

Az FcRn overexpresszió hatása a humorális immunválaszra

Dr. Schneider Zita

Témavezető: Dr. Kacs Kovics Imre PhD, egyetemi docens

ELTE TTK Biológiai Intézet
Immunológiai Tanszék

ELTE TTK Biológiai Doktori Iskola
Doktori Iskola Vezető: Prof. Erdei Anna
Immunológiai Program
Programvezető: Prof. Erdei Anna



2012.

Tartalomjegyzék

1	RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	4
2	BEVEZETÉS	6
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3.1	HUMORÁLIS IMMUNVÁLASZ I: ANTIGÉNEK ÉS MÁSODLAGOS NYIROKSZERVEK	8
3.2	HUMORÁLIS IMMUNVÁLASZ II: ANTIGÉNPREZENTÁCIÓ, GERMINÁLIS CENTRUM, MEMÓRIA	10
3.3	A NEONATÁLIS FC RECEPTOR (FCRN) FELFEDEZÉSE ÉS SZERKEZETE	15
3.4	AZ FCRN SZEREPE AZ IGG ÉS ALBUMIN HOMEOSZTÁZISBAN	17
3.5	A SZARVASMARHA FCRN LOKALIZÁCIÓJA ÉS FUNKCIÓJA	20
3.6	AZ FCRN SZEREPE A FAGOCITÓZIS ÉS ANTIGÉN PREZENTÁCIÓ FOLYAMATÁBAN	23
3.7	MÓDOSÍTOTT FCRN EXPRESSZIÓJÚ (KO ÉS TG) MODELLÁLLATOK ÁTTEKINTÉSE	24
4	CÉLKITŰZÉSEK	27
4.1	bFCRN OVEREXPRESSIONSÍJÚ IGG VÉDŐ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA (AZ IGG FELEZÉSI IDEJÉNEK MEGHATÁROZÁSA) IN VIVO TRANZSGENIKUS EGÉRMODELLEN	27
4.2	bFCRN OVEREXPRESSIONSÍJÚ HUMORÁLIS IMMUNVÁLASZRA GYAKOROLT EGYES PARAMÉTEREINEK VIZSGÁLATA IN VIVO TRANZSGENIKUS EGÉRMODELLEN	27
4.3	FCRN EXPRESSZIÓ KIMUTATÁSA TRANZSGENIKUS EGÉR SEJTEKEN ÉS SZÖVETEKEN	27
5	ANYAG ÉS MÓDSZER	29
5.1	KÍSÉRLETI ÁLLATOK	29
5.2	IGG-KIÜRÜLÉS ELEMZÉSE	30
5.3	ANTIGÉNEK ÉS IMMUNIZÁLÁSI PROTOKOLLOK	31
5.3.1	<i>Ovalbumin (OVA) immunizálás</i>	31
5.3.2	<i>Trinitrofenillel konjugált ovalbumin (TNP-OVA) immunizálás</i>	32
5.3.3	<i>Trinitrofenillel konjugált kulcslyuk csiga hemocianin (TNP-KLH) immunizálás</i>	32
5.3.4	<i>Immunizálás rekombináns szolubilis bFcRn (sbFcRn) fehérjével</i>	32
5.4	ELLENANYAGOK SZINTJÉNEK MÉRÉSE	32
5.4.1	<i>Totál IgG és albumin koncentráció meghatározása szérumból</i>	32
5.4.2	<i>OVA, TNP és KLH specifikus IgM és IgG meghatározása immunizált állatok szérumából és hibridóma felüliszóából</i>	34
5.5	ANTIGÉN SPECIFIKUS B SEJTEK KIMUTATÁSA (ELISPOT).....	34
5.6	HIBRIDÓMA-ELŐÁLLÍTÁS	35
5.7	AUTOREAKTÍV ELLENANYAGOK KIMUTATÁSA	35
5.8	FLUORESCENS IMMUNCITOKÉMIA	36
5.8.1	<i>A bFcRn funkcióképességének (IgG kötő képességének) vizsgálata sejtvonalon</i>	36
5.8.2	<i>A bFcRn specifikus poliklonális nyúl és csirke ellenanyagok tesztelése sejtvonalon</i>	36
5.8.3	<i>A bFcRn specifikus monoklonális ellenanyagot termelő hibridóma klónok felüliszóájának tesztelése sejtvonalon</i>	37
5.8.4	<i>Immunizálatlan vt és bFcRn Tg egerek lépének fluoreszcens immunhisztokémiai elemzése</i>	38
5.9	WESTERN BLOT	38
5.10	PERITONEÁLIS MAKROFÁGOK ÉS NEUTROFIL GRANULOCITÁK KINYERÉSE	39
5.11	CSONTVELŐI EREDETŰ DENDRITIKUS SEJTEK DIFFERENCIÁLTATÁSA	39
5.12	ÁRAMLÁSI CITOFLUORIMETRIA	40
5.13	OLDATOK, SEJTNYÉSZTŐ MÉDIUMOK ÉS SEJTVONALAK	40
5.13.1	<i>PBS</i>	40
5.13.2	<i>PBS-T</i>	40
5.13.3	<i>Albumin blokkoló oldat</i>	40
5.13.4	<i>Albumin hígító oldat</i>	40
5.13.5	<i>Albumin mosó oldat</i>	40
5.13.6	<i>GKN</i>	41
5.13.7	<i>SDS-PAGE futtató puffer</i>	41
5.13.8	<i>Western blot puffer</i>	41
5.13.9	<i>SDS-PAGE ötszörös töménységű redukáló mintapuffer</i>	41
5.13.10	<i>TBS</i>	41
5.13.11	<i>TBS-T</i>	41

5.13.12	DMEM + 10 % FCS + MeOH.....	41
5.13.13	DMEM + 10 % FCS + HAT.....	42
5.13.14	DMEM + 10 % FCS + HT.....	42
5.13.15	RPML-1640 + 5 % FCS + MeOH.....	42
6	EREDMÉNYEK	43
6.1	FCRN OVEREXPRESSIONSÍ CSÖKKENTI AZ EGÉR ÉS A HUMÁN IGG MOLEKULÁK LEBOMLÁSÁT	43
6.1.1	A befecskendezett OVA-specifikus egér IgG1 felezési ideje hosszabb a Tg egerekben	43
6.1.2	A kétféle dózisban befecskendezett humán IgG felezési ideje hosszabb a Tg egerekben.....	44
6.2	FCRN OVEREXPRESSIONSÍ HUMORÁLIS IMMUNVÁLASZRA GYAKOROLT EGYES PARAMÉTEREINEK VIZSGÁLATA IN VIVO TRANZSGENIKUS EGÉRMODELLEN	46
6.2.1	A bFcRn Tg egerek T-dependens antigénnel történő immunizálása magasabb antigén specifikus IgG titerrel és totál IgG koncentrációval jár.....	46
6.2.2	A Tg egerek szérumbeli totál IgG és albumin koncentrációja Balb/c háttérre keresztezést követően is magasabb.....	47
6.2.3	A Balb/c háttérű Tg egerek immunválasza hatékonyabb.....	48
6.2.4	A bFcRn Tg egerek hibridóma-előállítási képessége fokozott.....	51
6.2.5	A bFcRn túltermeltetése nem jár együtt autoreaktív ellenanyagok képződésével	53
6.3	FCRN EXPRESSIONSÍ KIMUTATÁSA TRANZSGENIKUS EGÉR SEJTEKEN ÉS SZÖVETEKEN	54
6.3.1	A pH-dependens FcRn-IgG interakció kimutatása sejtvonalakon.....	54
6.3.2	FcRn specifikus poliklonális nyúl ellenanyag tesztelése	55
6.3.3	bFcRn specifikus egér monoklonális ellenanyagok fejlesztése.....	55
6.3.4	A bFcRn specifikus csirkében termelt poliklonális ellenanyag tesztelése, az FcRn expresszió kimutatása vi és Tg egér lépében.....	58
7	DISZKUSSZIÓ	60
8	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	73
9	ÖSSZEFOGLALÁS	74
10	SUMMARY	75
11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	76
12	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	77
12.1	AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK.....	77
12.2	AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK	77
12.3	NEMZETKÖZI KONFERENCIA KIADVÁNYBAN MEGJELENT ABSZTRAKTOK	78
12.4	HAZAI KONFERENCIA KIADVÁNYBAN MEGJELENT ABSZTRAKTOK.....	78
13	IRODALOM	80

