

*Szikora Bence,<sup>1,2</sup> Kurucz István,<sup>3</sup>  
Kacskovics Imre,<sup>2,4</sup> Iliás Attila<sup>2</sup>*

## IGG DIVERZITÁS VIZSGÁLATA SZARVASMARHA FCRN TRANZSGENIKUS EGEREK BEN

<sup>1</sup> ELTE Eötvös József Collegium, Bolyai Kollégium

<sup>2</sup> ELTE TTK Immunológiai Tanszék

<sup>3</sup> ImmunoGenes-ABS Zrt.

<sup>4</sup> ImmunoGenes Kft.

### Bevezetés

A Köhler és Milstein által felfedezett hibridóma technológia (1975) és a monoklonális antitestek (mAb) gyártása óriási előrelépést jelentett a gyógyászatban. A terápiás alkalmazások új tárházát nyitotta meg, és létrejött egy hatékony és erős fegyver, amivel szembeszállhattunk a különböző betegségekkel és kórokozókkal. Ezen kívül a biológiai kutatásokhoz is kaptunk egy eszközt, amellyel számos eddigi problémán felülkerekedhettünk, és nagyon sok új eredményt értünk el. Ezért Nobel-díjjal is jutalmazták őket 1984-ben. Azóta már sokat fejlődött ezen ellenanyagok előállítására, és humángyógyászati felhasználásuk is egyre hatékonyabb lett. Egyre többféle betegséget kezdtek el kezelni monoklonális antitest terápiával, kezdve a transzplantációs, szív és érrendszeri problémáktól, az autoimmun betegségeken át egészen a tumor terápiáig [1]. Az első, tumor elleni monoklonális ellenanyagokat 1997-ben kezdték el alkalmazni az orvoslásban (Rituximab), azóta már 14 különböző mAb-ot használnak tumoros megbetegedések ellen, és több száz készítményt tesztelnek klinikai vizsgálatok során [2]. Mostanra majdnem az összes ismert, könnyen támadható célpont ellen készült terápiás ellenanyag (vagy tesztelés alatt áll). Számos betegség esetén ismerünk még olyan fehérjéket, melyek gátlásával, vagy aktiválásával eredményeket lehetne elérni a betegség diagnózisában vagy gyógyításában, de az imétn említett célpontok ellen a szokásos technikákkal nehéz, vagy nem is lehetséges ellenanyagot előállítani. E probléma megoldásában segítő sokféle új technológia egyike az ELTE Immunológiai Tanszék FcRn munkacsoportja és a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont által létrehozott transzgenikus egerek alkalmazása, amelyek az endo-

gén egér FcRn mellett, további 5 kópia szarvasmarha FcRn  $\alpha$  láncot (bFcRn) fejeznek ki [3].

A neonatális Fc receptort (FcRn) először az 1970-s években azonosították, mint egy olyan receptor molekulát, amely képes az anyai eredetű ellenanyagokat az újszülött patkány vékonybelében megkötni, és az utód véráramába juttatni. Később kiderült, hogy számos más gerinces fajban is az FcRn felelős a maternális IgG immuntranszportjáért [4]. Az FcRn részletesebb vizsgálata során egyre több funkciójára derült fény. Többek között megakadályozza az IgG és az albumin lebomlását, és ez által szabályozza e két kulcsfontosságú molekula homeosztázisát, valamint részt vesz az antigén-IgG immunkomplex antigén-prezentációjában [5]. Láthatjuk, hogy a neonatális Fc receptor a jól működő immunválasz alapvető szereplője.

A bFcRn  $\alpha$ -láncot több extra kópiában kifejező egerek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a vad típusú társaikhoz képest. Kimutatták, hogy ezekben a transzgenikus egerekben megnőtt a szérum IgG szintje, köszönhetően annak, hogy csökkent az IgG lebomlása és nőtt az antigén-specifikus IgG-t termelő B limfociták száma. A lépüket vizsgálva is számos eltérést tapasztaltak a vad típusú egerekhez képest. Sokkal több B-sejtet, plazmasejtet, neutrofil granulocitát és dendritikus sejtet tartalmaztak, illetve a lépük mérete is nagyobb volt, mint a normál egereké. Mindezek fokozottabb immunválaszra utalnak, amely abban is megnyilvánult, hogy gyengén immunogén antigének ellen is sikerült nagy mennyiségű ellenanyagot létrehozni, illetve, hogy több antigén specifikus hibridómát sikerült előállítani belőlük [3,6].

