. ábra B**), ami lényegesen hosszabb a bovin IgG felezési idejével összehasonlítva. A normál borjakba fecskendezett csirke IgY kiürülése 2.3 napos felezési idővel volt jellemezhető, azaz funkcionálisan is igazoltuk, hogy a bFcRn nem köti a csirke IgY-t. Kiindulási hipotézisünk tehát helytállóan bizonyult és egyben megerősítette a korábbi humán és rágcsáló eredményeket (Kacs Kovics et al., 2006).

b) Transzgenikus egér-modellek – I. Tejmirigy specifikus bFcRn overexpresszió

Az egyik ilyen transzgenikus egér modellt Dr. Lennart Hammarstöm (Karolinska Institute, Stockholm) és Dr. Yaofeng Zhao (Agricultural University, Beijing, China) professzorokkal együtt hoztuk létre és elemeztük. Ebben a modellben a bFcRn cDNS-t egy olyan expressziós kazettába integráltuk, amely kizárólag a laktáció idején fejezi ki a receptort a tejmirigyben (beta-kazein promoter). Az integrált gén jelenlétét Southern-blot (**3-1. ábra**), tejmirigy specifikus kifejeződését Northern blot (**3-4. ábra**) technikával validáltuk.



3-1. ábra – 11 transzgenikus alapító egér kromoszómális DNS elemzése a beta-kazein-bFcRn integrálódása szempontjából. P: plazmid mint pozitív kontroll; CK negatív kontroll, nem transzgenikus egerekből



3-4. ábra – két alapító tg egér bFcRn szövetspecifikus kifejeződésének ellenőrzése Northern blot technikával. M- tejmirigy, H – szív, Lu – tüdő, S – lép, L- máj, K – vese, -M – tejmirigy nem transzgen alomtárs

Line	Copy no.			Relative IgG level ²	
	bFcRn	b β 2m	RNA levels ¹	Milk (μ g/ml)	Serum (mg/ml)
WT	-	-	-	127.7	0.67
2	1	1	+	152.8	0.91
19	3	-	+++	253.1	2.43
9	5	3	++	158.2	1.01
6	8	5	++++	188.7	1.41
11	10	1	++++	258.3	2.51
14	15	10	++++	262.3	2.64

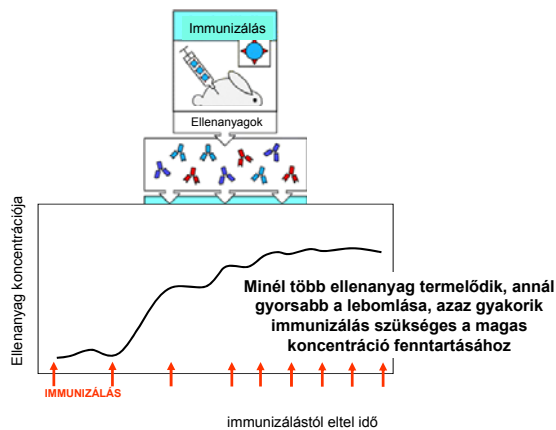
3-3. ábra – transzgen expresszió és az IgG szint alakulása a szérumban és a tejben 6 transzgenikus egér vonalban, amelyek különböző mértékben expresszálják a bfcRn nehéz- és könnyűláncát.

megegerősítették, azaz SPR rendszerben igazoltuk azt, hogy a kolosztrumba/tejbe nagymennyiségben szekretálódó IgG1 sokkal gyengébben kapcsolódik a bFcRn, mint az IgG (ld. 2.c. fejezet).