1 Rövidítésjegyzék

APC – antigénprezentáló sejt (antigen presenting cell)
BAC – mesterséges bakteriális kromoszóma (bacterial artificial chromosome)
BCR – B-sejt receptor (B cell receptor)
bFcRn – szarvasmarha FcRn (bovine FcRn)
bIgG – szarvasmarha immunglobulin G (bovine IgG)
BSA – szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
cDNS – komplementer DNS
CFA – komplett Freund adjuváns (complete Freund's adjuvant)
DC – dendritikus sejt (dendritic cell)
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium tápfolyadék
dsDNS – dupla szálú DNS
FcRn – neonatális Fc receptor (neonatal Fc receptor)
FCS – fétális borjúsavó (fetal calf serum)
FDC – folliculáris dendritikus sejt (follicular dendritic cell)
FI – fluoreszcencia intenzitás
FRC – fibroblasztikus retikuláris sejtek
GC – csíráközpont (germinális centrum)
GKN – glükóz-kálium-nátrium puffer
HAT – hipoxantin, aminopterin, timidin
HEV – magas endotélsejtes venula
hFcRn – emberi FcRn (human FcRn)
hIgG – emberi (humán) immunglobulin G
HRP – tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)
HT – hipoxantin, timidin
IFA – inkomplett Freund adjuváns (incomplete Freund's adjuvant)
IgG – immunglobulin G
IgM – immunglobulin M
ip – intraperitoneális
iv – intravénás
KLH – kulcslyuk csiga hemocianin (keyhole limpet haemocyanin)
mAb – monoklonális ellenanyag (monoclonal antibody)
MARCO – macrophage receptor with collagenous structure

MC – mikrotenyészet (microculture)
MeOH – 2-merkaptóetanol
mFcRn – egér FcRn (mouse FcRn)
MHC – fő hisztokompatibilitási antigén (main histocompatibility complex)
mIgG – egér immunglobulin G
MRC – marginális retikuláris sejtek
MZB – marginális zóna B-sejt
OD – optikai denzitás (optical density)
OPD – orto-fenilén-diamin (ortho phenylene diamine)
OVA – ovalbumin
PAGE – poliakrilamid-gélelektroforézis
PALS – periarterioláris limfoid hüvely (periarteriolar lymphoid sheet)
PBS – fiziológiás foszfát puffer (phosphate buffered saline)
PEG – polietilén-glikol
RPMI – Roswell Park Memorial Institute tápfolyadék
sbFcRn – szolubilis szarvasmarha FcRn (soluble bovine FcRn)
SCS – szubkapszuláris szinusz
SDS – nátrium-dodecyl-szulfát (sodium dodecyl sulphate)
SEM – az átlag hibája (standard error of mean)
SIGNR1 – C-type lektin specific intracellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin receptor 1
SLE – szisztémás lupus erythematosus (systemic lupus erythematosus)
SPF – meghatározott kórokozóktól mentes (specified pathogen free)
ssDNS – szimpla szálú DNS
TBS – Tris pufferelt sóoldat (Tris buffered saline)
TCR – T-sejt receptor
TD – T-dependens
Tg – transzgenikus (transgenic)
TI – T-independens
TMB - tetrametilbenzidin
TNP – trinitrofenil
Tris – tris-(hidroximetil)-amino-metán
vt – vad típusú (wild type)

2 Bevezetés

A szervezetbe jutó antigén hatására az immunrendszer megfelelő reakciója esetén a B-limfociták plazmasejté differenciálódnak és nagy mennyiségben termelnek az adott antigénre specifikus immunglobulinokat. A megnövekedett ellenanyagszint fenntartása a vérben egyrészt a plazmasejtek immunglobulin termelésének folytonosságát, másrészt a termelődött ellenanyagok gyors lebomlástól való védelmét igényli. A poliklonális ellenanyagok előállításánál a lehető legmagasabb antigén-specifikus ellenanyag koncentráció érdekében az állatokat gyakori immunizálásnak vetik alá. A hiperimmunizálás során az antigén-specifikus immunglobulin G (IgG) molekulák szintje jelentősen meghaladhatja a fajra jellemző normál értéket, aminek következményeképpen a megtermelt értékes ellenanyagok gyorsabb ütemben bomlanak le (Andersen and Bjorneboe, 1964; Brambell et al., 1964). Ezért folyamatos és gyakori immunizálásra van szükség ahhoz, hogy a specifikus immunglobulinok magas szérumszintje megmaradjon.

Az egyes immunglobulin osztályok közül az IgG rendelkezik a leghosszabb felezési idővel. A neonatális Fc receptor (FcRn) fontos szerepet játszik ennek szabályozásában, valamint különböző epiteliális barriereken keresztül IgG molekulákat transzportál, és több állatfajban a maternális IgG átvitelét is szolgálja az anyából az utódba. A közelmúltban igazolták továbbá, hogy az IgG molekulákhoz hasonlóan szabályozza az albumin homeosztázist, illetve kimutatták, hogy fontos szerepet játszik a fagocitózis és antigén prezentáció folyamatában is (Ward and Ober, 2009). Dr. Kacs Kovics Imre és munkatársai az elmúlt években klónozták és karakterizálták a szarvasmarha, juh, sertés és teve FcRn molekuláját (Kacs Kovics et al., 2006b; Kacs Kovics et al., 2000; Mayer et al., 2002; Zhao et al., 2003) és kimutatták a receptor génextpresszióját különböző, az IgG szekrécijában résztvevő epitelsejtekben (Mayer et al., 2005; Mayer et al., 2004). Igazolták továbbá azt is, hogy a szarvasmarha FcRn (bovin FcRn, bFcRn) fontos szerepet tölt be a szarvasmarhák IgG homeosztázisában (Kacs Kovics et al., 2006a).

A bFcRn génextpressziós változások hatékony *in vivo* tanulmányozása érdekében kívánatosnak látszott egy, a bFcRn-nel rendelkező transzgenikus (Tg) egérmodell létrehozása. Munkám során a Dr. Bősze Zsuzsanna munkacsoportjával (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont) közösen előállított, a bFcRn α -láncát többféle kópiaszámban expresszáló hemi- és homozigóta transzgenikus egerekben teszteltük a modell funkcionális alkalmasságát az egér, valamint a humán IgG katabolizmusra gyakorolt hatásán keresztül. Ezt követően vizsgáltuk a bFcRn fokozott kifejeződésének a

humorális immunválasz egyes paramétereire (poliklonális ellenanyag termelésére), valamint a hibridóma-előállítás hatékonyságára (monoklonális ellenanyag termelésére) gyakorolt hatását. Az idős transzgenikus egerek autoellenanyag profiljának monitorozására antigén chip assay-t végeztünk. Kifejlesztettünk, illetve teszteltünk továbbá olyan poli- és monoklonális ellenanyagokat, amelyekkel a Tg egerek sejtjeiben és szöveteiben kifejeződő bFcRn fehérjét Western blot, valamint fluoreszcens immuncitokémiai és immunhisztokémiai módszerekkel tanulmányozhatjuk.

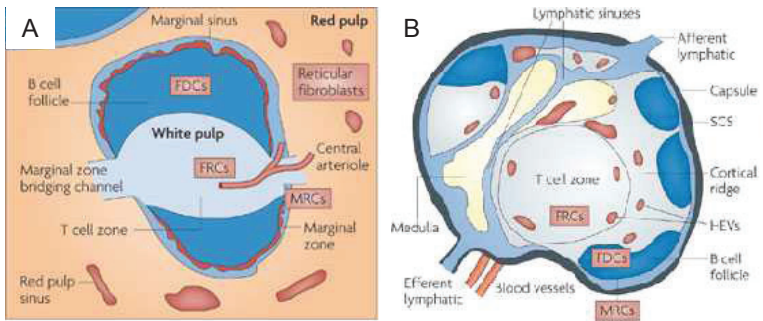
3 Irodalmi áttekintés

3.1 Humorális immunválasz I: antigének és másodlagos nyirokszervek

A humorális immunválaszt a kórokozóval kapcsolatba került aktiválódott B-sejtek utódsejtjei, illetve a belőlük differenciálódott plazmasejtek által termelt ellenanyagok közvetítik. A folyamatot alapvetően meghatározza a kórokozó illetve antigén természete: a **T-independens** (TI) antigének T-sejtek közreműködése nélkül váltanak ki aktivációt a lép marginális zóna B-sejtjeiben és a nyálkahártyákban megtalálható nem konvencionális B1-sejtekben (Martin et al., 2001); ez esetben általában alacsony affinitású ellenanyagok keletkeznek, és nem játszódik le sem az izotípusváltás, sem a szomatikus hipermutáció folyamata. Az így létrejövő immunglobulinok gyors védelmet biztosítanak bizonyos mikroorganizmusokkal szemben és időt adnak a T-dependens (TD) immunválasz kifejlődéséhez.