Azt már láttuk, hogy a transzgenikus állatokban nagyobb mennyiségű antigén specifikus ellenanyag keletkezik. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy e mennyiségi növekedés minőségi változással jár-e. Kísérleteinkben a transzgenikus egerek humorális immunválaszának sokszínűségét, diverzitását vizsgáltuk, vagyis azt, hogy egy adott antigén hányféle epitópjá<sup>1</sup> ellen termelődik bennük ellenanyag. Ehhez KLH-val, egy nagyméretű fehérjével (KLH = Keyhole Limphet Hemocyanin) oltottunk transzgenikus és vad típusú egereket, majd az állatokból nyert szérumokkal és részlegesen emésztett KLH-mintákkal Western blot elemzést végeztünk.

## Anyagok és módszerek

---

<sup>1</sup> Egy antigént annak egy-egy kis területén elhelyezkedő, számos ún. antigén-determináns csoport (epitóp) alkot.

*Egerek.* A kísérletekhez olyan hemizigóta, BALB/c genetikai hátterű transzgenikus nőstény egereket használtunk, melyek az endogén eger FcRn-t kódoló FCGRT gén mellett, további 5 kópia szarvasmarha FcRn  $\alpha$ -láncot kódoló gént (szarvasmarha FCGRT) hordoznak és fejeznek ki (BALB/c\_Tg5\_bFCGRT) [7]. Kontrollként vad típusú, BALB/c hátterű alomtárs nőstényeket alkalmaztunk. A kísérleteket az ELTE Immunológiai Tanszékén végeztük a Pest Megyei Kormányhivatal, Élelmiszerlánc-Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága által kiadott 22.1/828/003/2007 és XIV-I-001/517-4/2012 számú engedélyek alapján.

*Az egerek immunizálása TNP-KLH-val.* Négy BALB/c\_Tg5\_bFCGRT és négy vad típusú egeret immunizáltunk 200  $\mu$ g TNP-KLH konjugátummal, intraperitoneálisan (ip.), komplett Freund-adjuváns (CFA) hozzáadása mellett. Ezt kétszeri ip. ráoltás követte 100  $\mu$ g antigénnel, inkomplett Freund adjuváns (IFA) használatával a kísérlet kezdetétől számított 21. és 43. napon. Az immunizálástól számított 0., 14., 28., 50., 70. napon vérmintákat vettünk az állatokból.

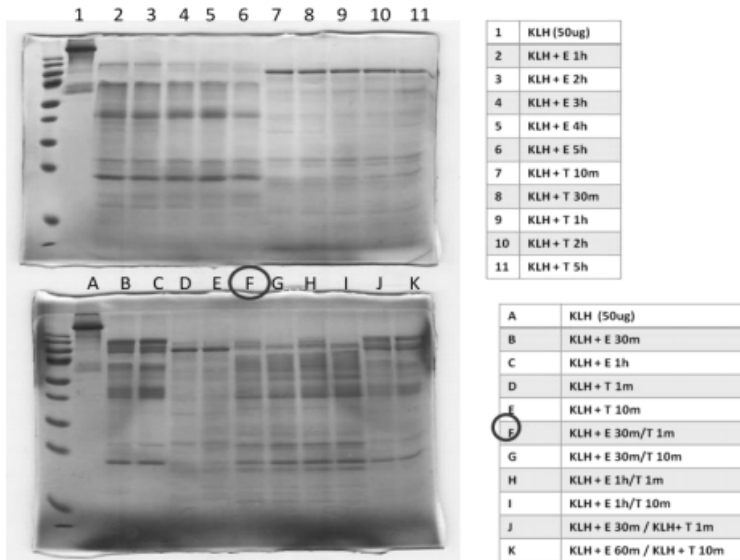
*Részleges enzimátikus emésztés.* A KLH (*Megathura crenulata* hemocianin, Sigma-Aldrich) részleges proteolízisét 37 C°-on 0,13M glicin/NaOH pH 9,6 oldatban (1 mg/ml) végeztük szarvasmarha tripszin (Boehringer Mannheim) és sertés elasztáz (Sigma-Aldrich) hozzáadásával [8, 9]. Az elasztáz (1 mg/ml), illetve a tripszint (2,5 mg/ml) egyaránt 0,1 M koncentrációjú, 8,0-as pH-jú Tris-oldatban oldottuk fel. A KLH és az elasztáz emésztési aránya 50:1, míg a KLH és a tripsziné 4,8:1 volt. Az emésztést különböző ideig (1 perc – 5 óra) végeztük, és a reakciót 5-szörös mennyiségű, redukáló mintafelvívő (pH = 6,8-as) puffer (313 mM Tris-Cl, 5% SDS, 5%  $\beta$ -merkaptotanol, 50% glicerin, 0,002% brómfenolkék) hozzáadásával állítottuk le.