E vizsgálat kapcsán azt tapasztaltuk, hogy az állatok vérében megemelkedett az IgG szint, de ezt csak kismértékben követte a tej IgG szintjének emelkedése (3-3. ábra). Ennek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az egér tejmirigyben a bFcRn visszajuttatja az IgG-t a vérpályába, és nem szekretálja azt (Lu et al., 2007). Ezzel hasonló eredményre jutottunk, mint amit korábban már

egereknél publikáltak (Cianga et al., 1999). Fontos hangsúlyoznunk, hogy az azóta elvégzett FcRn – IgG1, IgG2 kötési vizsgálatok ezt a feltételezésünket

c) Transzgenikus egér-modellek – II. bovin FcRn promotor specifikus bFcRn overexpresszió



3-5. ábra - Az ellenanyagszint alakulása hiperimmunizálás során

Jól ismert, hogy amennyiben egy pathogen kórokozó vagy antigén kerül a szervezetbe, specifikus immunválasz alakul ki ellene, amely az antigén bekerülésétől számított 1-2 hét elteltével csúcsosodik ki. Ennek során az antigén specifikus B sejtekből plazmasejtek képződnek. Amennyiben ugyanaz az antigén újra bejut a szervezetbe, nagyobb affinitású ellenanyagok termelődése indul be, a specifikus ellenanyagok titer megnövekszik, és hosszú ideig megtalálhatók a szérumban. A specifikus ellenanyagok szérumban maradásához a plazmasejtek folyamatos immunoglobulin termelése és az ellenanyagok

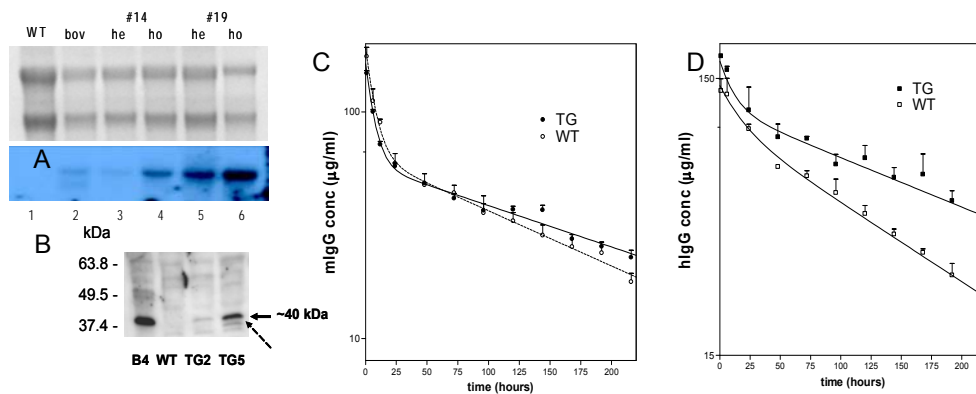
gyors kiürüléstől való hatékony védelme szükséges. Annak érdekében, hogy a poliklonális ellenanyag előállításba bevont állatok a lehető legmagasabb ellenanyagszintet ériék el, az állatokat ismételt, többször is immunizálják, azaz hiperimmunizálják. Az eljárás során az antigénre specifikus IgG szintje meghaladhatja az adott fajra jellemző normál értéket, ami viszont azzal jár, hogy a már megtermelt értékes ellenanyagok gyorsabban bomlanak le (Andersen and Bjorneboe, 1964; Brambell et al., 1964). Ezért folyamatos és gyakori immunizálásra van szükség ahhoz, hogy a specifikus ellenanyagok magas szérumszintje megmaradjon (3-5. ábra).

Ismeretes, hogy a neonatális Fc receptor (FcRn) szerepet játszik az IgG molekulák intra- és transzcelluláris szállításában az epithelsejteken keresztül, illetve megvédi az IgG (és albumin) molekulákat a gyors lebomlástól. Ez egyben magyarázza e két esszenciális fehérje kiemelkedően hosszú szérumbeli féléletidejét is (Roopenian and Akilesh, 2007).

Annak érdekében, hogy az immunizált állatokban fenntartható legyen a magas IgG szint, illetve a hiperimmunizáció során termelt értékes ellenanyagok lebomlása kisebb mértékű legyen és ezáltal a folyamat maximális hatást érjen el, az FcRn fokozott kifejeződésén (overexpresszió) alapuló rendszert terveztünk. Meg kívántuk vizsgálni ennek a tényezőnek a humorális immunválaszra