A **T-dependens** antigének által kiváltott immunválasz során a másodlagos nyirokszervekben a primer folliculus B-sejtjei aktiválódnak és gyors osztódásuk révén létrehozzák a másodlagos (szekunder) folliculusokat. Az itt kialakuló csíráközpontok (germinális centrum, GC) biztosítják az intenzív B-sejt osztódás, a szomatikus hipermutáció és affinitásérés, valamint a memóriasejt-képződés feltételeit. Ezeket a folyamatokat számos egyéb sejtípus befolyásolja, így az antigén-specifikus T helper sejtek, a professzionális antigén prezentáló dendritikus sejtek, a folliculáris dendritikus sejtek, valamint a folliculáris T helper sejtek szabályozzák. A szabályozás térben és időben zajlik a speciális felépítésű másodlagos nyirokszervekben (lép és nyirokcsomó) (Junt et al., 2008). A véráramban lokalizálódó antigének kiszűrése szempontjából különösen kiemelkedő jelentőségű **lép** kapszula határolja, melyből támasztékot biztosító trabekulák nyúlnak a szerv belsejébe (Mebius and Kraal, 2005). A belépő vérerek centrális arteriolákká ágazódnak, melyeket fehér pulpa vesz körül (**1/A ábra**). A centrális arteriolák a marginális zónánál érnek véget, mely a lép fehér pulpáját és vörös pulpáját választja el egymástól. Egérben a fehér pulpát a centrális arteriolát körülvevő T-sejtes zóna (periarterioláris limfoid hüvely, PALS), valamint B-sejtes folliculusok és az őket körülvevő marginális zóna alkotja (Mebius and Kraal, 2005). Emberben a marginális zóna szélesebb és egy perifolliculáris zóna is körülveszi, ami elkülöníti a fehér pulpát a vörös pulpától (Mebius and Kraal, 2005; Steiniger et al.,

2001). A lép T-sejtes zónája CD4+ és CD8+ T-sejteket és dendritikus sejteket tartalmaz, melyeket strómasejtek hálózata (fibroblasztikus retikuláris sejtek, FRC) vesz körül. A B-sejtes folliculusokban a B-sejteket a folliculáris dendritikus sejtek (FDC), folliculáris T helper sejtek (T_{FH}) és más típusú strómasejtek jóval diffúzabb hálózata veszi körül. A marginális zónát marginális zóna makrofágok, dendritikus sejtek (DC) és marginális zóna B-sejtek (MZB) alkotják, melyek strómasejtek hálózatában helyezkednek el. A marginális zóna strómasejtjei egyedi fenotípussal rendelkeznek és ezekre a marginális retikuláris sejtek (MRC) elnevezést javasolták (Katakai et al., 2008).



1. ábra A lép és nyirokcsomó sematikus szerkezete

(A) A lép fehér pulpája egy centrális arteriólát körülvevő fibroblasztikus retikuláris sejtek (FRC) hálózatát tartalmazó T-sejtes zónából (PALS) és a folliculáris dendritikus sejteket (FDC) hálózatát is tartalmazó B-sejtes folliculusokból tevődik össze. A fehér pulpát körüvevő marginális zónában található a marginális zóna makrofágok és a marginális retikuláris sejtek (MRC). Az immunsejtek azon a területen lépnek be fehér pulpába, ahol a T-sejtes zóna határos a marginális zónával (marginális zóna összekötő csatorna).

(B) A nyirokcsomóba belépő nyirokerek a szubkapszuláris szinuszba (SCS) térnek, amelyből limfatikus szinuszok ágaznak a medulla felé, majd a nyirok a szerv átellenes oldalán kilépő nyirokerek révén szállítódik tovább. A FDC hálózatot tartalmazó B-sejtes folliculusok a nyirokcsomó kérgében találhatók, ezeket egy MRC réteg választja el a szubkapszuláris szinusztól. A sok fibroblasztikus retikuláris sejtet is tartalmazó T-sejtes zónát kortikális ridge választja el a B-sejtes folliculusoktól. A fehérvérsejtek belépését a vérből a nyirokcsomóba speciális szerkezetű magas endotélsejtes venulák (HEV) teszik lehetővé. (Mueller and Germain, 2009) alapján.

A **nyirokcsomók** nem csupán a vérkeringéssel, hanem a szervezetet behálózó nyirokerekkel is kapcsolatban állnak, így a nyirokrendszer által szállított antigének kiszűrésében is részt vesznek. A nyirokcsomó kapszulája alatt közvetlenül található a szubkapszuláris szinusz (SCS), melyet makrofágok határolnak (**1/B ábra**). Ezek a makrofágok felveszik az antigéneket és egyéb molekulákat, melyek a nyirokkal érkezik a nyirokcsomóba (Drinker et al., 1934). A vérből érkező limfociták többnyire a speciális szerkezetű ún. magas endotélsejtes venulákon (HEV) keresztül lépnek be a

nyirokcsomóba (Anderson and Anderson, 1975). A magas endotélsejtes venulák gyakran a B és T-sejtes zónát elkülönítő régiókban lokalizálódnak (Katakai et al., 2004). Mint a lépben, a nyirokcsomóban is CD4+ és CD8+ T-sejtek, dendritikus sejtek és strómasejtek hálózata (fibroblasztikus retikuláris sejtek, FRC) alkotja a T-sejtes zónát. A léphez hasonlóan a B-sejtes folliculusok B-sejteket, FDC-ket, valamint a T-sejtes zónát és szubkapszuláris szinusz (SCS) határoló strómasejtek perifériás hálózatát tartalmazzák. A nyirokcsomóban is megtalálhatók továbbá a sajátos tulajdonságokkal bíró strómasejtek (marginális retikuláris sejtek, MRC); ezek a B-sejtes folliculusokat és SCS-t választják el egymástól (Katakai et al., 2008).

3.2 Humorális immunválasz II: antigénprezentáció, germinális centrum, memória

A germinális centrumok (GC) képződésének feltétele az antigén, aktivált B-sejt és T-sejt folliculuson belüli jelenléte. A B-sejtek aktivációját elsődlegesen a szükséges mennyiségű antigén kötődése váltja ki. A kisméretű szolubilis antigének egyszerű diffúzióval bejuthatnak a limfoid szövetbe, de a legtöbbször makrofágok, DC-k és FDC-k révén kerül sor a prezentációra.

A szolubilis antigének gyorsan bekerülhetnek a nyirokcsomóba a nyirokkeringésen keresztül, a bőr alá feckendezett antigén percekben belül kimutatható a szubkapszuláris szinuszban (Nossal et al., 1968). Több vizsgálat is kimutatta pórusok jelenlétét a szubkapszuláris szinusz azon területein, amelyek határosak a nyirokcsomó parenchimájával (Clark, 1962; Farr et al., 1980; van Ewijk et al., 1988), és ezek a pórusok lehetővé tehetik kis méretű szolubilis antigének (toxinok) számára a B-sejtes folliculusok közvetlen elérését (Pape et al., 2007). Kiderült továbbá, hogy 24 órával immunizálás után a folliculus B-sejtjei MHC II-asszociált módon antigént prezentálnak (Garside et al., 1998). Mindazonáltal a pórusokat akár a szinusz falán éppen keresztüljutó sejtek is generálhatják, és ellentmondások figyelhetők meg a pórusok mérete és a diffúzió elől elzárt antigének átmérője között, így feltételezhető egy alternatív mechanizmus jelenléte a kis méretű antigének folliculusba jutása kapcsán.