*SDS-PAGE.* A poliakrilamid gélelektroforézis során 15 %-os gélben, redukáló körülmények között futattuk meg az emésztett mintáinkat. A gél ezek után Comassie Brilliant Blue festékkel festettük meg a fehérje fragmensek láthatóvá tétele érdekében.

*Western blot.* Az SDS-PAGE futtatási képek alapján kiválasztott körülmények között emésztett mintáinkat először szétválasztottuk poliakrilamid gélelektroforézis segítségével, majd a fehérjéket PVDF-membránra kötöttük. Az elsődleges ellenanyagok az egerekből származó szérum minták voltak különböző hígításokban. Másodlagos ellenanyagként kecske-anti-egér IgG-HRP-t (Southern Biotech) használtunk 10000-szeres hígításban. A detekció kemilumineszcens szubsztrát (Supersignal West Pico, Thermo Scientific) felhasználásával autoradiográfiával történt.

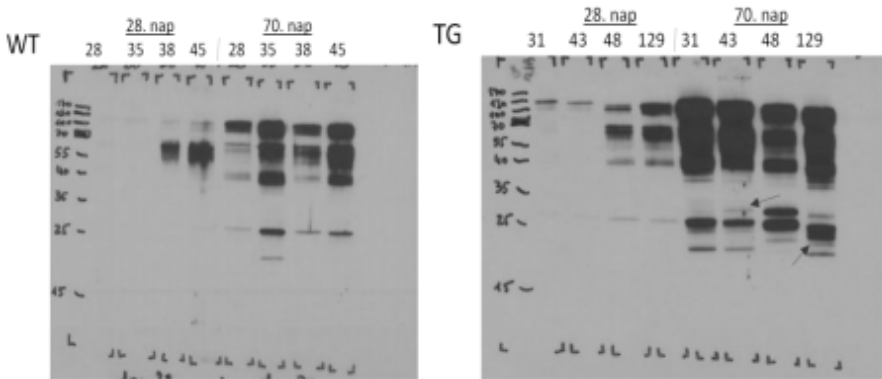
## Eredmények

A lehető legtöbb KLH fragmens előállításához először az optimális emésztési körülményeket kellett megtalálnunk. Ennek meghatározásához a KLH-t különböző ideig emésztettük tripszinnel és elasztázzal külön-külön, illetve együtt is, majd SDS-PAGE segítségével szétválasztottuk a fragmenseket. Előkísérleti eredményeink alapján választottuk ki a kombinált elasztáz 30 perc/tripszin 1 perc emésztést, mivel úgy ítéltük meg, hogy ebben az esetben keletkezett a legtöbb fehérjefragmens (1. ábra).



**1. ábra:** KLH részleges enzimatiskus emésztése tripszinnel (T) illetve elasztázzal (E). A későbbi vizsgálatokhoz a megjelölt emésztési körülményeket (elasztáz 30 perc/tripszin 1 perc) választottuk ki.

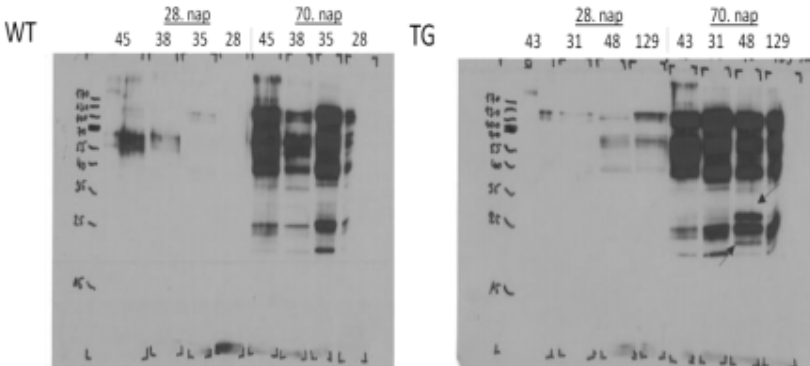
Négy transzgenikus és négy vad típusú állatból, öt különböző vérvételi időpontból (immunizálástól számított 0., 14., 28., 50., 70. nap) származó szérum mintát elemeztünk. Először egy-egy transzgenikus és vad típusú állatot jelöltünk ki, és vizsgáltuk meg mind az öt-öt, belőlük származó vérmintát Western blottal, hogy megállapítsuk, mely időpontokban vett mintákat érdemes felhasználni az összehasonlító kísérlethez (nem közölt kísérlet). Ezek alapján a 70. és a 28. napi szérumokat használtuk a további vizsgálatokhoz.