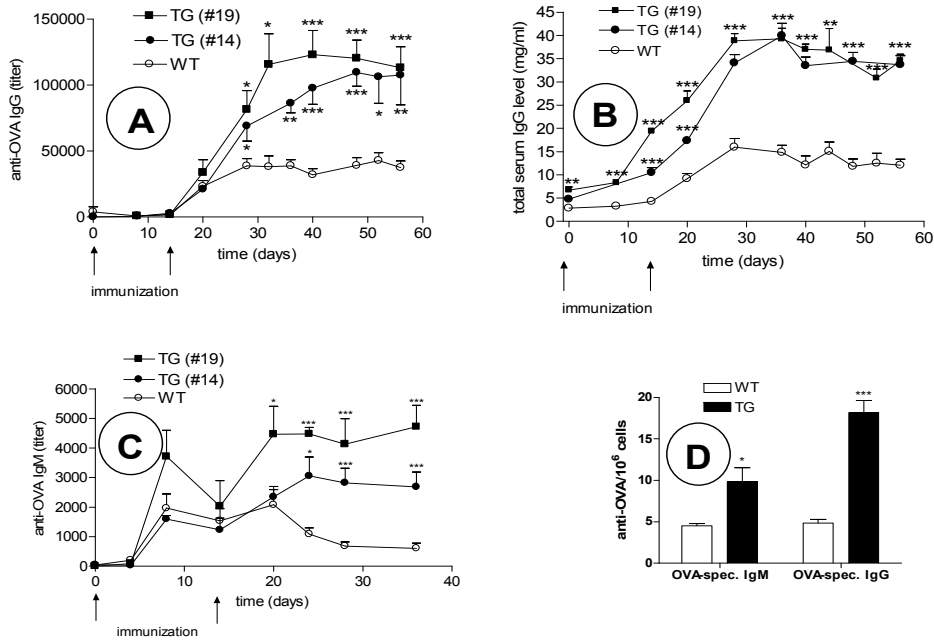
kifejtett hatását. A poliklonális ellenanyagtermelés hatékonyságának fokozása érdekében transzgenézissel kiváltott FcRn overexpresszió mindaddig ismeretlen megközelítésnek számított.

Mindehhez, Bősze Zsuzsanna munkacsoportja (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő) egy korábbi közös Biotechnológiai pályázatunk (OMFB 01605/2002 és OMFB 01606/2002) révén, egy 102 kb hosszú, szarvasmarha genomikus DNS szakaszt hordozó bakteriális mesterséges kromoszóma (bacterial artificial chromosome, BAC) segítségével olyan transzgenikus egereket hoztak létre, amelyek overexpresszálják a bFcRn-t. Az így előállított két transzgenikus egérvonalban az FcRn expressziója kópiaszám függő, és független a transzgen beépülési helyétől. Amint arról beszámoltunk (ld. 2.b. és 3.a. fejezeteket) a bFcRn nagyobb affinitással köti a humán IgG-t, mint a szarvasmarha IgG-t, ezért ezekben az állatokban az egér és humán IgG kiürülését is vizsgáltuk. Eredményeink szerint a bFcRn overexpressziója megnöveli a beinjektált egér és humán IgG fél-életidejét a transzgenikus egerekben (**3-6. ábra**) (Bender et al., 2007).



3-6. ábra -BAC transzgenikus egerek kópiaszám függő és integrációs helytől független bFcRn expressziója mRNA (A) és fehérje (B) szinten. A bFcRn overexpressziója megnöveli az egér (C) és a humán (D) IgG fél-életidejét a transzgenikus egerekben