Habár a kisméretű antigének diffúzióval elérhetik a folliculus B-sejteket, ez a folyamat nagyobb antigének esetén limitált. Korai mikroszkópos vizsgálatok kimutatták a szubkapszuláris szinusz alatt tartózkodó **makrofágok** populációját (Clark, 1962; Farr et al., 1980), amelyek nyúlványaik révén elérhetik a nyirokkeringést (Farr et al., 1980;

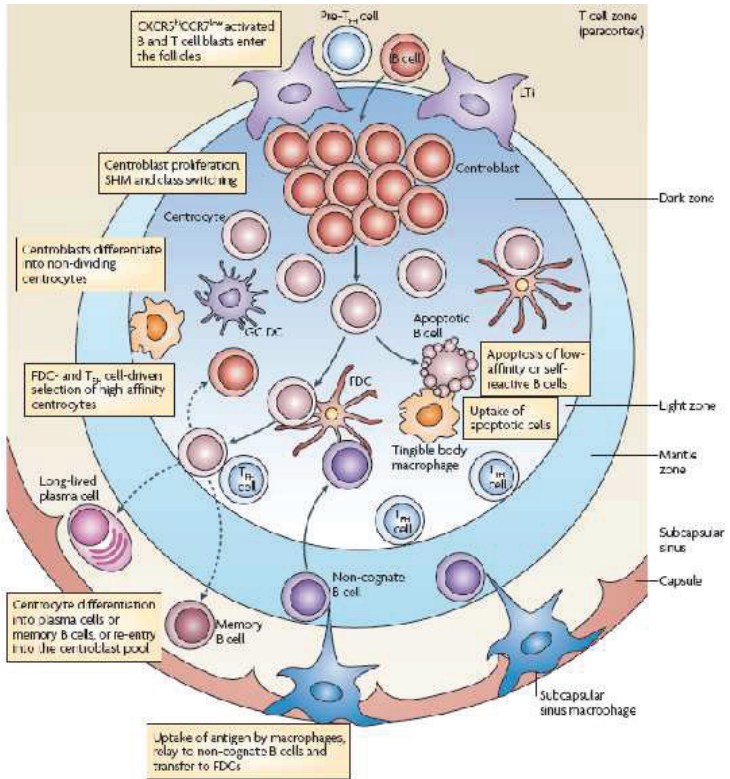
Fossum, 1980; Szakal et al., 1983). Ezek a sejtek eltérnek a medulla makrofág populációjától és fagocitotikus aktivitásuk limitált, melynek révén képesek felszínükön intakt antigént bemutatni (Fossum, 1980; Szakal et al., 1983). Kimutatták, hogy ezek a makrofágok a bejuttatást követő 72 óráig megtartják az antigént (Martínez-Pomares et al., 1996). Később bizonyították, hogy a szubkapszuláris szinusz makrofágok felelősek a nagy méretű antigének (immunkomplex, baktérium, vírus) összegyűjtéséért, és ezt követően a felhalmozott antigént a környező B-sejteknek prezentálják. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések is, amelyek azt mutatják, hogy az antigén beadását követően a folliculus antigén-specifikus B-sejtjeinek migrációja az idő előrehaladtával csökken és stabil kontaktust alakítanak ki a szubkapszuláris szinusz makrofágokkal (Carrasco and Batista, 2007; Junt et al., 2007; Phan et al., 2007). Ez az interakció lehetővé teszi a B-sejtek számára, hogy a BCR-en keresztül internalizálják az antigént, mielőtt a B-sejt - T-sejt határra vándorolnak (Carrasco and Batista, 2007), ahol a T-sejtekkel a kölcsönös stimulációt biztosító immunológiai szinapszist alakítják ki (Garside et al., 1998; Okada et al., 2005). Bizonyították azt is, hogy a szubkapszuláris szinusz makrofágok immunkomplex megkötése fontos szerepet tölt be az ellenanyagok affinitásérésének folyamatában (Phan et al., 2009). A másodlagos nyirokszervek heterogén makrofág populációinak jellemzőit a közelmúltban foglalták össze (Martínez-Pomares and Gordon, 2012).

A **dendritikus sejteket** (DC) tartják a leghatékonyabb professzionális antigénprezentáló sejttypusnak, így különösen fontos szerepük van az MHC – peptid komplexek T-sejteknek történő bemutatásában (Delamarre et al., 2005; Dudziak et al., 2007; Itano et al., 2003). Míg a T-sejtek az antigén lebomlásából származó peptidet ismerik fel (megfelelő MHC környezetben), addig a B-sejtek az antigént natív, feldolgozatlan formában ismerik fel, és ezért a B-sejtek számára történő antigén bemutatás olyan mechanizmust feltételez, melynek során a DC vagy más sejttypus (ld. fent) stabilan megköti a felszínén az antigént (Bergtold et al., 2005; Huang et al., 2005). A parakortexben sikerült egy olyan DC populációt azonosítani, ami képes az antigént intakt formában bemutatni a B-sejteknek (Colino et al., 2002; Qi et al., 2006; Wykes et al., 1998). Ezen DC populáció részletes elemzése rávilágított arra, hogy ezek a sejtek főként a HEV körül lokalizálódnak, így a migráló B-sejtek könnyen találkozhatnak velük (Qi et al., 2006). Ez a parakortexben zajló DC-mediált antigénprezentáció ideális környezetet biztosíthat a B-sejtek számára ahhoz, hogy a szükséges T-sejt indukcióhoz is hozzájussanak a maximális aktiváció érdekében (Qi et al., 2006).

A **follikuláris dendritikus sejtek** (FDC) az antigén immunkomplex formában történő hosszú idejű retenciójáért felelősek (Chen et al., 1978; Mandel et al., 1980; Tew et al., 1980). Az immunkomplexek retenciója két különböző mechanizmussal történik: egyrészt a komplementrendszer révén, az FDC-k magas szintű komplement receptor 1 és 2 (CR1 és CR2) expresszióját kihasználva (Chen et al., 1978; Klaus and Humphrey, 1977; Papamichail et al., 1975), másrészt az IgG tartalmú immunkomplexek Fc receptorokhoz (FcγRIIb) kötődése révén (Qin et al., 2000; Yoshida et al., 1993). Mind a preformált immunkomplexek (Fossum, 1980; Nossal et al., 1965), mind a C3d fragmentumok borította antigének (Dempsey et al., 1996) jelenléte a B-sejt aktiváció stimulálásához vezet, potenciálisan az FDC-k felületén lévő megnövekedett antigén depozíció eredményeként (Heyman, 2000).

Az antigénprezentáció hatására a follikuláris B-sejteken megnő a CCR7 kemokin receptor kifejeződése és a külső T-sejtes zóna felé vándorolnak, ahol segítséget kapnak a follikuláris helper T-sejtektől (T_{FH}). A T_{FH} sejtek kialakulásának részletei még nem tisztázottak (Fazilleau et al., 2009a), de eddigi ismereteink alapján a T_H -sejtek antigénkötő receptoruk (TCR) erős kötődése és stabil B-sejtes interakció esetén T_{FH} sejtekké alakulnak és belépnek a csíráközpontba (Fazilleau et al., 2009b; Schwartzberg et al., 2009).

A T-sejtektől kapott aktivációs jeleket követően a **B-sejtek** vagy benépesítik a follikulusokat és GC kialakulást váltanak ki, vagy extrafollikuláris plazmasejtekké alakulnak. A folyamatot befolyásoló faktorok nem teljesen tisztázottak; egyes faktorok hatására a B-sejtek a lép összekötő csatornáiba vagy a T-sejtes zóna és vörös pulpa határára, illetve a nyirokcsomó medulláris nyúlványaiba vándorolnak (Gatto et al., 2009; Pereira et al., 2009). Itt extrafollikuláris plazmasejtekké differenciálódnak, melyekben az immunglobulinok izotípusváltása kismértékű és három nap elteltével általában elpusztulnak az adott másodlagos nyirokszervben (Tarlinton et al., 2008). Egyes esetekben ez szomatikus hipermutációval létrejövő autoellenanyagok keletkezésével járhat (William et al., 2002). Ezzel ellentétben a B-sejt limfóma 6 (Bcl-6) fokozott kifejeződése esetén a B-sejtek germinális centrum B-sejtekké (GC B-sejt) differenciálódnak és a follikulusokba vándorolnak (Gatto et al., 2009; Pereira et al., 2009; Staudt et al., 1999).