**2. ábra:** KLH fragmentek Western-blot analízise vad típusú (wt) és transzgenikus (Tg) egerek szérumainak felhasználásával. Minden állat (számok) szérumát 2000× hígításban használtuk. A piros nyilak a transzgenikus állatokban megjelenő egyedi fragmenteket jelölik.

A Western blot analízis során először minden szérumot 2000-szeres hígításban használtunk. Ekkor számos olyan KLH fragmenst észleltünk, amelyek csak a transzgenikus egerek szérumaival történő előhívás során jelentek meg. Emellett jóval erősebb jelet detektáltunk a transzgenikus minták használata esetén, amely a szérumok magasabb ellenanyag tartalmával állhat összefüggésben (2. ábra).

A kísérletünkben használt transzgenikus és vad típusú szérumok esetében egy korábbi vizsgálat során már meghatározták a KLH specifikus ellenanyag titer értékeit. Ezekre a KLH titer értékekre normalizált szérumokkal is elvégeztük ugyanezt a kísérletet, így eltüntettük a transzgenikus egerek azon előnyét, hogy nagyobb mennyiségű ellenanyagot termelnek.



**3. ábra:** KLH ellenanyag titerre normalizált vad típusú (wt) és transzgenikus (Tg) szérumok Western blot analízise. Minden állat (számok) szérumát a KLH titerükre normalizálva használtuk fel. A piros nyilak a csak a transzgenikus állatokban megjelenő fragmenseket jelölik

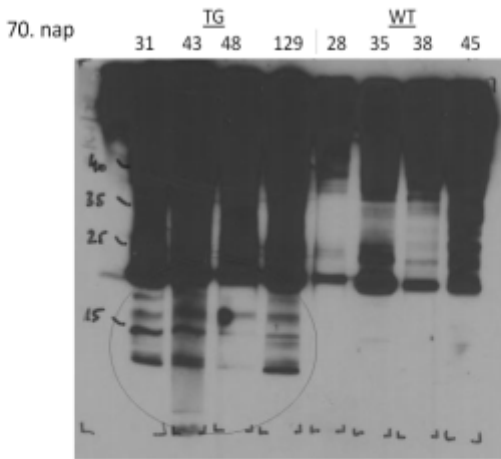
Eredményeink azt mutatták, hogy a normalizálás ellenére is jól látható volt egy-két egyedi fragmens a transzgenikus minták esetén (3. ábra).

Végül megvizsgáltuk a csak tripszinnel emésztett KLH preparátumokat is, amelynek során ismét azonos hígítású (2000-szeres) szérum mintákat használtunk. A korábbiakhoz hasonlóan, de még inkább hangsúlyozottan láthattuk, hogy jelentős különbség mutatkozott a vad típusú és a transzgenikus egerek szérumai között, mivel a kisebb méretű KLH fragmenseket csak a transzgenikus egerek szérumaiból származó ellenanyagok ismerték fel (4. ábra).

## Összegzés

Az ELTE Immunológiai Tanszék FcRn munkacsoportja már több alkalommal is igazolta, hogy a bFcRn transzgenikus egerekben nagyobb mennyiségű antigén specifikus IgG és IgM keletkezik, illetve több antigén specifikus B-sejt fejlődik a lépükben, mint a vad típusú társaikban az immunizálás hatására [7,10]. Ugyanakkor a mennyiségen kívül az ellenanyagok minősége, diverzitása is rendkívül fontos nemcsak a gyógyászatban, vagy diagnosztikában, de a kutatásban használt ellenanyagok esetén is. A munkacsoport már korábban beszámolt róla, hogy bFcRn transzgenikus egerekben, ovalbumin (OVA) ellen termelődött, IgM izotípusú ellenanyagok több OVA peptid fragmenst ismernek fel, mint a vad típusú egerekből származó antitestek [3]. A mostani vizsgálatok során sikerült kimutatni, hogy a bFcRn-t tartalmazó egerekben nagyobb mennyiségű és többféle epitópot felis-

merő IgG izotípusú ellenanyag keletkezik egy adott antigén (KLH) ellen, mint a vad típusú állatokban. Ezek az eredmények mind arra utalnak, hogy a transzgenikus egerek humorális immunválaszának nagyobb a diverzitása.