Ezt követően kimutattuk, hogy ovalbuminnal (OVA) történő immunizálás hatására a vad típusú (vt) és a bFcRn-t négy, illetve öt kópiában hordozó transzgenikus (tg) egérvonalak (#14 és #19 vonalak) immunválaszában markáns különbség alakult ki. A második immunizálásra a vt és a tg egerek is robusztus ellenanyagtermeléssel válaszoltak, amit anti-OVA IgM és IgG titer meghatározásával vizsgáltunk. Mindazonáltal a tg állatok immunválasza számottevően erősebb volt, amit a lényegesen magasabb anti-OVA IgM és IgG titerek mutattak. A magas anti-OVA IgG titerek mind a vt, mind a tg egerekben pozitív korrelációt mutattak a megemelkedett totál IgG szintekkel, ami arra utal, hogy ovalbuminnal történő immunizálás után az IgG molekulák nagy része OVA-specifikus volt. A totál IgG szint csúcserőke meglepően magas értéket mutatott a tg egerekben (kb. 40 mg/ml!). Kimutattuk, hogy ez a különösen magas IgG mennyiség viszonylag hosszú ideig megmarad az állat szervezetében újabb immunizálás nélkül is, ami arra utal, hogy az overexpresszálódó bFcRn képes hatékonyan megvédeni a megemelkedett IgG szintet, azaz lényegesen csökkenti az értékes molekulák lebomlását. Továbbá, a tg állatokban mért magasabb OVA-specifikus IgM titer alapján arra következtettünk, hogy a robusztus OVA-specifikus IgG szint egyrészt a hatékonyabb IgG védelem, másrészt pedig a fokozott immunválasz együttes eredménye. Következtetésünket antigén-specifikus lép B sejtek vizsgálatával támasztottuk alá. Az OVA-immunizációt követő 25. napon a tg állatokban kétszer annyi OVA-specifikus IgM-et, és háromszor több OVA-specifikus IgG-t termelő B sejtet találtunk a vt állatokhoz képest, ELISPOT vizsgálattal (**3-7. ábra**) (Kacs Kovics et al., 2007).



3-7. ábra - A bFcRn overexpressziója a tg egerekben az immunválasz erőteljes fokozását eredményezi. Tg és vt egereket ovalbuminnal immunizáltunk, majd 14 nappal később újra oltottuk őket. A kísérlet során folyamatosan gyűjtött széruminálkból OVA-specifikus IgM és IgG titer határoztunk meg. Az OVA-specifikus IgG titer, csakúgy, mint a totál IgG szint szignifikánsan magasabb volt a tg egerekben, mint a vad típusúakban (A és B). Kimutattuk, hogy az OVA-specifikus IgM szint a tg állatokban szignifikánsan megemelkedik a másodlagos immunválasz során, míg a vt egerekben ez nem figyelhető meg (C). Az immunizálást követő 25. napon ELISPOT technikával vizsgáltuk a lépéből származó OVA-specifikus B sejteket. A tg állatokban kétszer több OVA-specifikus IgM és háromszor több OVA-specifikus IgG termelő B sejtet mutattunk ki a vt állatokhoz képest.

A poliklonális ellenanyag előállítás során számos tényező befolyásolhatja az immunizálás eredményességét, így az állatok fájdalma, komfortérzete is. Számos esetben, főként, ha az alkalmazni kívánt antigén kevésbé immunogén, az immunizálást erős ún. adjuváns hatású anyagokkal fokozzák. Ezek az anyagok azonban sokszor jelentős stresszel, sőt fájdalommal járnak. Tekintettel arra, hogy az FcRn overexpressziója nagyobb mennyiségű ellenanyag termeléshez vezet, illetve a már megtermelt IgG molekulákat hatékonyabban védi meg a lebomlástól, az állatokat jóval kevesebb alkalommal kell immunizálni, **ami nagy előnyt jelent az állatvédelem tekintetében is.**

Ezekből az eredményekből először hazai szabadalmi bejelentéseket tettünk az elsőbbségi dátum megszerzése érdekében (Danubia Szabadalmi és Jogi Iroda Kft. Budapest), majd ezt követően nemzetközi szabadalmi bejelentést tettünk (International Bureau of the World Office Intellectual Property Organization (RO/IB) PCT/IB2007/054770). A bejelentés alapján a Magyar Szabadalmi Hivatal ún. Express Kutatást végzett (A technika állásának feltárása; SZ05/2007) és megállapította, hogy a **találmány új és feltalálói tevékenységen alapszik, illetve azt, hogy a találmány iparilag alkalmazható.** Továbbá, a Magyar Szabadalmi Hivatal Elnöke életre hívott egy közgazdászból, jogászból és szabadalmi vizsgálóból álló munkacsoportot azért, hogy technológiánk hasznosíthatóságát értékelje. A munkacsoport által készített anyag - "Technology Valuation Report" – a következő megállapításokat tette: **"A technológia kiváló lehetőséget teremthet arra, hogy vezető eljárássá váljék az ipari/kereskedelmi vonatkozású poliklonális ellenanyag termelésben."**

Ezzel párhuzamosan, Kacs Kovics Imre és Bősze Zsuzsanna részt vett a **ValDeal Innovációs Zrt.** által meghirdetett innovációs versenyben (2007), amelynek során egy nemzetközi zsűri az első 28 legjobb közé, illetve az **élettudományi kategória egyik legjobb projektjének** választotta a benyújtott 287 pályázat alapján.