2. ábra A germinális centrumban lezajló események és az azokban résztvevő sejttípusok

Az aktivált B-sejtek benépesítik a csiraközpontot és germinális centrum reakciókat indukálnak. A B-sejtekkel stabil kapcsolatot kialakító folliculáris helper T-sejtek (T_{FH}) is belépnek a folliculusokba; ezek túlélő és/vagy növekedési jeleket kaphatnak a limfoid szövet indukáló (Lti) sejtektől a T-sejtes és B-sejtes zóna határán. A germinális centrum B-sejtek proliferációja kiszorítja a naiv keringő B-sejteket, amelyek így a folliculus köpenyzónáját alkotják. A GC sötét zónája osztódó GC B-sejtekkel, más néven centroblastozokkal van tele, habár néhány proliferáló B-sejt a világos zónában is megtalálható. A világos zóna FDC-ben gazdag terület, amely sejtek antigént kötnék a felszínükön. Az antigént a subcapsuláris szinusz makrofágok veszik fel a nyirokkeringésből és szállítják a B-sejtekhez, amelyek az FDC-nek adják azt át. Az osztódó centroblastozokat az immunoglobulin variábilis génekben lezajló szomatikus hipermutáció jellemzi; ezek nem osztódó utódsejtjei, a centrociták kiválogatódnak az FDC-vel történő sikeres kapcsolódás, a BCR általi antigénfelvétel és az antigén T_{FH} sejteknek történő bemutatása révén. A szelekcio eredményeképpen a centrociták véglegesen differenciálódhatnak hosszú életű plazmasejteké vagy memória sejtekké, vagy visszatérhetnek a sejtciklusba, hogy újabb szomatikus hipermutációkon essenek át. Lehetséges, hogy a sötét zóna B-sejtjei is kapnak szelekcio jeleket; ezen túlélési jelek hiánya *in situ* apoptozishoz vezet. Az apoptotikus sejteket a zárványtestes makrofágok kebelezik be (Vinuesa et al., 2009).

A bevándorolt B-sejt blasztok proliferáció révén kitöltik a folliculusokat, majd centroblasztokká differenciálódnak, melyek fokozott CXCR4 kemokin receptor expresszióval jellemezhetők és a T-sejtes zónához közel helyeződnek, a GC sötét zónáját formálva (2. ábra) (Allen et al., 2004). A proliferáló centroblasztokban az immunglobulinok izotípusváltása és szomatikus hipermutációja zajlik, mely véletlenszerű változásokat eredményez az ellenanyagok affinitásában és specificitásában. A centroblasztok a GC világos zónájába vándorolnak (Beltman et al., 2011) és a belőlük kialakuló, nem osztódó centrocitákon ismét kifejeződik a BCR, amellyel az FDC-k által immunkomplex formában prezentált antigénhez kapcsolódhatnak (Kosco-Vilbois and Scheidegger, 1995). Az FDC-k immunkomplex prezentálása különösen a GC világos zónájában jelentős, melyek T_{FH} sejtekben is gazdagok. E megfigyelésen alapuló modell szerint a B-sejtek proliferációja a sötét zónában, szelekciója a világos zónában történik, és a kiválasztott centrociták visszatérhetnek a sötét zónába további proliferációs, majd azt követő világos zónában zajló szelekciós ciklusokra. Az újabb eredmények viszont megkérdőjelezték ezt az elméletet: proliferáló B-sejtek jelenléte a világos zónában, továbbá a B-sejtek zónák közötti vándorlásának alacsony gyakorisága arra utal, hogy a sötét zónába irányuló reciklizáció nem szükséges a BCR mutáció és magasabb affinitást célzó szelekció ismétlődő ciklusaihoz (Hauser et al., 2007).

A germinális centrumokban a B-sejtekben szomatikus hipermutáció, izotípusváltás és affinitáson alapuló szelekció zajlik, aminek eredményeként hosszú életű memóriasejtek és plazmasejtek keletkeznek (Allen et al., 2007; Chan et al., 2010; Nutt and Tarlinton, 2011). Ezt követően mindkét sejtípus elhagyja a germinális centrumot és a plazmasejtek a lép vörös pulpájába, a nyirokcsomó medulláris sővényeibe vagy a bél mukóza-asszociált limfoid szövetébe (MALT), míg a memória B-sejtek a lép marginális zónájába vagy a mandula epitéliumba vándorolnak (Allen et al., 2007; Elgueta et al., 2010; Kunkel and Butcher, 2003). Másik lehetőségként a sejtek a vérkeringésbe belépve távolabbi helyeken telepedhetnek meg; plazmasejtek esetén túlnyomórészt a csontvelőben (Kunkel and Butcher, 2003). Gyulladás vagy autoimmun válasz esetén a plazmasejtek a gyulladásos területre is vándorolhatnak (Cassese et al., 2001; Yoshida et al., 2010). A plazmasejtek által termelt ellenanyagok és az eredeti antigén ismételt bejutását követően a memória sejtek plazmasejteké történő gyors differenciálódása biztosítja a hosszútávú humorális immunitást (Rajewsky, 1996; Tangye and Tarlinton, 2009).

3.3 A neonatális Fc receptor (FcRn) felfedezése és szerkezete

A haszonállatokkal foglalkozók körében már a mai értelemben vett immunológiai ismeretek elterjedése előtt jól ismert volt az a jelenség, hogy amennyiben az újszülött csikó, bárány vagy borjú a világrajövele után bizonyos időn belül nem jutott főcstejhez (kolosztrumhoz), akkor nagy eséllyel elpusztult. Először 1892-ben Paul Ehrlich hívta fel arra a figyelmet, hogy az ilyen elhullás oka fertőző betegség (Ehrlich, 1982). Az azóta eltelt idő során bizonyították, hogy az újszülöttek immunrendszere a megszületést követő hetekben meglehetősen fejletlen, és ezért nem tudja betölteni szerepét a fertőzések megakadályozásában. Az időleges védelmi hiány áthidalását az anyaállat immunrendszere által termelt ellenanyagok biztosítják, amelyek a kórokozók széles spektrumával szemben nyújtanak specifikus védelmet az újszülöttnak.

Ehrlich - korának tudományos ismereteit meghaladó - sejtését, amely szerint a tej protektív ellenanyagokat tartalmaz, csak 1946-ban igazolta Emil Smith, aki a szarvasmarha kolosztrum fő összetevőjét immun laktoglobulinként jelölte meg (ma IgG1) (Smith, 1946).

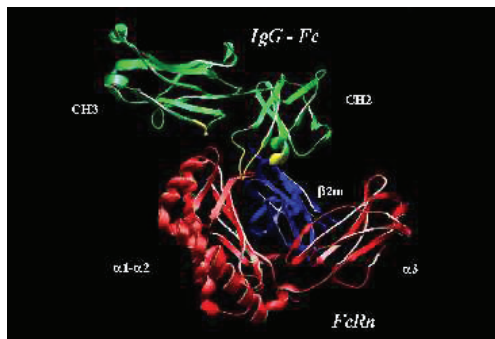
Azt a folyamatot, amelynek során az anya, fajtól függő módon, jelentős mennyiségű immunglobulin transzportjával biztosítja az újszülött életben maradását a magzati élet során vagy az élet első néhány hetében, anyai vagy maternális immunitásnak nevezzük. Ez a rendszer tulajdonképpen egyfajta „immunológiai tapasztalat” közvetítésének is felfogható, hiszen az anyában olyan ellenanyagok találhatók, amelyeket a környezetében található kórokozókkal szemben termelt. Minthogy természetes körülmények között az újszülött élettere megegyezik az anyáéval, az ily módon nyert „tapasztalat” hatásos az újszülöttet fenyegető kórokozók semlegesítésében és a fertőzések megelőzésében is (Kacsokovics, 2003).

F. W. Rogers Brambell és munkatársai már a mai értelemben vett immunológiai ismeretek elterjedése előtt úgy gondolták, hogy az anyai immunglobulin G (IgG) molekulák utódba kerülését egy telíthető receptorrendszer biztosítja (Brambell et al., 1958), majd nem sokkal később felvetették, hogy egy hasonló vagy azonos receptorrendszer védi meg az IgG molekulákat a gyors lebomlástól (Brambell et al., 1964). Ezeket az anyai IgG transzportban résztvevő, illetve a szérumban IgG felezési idejét meghatározó receptorokat nevezték később Brambell receptornak (FcRB). Később egymástól függetlenül többen is bebizonyították (Ghetie et al., 1996; Israel et al., 1996; Junghans and Anderson, 1996), hogy ez a receptor azonos az 1972-ben Jones és Waldman által izolált FcRn molekulával (Jones and Waldmann, 1972). A receptor

elnevezése – neonatális – arra utal, hogy újszülött patkányok vékonybeléből mutatták ki először, ahol az anyatejben található IgG transzportját biztosítja (Jones and Waldmann, 1972).