**4. ábra:** Tripszinnel részlegesen élesztett KLH Western blot analízise vad típusú (wt) és transzgenikus (Tg) egerek szérumainak felhasználásával. Minden állat (számok) szérumát 2000× hígításban használtuk fel. A piros kör a csak a transzgenikus állatokban megjelenő fragmenseket jelöli.

A mostani Western blot vizsgálatok során kapott eredmények számunkra igen meggyőzőek, ugyanakkor tisztában vagyunk a technika korlátaival is. Ennek a módszernek is van egy detektálási határa, így lehet, hogy ha hosszabb idetartam alatt hívnánk elő a mintákat, vagy kisebb hígítású mintákat használnánk, akkor megjelennének a vad típusú állatokból származó mintáknál is a transzgenikus egereknél látott „csíkok”. Mindazonáltal, a jelenlegi eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a transzgenikus állatokban sokkal nagyobb az egyedi epitópotokat felismerő ellenanyagok mennyisége, amelynek háttérében minden bizonnyal sokkal több, az egyedi ellenanyagokat termelő B-sejtek találhatóak. Kijelenthető tehát, hogy a transzgenikus egerek B-sejtjeiből lényegesen nagyobb eséllyel lehet egy adott epitópra, még a gyengén immunogén epitópkra is monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómát fejleszteni.

Ahhoz, hogy még pontosabb képet kapjunk az immunizálás hatására bekövetkező humorális immunválasz diverzitásról, különböző antigénekkal, több állattal is el kellene végezni a kísérleteket, illetve más módszereket is be lehetne vonni a

vizsgálatba (pl. ellenanyagok CDR régióinak szekvencia összehasonlítása). Azonban az eddig elvégzett vizsgálatok arra utalnak, hogy nagyobb a transzgenikus egerek humorális immunválaszának diverzitása, így ezen állatok egy kevésbé immunogén célpont ellen is hatékonyabban termelnek ellenanyagot, mint vad típusú társaik.

## IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Nagy A. B.: Terápiás monoklonális ellenanyagok fejlesztése humanizált egekben (BSc szakdolgozat); ELTE, 2013
- [2] Vacchelli E., Aranda F., Eggermont A., Galon J., Sautès-Fridman C., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L.; *Oncoimmunology* **3**, DOI: 10.4161/onci.27878, 2014
- [3] Végh A., Farkas A., Kövesdi D. *et al.*; *PLoS One* **7**, DOI: 10.1371/journal.pone.0036286, 2012
- [4] Kacs Kovics I., Cervenak J., Erdei A., Goldsby R. A., Butler J. E.; *mAbs* **3**, 431–439., 2011
- [5] Rath T., Kuo T. T., Baker K., Qiao S. W., Kobayashi K., Yoshida M., Roopenian D., Fiebigler E., Lencer W. I., Blumberg R. S.; *Journal of Clinical Immunology* **33**, 9–17., 2013
- [6] Végh A., Cervenak J., Jankovics I., Kacs Kovics I.; *mAbs* **3**, 173–180., 2011
- [7] Cervenak J., Bender B., Schneider Z., Magna M., Carstea B. V., Liliom K., Erdei A., Bősze Z., Kacs Kovics I.; *Journal of Immunology* **186**, 959–968., 2011
- [8] Bakos E., Hegedüs T., Holló Z., Welker E., Tusnády G. E., Zaman G. J., Flens M. J., Váradi A., Sarkadi B.; *Journal of Biological Chemistry* **271**, 12322–12326., 1996
- [9] Söhngen S. M., Stahlmann A., Harris J. R., Müller S. A., Engel A., Markl J.; *European Journal of Biochemistry* **248**, 602–614., 1997
- [10] Schneider Z., Cervenak J., Baranyi M., Papp K., Prechl J., László G., Erdei A., Kacs Kovics I.; *Immunology Letters* **137**, 62–69., 2011