4. Összefoglalás

Jelen pályázat révén alapvető ismereteket szereztünk a szarvasmarha FcRn sejtszintű kifejeződéséről és működéséről, valamint arról, miképpen szabályozza a szarvasmarha IgG homeosztázisát.

Főbb eredményeink:

1. *in vitro* rendszerben megállapítottuk, hogy az bFcRn-t kifejező epithel sejtekben pH dependens IgG felvétel mutatható ki, és a bFcRn ill. az IgG vezikulárisan lokalizálódik, de nem a lizoszómákban kumulálódik
2. *in vitro* sejtmodellben, valamint felületi plazmon rezonancia (SPR) rendszerekben kimutattuk, hogy a humán IgG nagyobb affinitással kötődik a bFcRn-hez, mint a bovin IgG
3. SPR rendszerben kimutattuk, hogy a bovin IgG2 mintegy egy nagyságrenddel (6-25x) nagyobb affinitással kötődik a bFcRn-hez, mint az IgG1
4. génexpressziós vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a bFcRn promoter NFkB transzkripciósfaktorral indukálható
5. szarvasmarhában végzett IgG kiürülési vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a bFcRn aktívan közreműködik az IgG lebomlásának megakadályozásában és a receptorhoz nagyobb affinitással kötődő humán IgG fél-életideje hosszabb, mint a bovin IgG. Ez a jelenség különösen demonstratív volt transzkromoszómális szarvasmarhákban, amelyek szervezetében a humán IgG nem immunogén.
6. a bFcRn-t a tejmirigyben kifejeződő transzgenikus egerekben végzett elemzéseink kimutatták, hogy a tejmirigyben kifejeződő FcRn nem az IgG tejbe irányuló szekrécióját, hanem a tejmirigyből a vérbe visszajuttatását végzi
7. a bFcRn-t testszerte kifejeződő transzgenikus egerekben végzett elemzéseink kimutatták, hogy egyfelől az IgG lebomlása csökkent mértékű, másfelől az antigén specifikus humorális immunválasz fokozott. Ennek köszönhetően ezeknek az állatoknak az antigén specifikus ellenanyag termelése lényegesen meghaladja a hagyományos állatokét.

Gazdasági hasznosulás:

A 7. pontban említett megfigyelésünk alapján létrehoztunk egy biotechnológiai vállalatot, amelyben ezt az eredményünket hasznosítani kívánjuk. Fontos kiemelnünk, hogy ezt az eredményt Bősze Zsuzsanna (MBK) munkacsoportjával közösen értük el, és eredményeinkhez más, korábbi pályázati forrás is hozzájárult. E felismerés alapján Kacskovics és Bősze szabadalmi bejelentést készítettek, majd létrehozták az ImmunoGenes Kft-et (www.immunogenes.com), amellyel a szellemi tulajdonjogokkal rendelkező ELTE és MBK hasznosítási szerződést kötött. Az ImmunoGenes Kft célja, hogy az említett technológia révén transzgenikus állatokat és azokat immunizálás céljából hasznosítsa. E cég működési kereteit kutatás-fejlesztés, szabályozás, jog, üzleti stratégia és pénzügyi finanszírozás területén is kialakítottuk. A céghez magasan kvalifikált, jelentős nemzetközi tapasztalattal bíró menedzsment és egy kitűnő tudományos tanácsadó testület szerződött. Az ImmunoGenes sikeresen vont be magántőkét, elnyert egy hazai K+F pályázatot (OM00117-120/2008), valamint működésének nemzetközi szintre emelése érdekében létrehozott egy svájci részvénytársaságot (ImmunoGenes AG, www.immunogenes.com), amelynek operatív tevékenységét a hazai leányvállalat (ImmunoGenes Kft) keretei között végzi.