Ezt követően patkány vékonybélből izolálták a receptort, és kimutatták, hogy két polipeptidláncból felépülő heterodimer fehérje, az egyik lánc körülbelül 50 kDa, míg a másik körülbelül 15 kDa tömegű (Rodewald and Kraehenbuhl, 1984). Már e korai vizsgálatok során nyilvánvalóvá vált az FcRn-IgG interakció szigorú pH-dependens tulajdonsága, azaz az IgG pH 4.0-6.0 kémhatáson kötődik, míg fiziológias (7.4) vagy ennél magasabb pH értéken disszociál a receptorról (Rodewald and Kraehenbuhl, 1984).

A későbbiekben kiderült, hogy az FcRn szerkezetileg és filogenetikailag szoros rokonságot mutat az MHC I molekulával. A patkány FcRn génjének izolálásakor kimutatták, hogy a receptor nehéz- vagy α -lánc a MHC I-hez hasonló, és három extracelluláris doménből, a sejtmembránban lokalizálódó transzmembrán régióból és citoplazmikus farokrészből épül fel. Az α -láncához másodlagos kötőerővel β_2 -mikroglobulin (β_2m) kapcsolódik (Simister and Mostov, 1989) (3. ábra). A későbbiekben röntgenkristallográfiás elemzés is igazolta, hogy az FcRn szerkezete valóban hasonlít az MHC I molekulához (Burmeister et al., 1994).



3. ábra

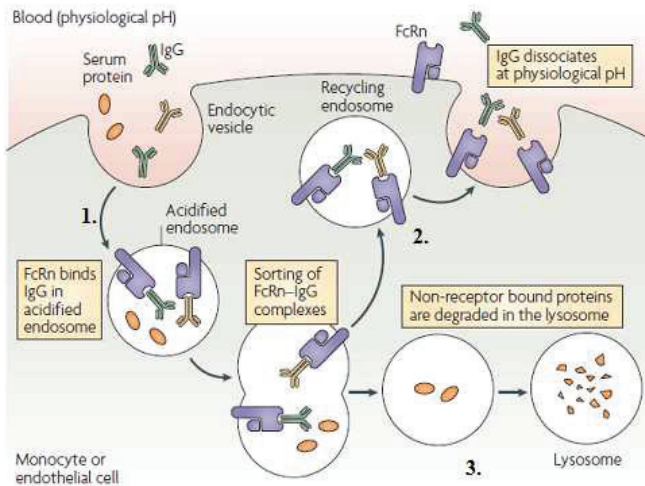
A szarvasmarha FcRn és a kötődött IgG 3D számítógépes modellje

3.4 Az FcRn szerepe az IgG és albumin homeosztázisban

A Brambell és munkatársai az általuk már 1964-ben feltételezett, az anyai IgG transzporttal kapcsolatba hozható és a szérum IgG felezési idejét meghatározó receptorrendszer egyik feladatát abban látták, hogy az IgG molekulák kötésével megóvják azokat a lizoszómális lebontástól (Brambell et al., 1964). Ezt a hipotézist alátámasztották azok a vizsgálatok, melyek kimutatták, hogy az egér IgG CH2 és CH3 doménjének ugyanazon aminosavai vesznek részt az Fc fragmentumok *in vivo* felezési idejének szabályozásában, mint az újszülött vékonybélben keresztüli transzportjában (Kim et al., 1994a, b). Ezt igazolta egymással párhuzamosan több kutatócsoport is, akik vizsgálataik során az FcRn felépítésében szerepet játszó β_2 -mikroglobulint ki nem fejező egerekben kimutatták az IgG illetve IgG-Fc molekulák felgyorsult lebomlását (Ghetie et al., 1996; Israel et al., 1996; Junghans and Anderson, 1996). Hangsúlyozandó, hogy elnevezése ellenére az FcRn kifejeződése nem korlátozódik az újszülöttkori időszakra, hanem felnőttkorban is kimutatható különböző sejt- és szövettípusokban (Ghetie et al., 1996).

Egér IgG1 és Fc-fragmentumok, valamint anti-FcRn ellenanyagok vérkeringésbeli eloszlását tanulmányozva egy munkacsoport az FcRn funkció fő helyeként felnőtt, nem vemhes egérmél a bőrt és izmot jelölte meg, míg a máj és zsírszövet kevésbé volt érintett (a vese, tüdő, lép és vékonybél FcRn funkciója jóval kisebb jelentőségűnek bizonyult). Az egér izom és máj szövettani adatai azt mutatták, hogy az FcRn a kis arteriolák, kapillárisok endotélsejtjeiben expresszálódik, de a nagyobb erekben, mint a centrális vénában vagy a portális keringés ereiben nem lehetett e receptort kimutatni (Borvak et al., 1998). Az FcRn ember esetében is kimutatható volt az endotélsejtekben (Junghans, 1997). A patkány szikzacskó belső csíralemezben kifejeződő FcRn szerepét kutatva megállapították, hogy az FcRn-IgG interakció a sejten belüli apikális vezikulákban zajlik, és nem a sejtek felszínén. A sejt felszínén a receptor expresszióját sem sikerült kimutatni (Roberts et al., 1990). Újabb tanulmányok szerint nem csak a különböző szervek és szövetek kapilláris endotélsejtjeiben, hanem extravaszkulárisan a dendritikus sejtekben, monocitákban és makrofágokban kifejeződő FcRn is hozzájárul az IgG szint szabályozásához (Akilesh et al., 2007; Qiao et al., 2008). Ezekben a sejtekben az FcRn időlegesen megkötí az IgG-t, majd a vérpályába illetve extracelluláris térbe juttatja, aminek hatására ezek az IgG molekulák megmenekülnek a lizoszómális katabolikus folyamatoktól (**4. ábra**). Az FcRn kifejeződését szelektíven csak az endotél és hematopoetikus sejtekben gátolva bizonyítható, hogy ezek a sejtek az FcRn-mediált IgG

homeosztázis fő helyszínei (Montoyo et al., 2009). A modell arra is magyarázattal szolgált, hogy hogyan lehetséges a szérum IgG szintjének szabályozása. Ha az IgG szint csökken, több FcRn áll rendelkezésre az IgG kötéshez, és nagyobb mennyiségű IgG mentesül a lebontástól. Fordítva, ha a szérum IgG szintje emelkedik, az FcRn kötőhelyek telítetté válnak, és növekszik a lebontott IgG aránya.

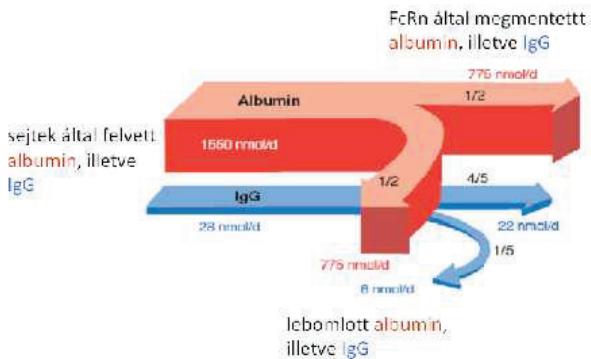


4. ábra Az IgG katabolizmus szabályozása endotélisejtekben

A folyadék fázisú endocitózissal felvételre került IgG a korai endoszómális vezikulumokba kerül (1.), ahol az enyhén savas közegben az FcRn molekulával kapcsolódik. Ezt követően az IgG-FcRn komplex visszajut az apikális plazmamembránra (recycling), ahonnan vagy a vérbe kerül (2.), vagy a sejt bazolaterális oldalra transzportálódva válik le. Minél nagyobb affinitással kapcsolódik egy ligandum az FcRn molekulához, annál hosszabb lesz a felezési ideje (Kim et al., 1994; Medesan et al., 1997), ami megnövekedett *in vivo* aktivitással jár együtt (Zalevsky et al., 2010). Magas IgG koncentráció esetén telítődnek az FcRn receptorok, és így a vele komplexet nem képző IgG molekulák a lizoszómába kerülnek, majd az ott lévő enzimek hatására degradálódnak (3.) (Roopenian and Akilesh, 2007).

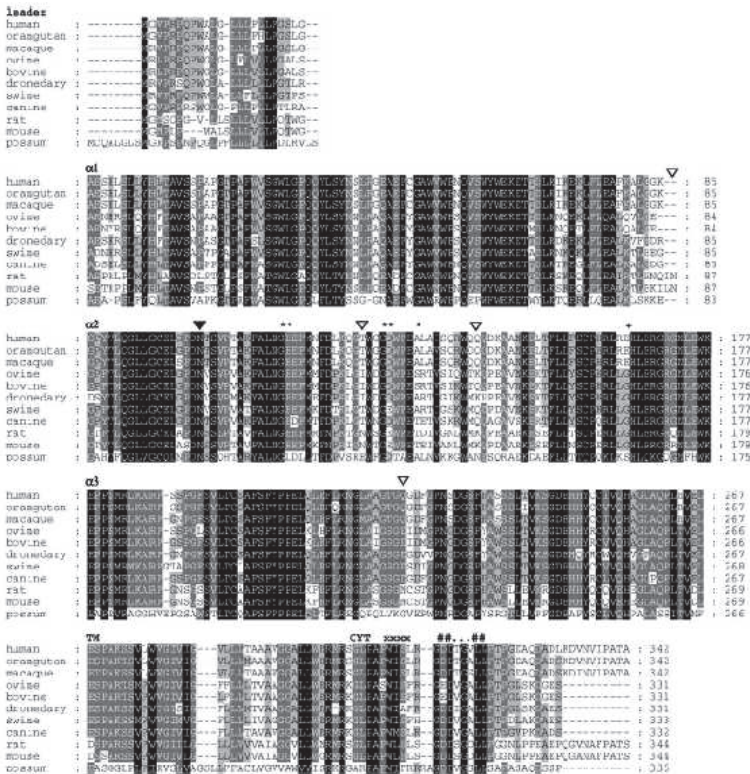
A maternális immunitással kapcsolatos munkássága során Brambell csupán nagyon röviden emlékezett meg az albuminról, az IgG molekulához hasonlóan hosszú féléletidővel rendelkező plazmafehérjéről (Brambell, 1970). Két kortársa, H. E. Schultze és J. F. Heremans feltételezte, hogy az általa vázolt IgG védő mechanizmushoz hasonló létezik az albumin metabolizmusában is, egy más receptor közreműködésével

(Schultze and Heremans, 1966). Csaknem negyven évvel később Chaudhury és munkatársai írták le, hogy az albumin homeosztázisban szerepet játszó receptor megegyezik az FcRn-nel és az interakció ez esetben is szigorú pH-dependenciát mutat (Chaudhury et al., 2003). Későbbi kísérletek során bizonyították, hogy az FcRn egymástól független IgG és albumin kötőhellyel rendelkezik (Chaudhury et al., 2006), és az FcRn α -lánc 166-os (Andersen et al., 2006) és 168-as (Andersen et al., 2010) pozíciójú hisztidin aminosava kritikus az albumin interakció szempontjából, valamint felállították az FcRn-albumin komplex kötődésének részletes modelljét is (Andersen et al., 2012). Kimutatták továbbá, hogy vad típusú egerekhez képest az FcRn-hiányos állatokban az albumin kétszer gyorsabban degradálódik, ami arra utal, hogy az FcRn ugyanannyi albumint ment meg a lebomlástól, mint amennyi termelődik. Megjegyzendő, hogy körülbelül négyszer annyi IgG-t véd meg a receptor, mint amennyit az eger szervezete szintetizál (5. ábra). Mindez arra utal, hogy ezeket az értékes molekulákat egy sajátos mechanizmussal (FcRn) védi a szervezet a lebomlástól.



5. ábra Az FcRn megvédi az albumin és IgG molekulák jelentős hányadát a lebomlástól

A piros, illetve kék nyíl vastagsága a sejtek által felvett albumin, illetve IgG mennyiségével arányos (balról) egy 25 g-os egérre vonatkoztatva. A lizoszómákban lebontásra kerülő molekulák arányát a nyíl elhajló ága reprezentálja, míg a továbbhaladó szár a degradációtól megmentett hányadot szemlélteti. (Anderson et al., 2006) alapján.



7. ábra Különböző fajok FcRn α-lánc szekvenciájának összehasonlítása

Az ember, orangután, makákó, juh, szarvasmarha, dromedár, sertés, kutya, patkány, egér és közönséges rókakuzu FcRn α-láncának szekvenciája, az egyes aminosavak nagyobb fajok közötti konzerváltóságát a háttérszín erősödése jelzi. TM: transzmembrán régió, CYT: citoplazmikus farkok. (Kacsokovics et al., 2006b)

A bFcRn lokalizációjának és funkciójának meghatározására irányuló kísérletek eredményei igazolták, hogy bár az ellés előtt és azt követően is ki lehet mutatni az FcRn jelenlétét a tőgy acinus sejteiben, a receptor sejten belüli lokalizációjában jellegzetes különbség figyelhető meg. Míg az ellés előtti időszakban a receptor diffúzan tölti ki a citoplazmát, addig az ellést követően a receptor elsődlegesen az epitélisejtek apikális/luminális oldalán található, illetve a jel fokozatosan gyengül. Minthogy a tőgy

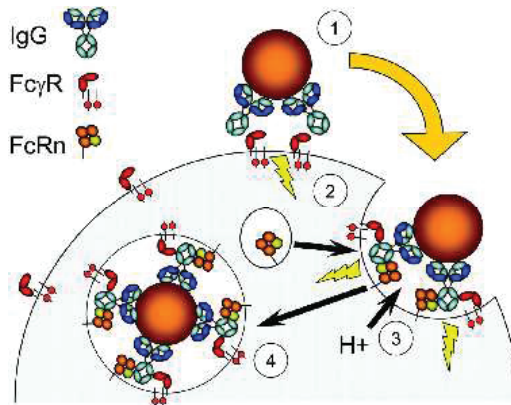
acinus sejtjeiben a korábbiakban csak IgG1 molekulákat detektáltak, feltételezték, hogy a szarvasmarha FcRn is ezeket a molekulákat köti és szekretálja (Mayer et al., 2005). További vizsgálatok során az FcRn kifejeződését a vékonybél kriptasejtjeiben (Mayer et al., 2002), illetve az alsó légutakban is detektálták (Mayer et al., 2004). A bFcRn szerepét a tejmirigy transzportjában ezt követően olyan Tg egérmódelben vizsgálták, amely a bFcRn-t nagymértékben fejezte ki laktáló tejmirigyben és megállapították, hogy a tej fokozott mértékű IgG akkumulációja nem volt kimutatható (Lu et al., 2007). Ezt követően vizsgálták a szarvasmarha IgG1 és IgG2 – bFcRn interakciójának kinetikáját és megállapították, hogy az IgG2 egy nagyságrenddel erősebben kötődik a bFcRn molekulához (Takimori et al., 2011). Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a szarvasmarha tejmirigyben az FcRn szerepe az IgG molekulák visszajuttatása a keringésbe, és nem azok tejbe irányuló szekréciója, hasonlóképpen ahhoz, mint amit korábbi vizsgálatok alapján az egér és a humán tejmirigyben is leírtak (Cianga et al., 2003; Cianga et al., 1999).

Tekintettel arra, hogy a többi állatfajhoz hasonlóan az IgG1 és IgG2 alosztálynak hosszú a felezési ideje (bár az IgG2 felezési ideje hosszabb (Butler, 1983)), feltételezhető volt, hogy az FcRn is expresszálódik az endotélsejtokban és védi az IgG molekulákat a gyors lebomlástól. Míg az endotélsejtek FcRn expresszióját immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazolták, addig az FcRn IgG katabolizmusát befolyásoló szerepét funkcionális elemzésekkel erősítették meg (Kacsokovics et al., 2006a). Ennek kapcsán először kimutatták, hogy az emberi IgG hatékonyan kapcsolódik a szarvasmarha FcRn receptorhoz, sőt ez az interakció lényegesen erősebb, mint a szarvasmarha IgG-FcRn kapcsolat. Figyelembevéve, hogy más állatfajokban végzett vizsgálatok közvetlen összefüggést mutattak az IgG-FcRn kapcsolat erőssége és az IgG felezési ideje között (azaz minél erősebb a kapcsolat, annál hosszabb a felezési idő) (Ghetie and Ward, 2002), feltételezhető volt, hogy az emberi IgG felezési ideje szarvasmarhában meghaladja a szarvasmarha IgG féléletidejét. Humán IgG-t normál, illetve humán IgG-t termelő transzkromoszómális borjakba fecskendezve igazolódott, hogy az emberi IgG felezési ideje ezekben az állatokban lényegesen hosszabb, mint a szarvasmarha IgG felezési ideje, vagyis a szarvasmarha FcRn hatékonyan védi meg a vérben keringő humán IgG molekulákat a lebomlástól (Kacsokovics et al., 2006a). Azóta az is kiderült, hogy az IgG2 felezési ideje azért hosszabb, mint az IgG1 izotípusé, mert az IgG2 erősebben kötődik az FcRn-hez (Takimori et al., 2011).