Irodalom jegyzék

- Andersen S. B. and Bjorneboe M. (1964) Gamma globulin turnover in rabbits before and during hyperimmunization. *J Exp Med* **119**, 537-46.
- Brambell F. W. R., Hemmings W. A. and Morris I. G. (1964) A theoretical model of gammaglobulin catabolism. *Nature* **203**, 1352-1355.
- Cianga P., Medesan C., Richardson J. A., Ghetie V. and Ward E. S. (1999) Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. *Eur J Immunol* **29**, 2515-23.
- Doleschall M., Mayer B., Cervenak J., Cervenak L. and Kacs Kovics I. (2007) Cloning, expression and characterization of the bovine p65 subunit of NFkappaB. *Dev Comp Immunol* **31**, 945-61.
- Doleschall M., Zhao Y., Mayer B., Hammarstrom L. and Kacs Kovics I. (2005) Isolation of the gene encoding the bovine neonatal Fc receptor. *Vet Immunol Immunopathol* **108**, 145-50.
- Godden S. (2008) Colostrum management for dairy calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **24**, 19-39.
- Hammarstrom L. and Weiner C. K. (2008) Targeted antibodies in dairy-based products. *Adv Exp Med Biol* **606**, 321-43.
- Kacs Kovics I. (2003) A tehéntej immunglobulinja - a jövő precíziós fegyvere a bélfertőzések ellen. *Magyar Tudomány* **4**, 461-469.
- Kacs Kovics I. (2004) Fc receptors in livestock species. *Vet Immunol Immunopathol* **102**, 351-62.
- Kacs Kovics I., Bosze Z., Bender B., Cervenak J. and Hiripi L. (2007) Transgenic animal with enhanced immune response and method for the preparation thereof (PCT/IB2007/054770) (Edited by Organization I. B. o. t. W. I. P.), Vol. PCT/IB2007/054770.
- Kacs Kovics I., Kis Z., Mayer B., West A. P., Jr., Tiangeo N. E., Tilahun M., Cervenak L., Bjorkman P. J., Goldsby R. A., Szenci O. and Hammarstrom L. (2006) FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. *Int Immunol* **18**, 525-36.
- Kacs Kovics I., Wu Z., Simister N. E., Frenyo L. V. and Hammarstrom L. (2000) Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc receptor. *J Immunol* **164**, 1889-97.
- Liu X., Ye L., Christianson G. J., Yang J. Q., Roopenian D. C. and Zhu X. (2007) NF- κ B Signaling Regulates Functional Expression of the MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG via Intronic Binding Sequences. *J Immunol* **179**, 2999-3011.
- Lu W., Zhao Z., Zhao Y., Yu S., Zhao Y., Fan B., Kacs Kovics I., Hammarstrom L. and Li N. (2007) Over-expression of the bovine FcRn in the mammary gland results in increased IgG levels in both milk and serum of transgenic mice. *Immunology* **122**, 401-8.
- Mayer B., Doleschall M., Bender B., Bartyik J., Bosze Z., Frenyo L. V. and Kacs Kovics I. (2005) Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. *J Dairy Res* **72 Spec No**, 107-12.
- Mayer B., Kis Z., Kajan G., Frenyo L. V., Hammarstrom L. and Kacs Kovics I. (2004) The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. *Vet Immunol Immunopathol* **98**, 85-9.
- Mayer B., Zolnai A., Frenyo L. V., Jancsik V., Szentirmay Z., Hammarstrom L. and Kacs Kovics I. (2002) Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. *Immunology* **107**, 288-96.
- Roopenian D. C. and Akilesh S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* **7**, 715-25.
- Ward E. S. and Ober R. J. (2009) Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn. *Adv Immunol* **103**, 77-115.
- Zhao Y., Kacs Kovics I., Zhao Z. and Hammarstrom L. (2003) Presence of the di-leucine motif in the cytoplasmic tail of the pig FcRn alpha chain. *Vet Immunol Immunopathol* **96**, 229-33.