3.6 Az FcRn szerepe a fagocitózis és antigén prezentáció folyamatában

Mivel az FcRn jelenlétét már korábban kimutatták monocitákból, makrofágokból és dendritikus sejtekből, ezért felmerült a lehetőség, hogy a receptor a fagocitózis folyamatában is szerepet játszik (Zhu et al., 2001). Bebizonyosodott továbbá, miszerint neutrofil granulocitákban az FcRn-hez kötődés elengedhetetlen az IgG-vel opsonizált baktérium optimális fagocitózisához (8. ábra) (Vidarsson et al., 2006).

Egy további FcRn-hez köthető funkció a humán bélsejtekben játszódik le. Az itt kifejeződő receptor az IgG molekulákat az epitélsejteken keresztül a bél lumenébe szállítja, ahol azok a jelenlévő antigénekhez kötődnek. Ezt követően az immunkomplexeket a receptor visszaforgatja a lamina propriába a dendritikus sejtek számára, amelyek az immunkomplexeket feldolgozzák, és a CD4+ T sejteknek bemutatják (Yoshida et al., 2004).



8. ábra Az FcRn szerepe a fagocitózisban (Vidarsson et al., 2006)

A folyamat első lépéseként a baktériumon lévő IgG hozzákapcsolódik a leukocita sejtfelszíni FcγR-hoz (1.), elindítva ezzel a belső szignalizációs folyamatokat (FcR-ITAM) (2.), aminek eredményeképpen az FcRn-molekulák a granulumokból kiszabadulva a fagoszómákba transzlokálódnak. Emellett a proton pumpát tartalmazó granulumok fúziójával a fagoszómák savasodni kezdenek, melynek következtében az FcRn hozzákapcsolódik az IgG molekulához (3.). Ez a folyamat végül a célsejt internalizációját eredményezi (4.)

A közelmúltban igazolták azt is, hogy az FcRn képes immunkomplexeket lizoszómákba irányítani dendritikus sejtekben, ezáltal fokozva az antigén prezentációt (Qiao et al., 2008). Habár a korai vizsgálatok során nem tudták igazolni az FcRn kifejeződését B sejtvonalakban és primer B sejtekben (Akilesh et al., 2007; Ghetie et al., 1996; Zhu et al., 2001), később kimutatták a receptor jelenlétét eger lép B sejtekben (Mi et al., 2008; Montoyo et al., 2009). Ezen eredmények alapján az FcRn valamennyi professzionális antigénprezentáló sejtben (APC) kifejeződik. Az antigénprezentáló sejtekben kifejeződő invariáns lánc kapcsolódhat az FcRn-nel és a lizoszómákba irányíthatja azt (Ye et al., 2008), így az FcRn-nek szerepe lehet a sejtben belüli transzportfolyamatok és az antigén prezentáció befolyásolásában.

A legújabb vizsgálatok alapján az endoszómában lokalizálódó FcRn fokozza a monomer immunkomplex prezentációját; a fagoszómákba jutott immunkomplexek esetén makrofágokban hasonló hatás figyelhető meg, míg dendritikus sejtekben az FcRn hiánya nem befolyásolja a folyamatot. A két sejtípusban lezajló folyamat különbségét a fagoszómák kémhatásának eltéréseivel magyarázzák (Liu et al., 2011). Egy másik tanulmányban leírtak szerint az FcRn szükséges az immunkomplexek keresztprezentációjához is (Baker et al., 2011).

3.7 Módosított FcRn expressziójú (KO és Tg) modellállatok áttekintése

Az FcRn funkciójának tanulmányozása kezdetekben a heterodimer receptor egyik alkotóelemét, a β_2 -mikroglobulint (β_2m) kifejezni képtelen egerekben zajlott, melyek rávilágítottak a receptor IgG homeosztázisban betöltött szerepére: működőképes FcRn hiányában a maternális immuntranszport sérül, az IgG molekulák katabolizmusra felgyorsul, féléletideje csökken (Ghetie et al., 1996; Israel et al., 1995; Israel et al., 1996; Junghans and Anderson, 1996). Egy korábbi tanulmányban ismertették, hogy β_2m hiányos egerekben annak ellenére alacsonyabb IgG szint mérhető, hogy normál B-sejt készlettel rendelkeznek (Spriggs et al., 1992), így az IgG koncentráció csökkenése a fokozott IgG katabolizmusnak tulajdonítható.

Mivel a β_2m hiányos egerekben nem csak az FcRn funkciója sérül, hanem gyakorlatilag nem jelenik meg megfelelő konformációjú MHC I molekula a sejtjeik felszínén és CD8+ T-sejtjeik száma is drasztikusan csökken (Koller et al., 1990; Zijlstra et al., 1990), így e modellek nem tették lehetővé az FcRn célzott, szelektív vizsgálatát. A β_2 -

mikroglobulint nem expresszáló egerek helyett az FcRn α -lánc génkiütött (knock-out, KO) egerek kínáltak lehetőséget a receptor által mediált folyamatok meghatározására. Ezek a vizsgálatok megerősítették, hogy az FcRn szabályozza a perinatális IgG transzportot, IgG és albumin homeosztázist, valamint az IgG-Fc-kapcsolt terápiás készítmények sorsát, illetve az antigén prezentációt (Chaudhury et al., 2003; Qiao et al., 2008; Roopenian et al., 2003). Ezekben az egerekben mind a normál szérums IgG koncentrációja, mind az immunizálást követő antigén-specifikus és totál IgG szintje alacsonyabb volt a vt kontrollokhoz képest, de mivel a lépben és a csontvelőben azonos számban volt kimutatható antigén-specifikus IgG-t termelő plazmasejt, így valószínűsítették, hogy az alacsony szérums IgG szint e molekulák megnövekedett kiürülésével magyarázható (Roopenian et al., 2003).

Az egér FcRn bélrendszeri antimikrobiális immunitásban betöltött szerepének elemzése érdekében létrehoztak egy egértörzset, amely az egér FcRn α -láncát és az egér β_2 -mikroglobulint kizárólag az intesztinális epitélium sejtjeiben expresszálja (IFAB-mFcRnTg/m β_2 mTg/mFcRn^{-/-}) (Yoshida et al., 2006), míg az FcRn-mediált IgG homeosztázis fő helyszínének vizsgálatára kialakított egértörzsből az FcRn kifejeződését szelektíven csak az endotél és hematopoetikus sejtekben gátolták (Montoyo et al., 2009).

Az FcRn fajspecifikus tulajdonságai jobban megérthetők az FcRn α -lánc kifejeztetése révén: az emberi FcRn – emberi IgG molekulák interakciójának *in vivo* tanulmányozásának elősegítése érdekében egér FcRn KO (mFcRn^{-/-}), valamint humán endogén promóter szabályozása alatt álló humán FcRn transzgenikus (hFcRnTg) egereket hoztak létre (Roopenian et al., 2003). Később ezeket a hFcRnTg állatokat keresztezték korábban létrehozott humán β_2 m transzgenikus (Krimpenfort et al., 1987), majd pedig az mFcRn^{-/-} egyedekkel (hFcRnTg/ β_2 mTg/mFcRn^{-/-}) (Yoshida et al., 2004). Egy másik, humán citomegalovírus enhancer és csirke β -aktin / nyúl β -globin hibrid promóter által szabályozott hFcRn Tg egértörzset is kialakítottak; mindkét modellállatot vizsgálták a terápiás ellenanyagok farmakokinetikai vizsgálatára való alkalmasság szempontjából (Roopenian et al., 2010), valamint számos klinikai kémiai paraméter tekintetében (Stein et al., 2012).

Az ember FcRn molekuláján kívül a szarvasmarha FcRn expresszió hatásait is tanulmányozták transzgenikus egérmodellben. Az egyik esetben a bFcRn tejbe történő IgG transzportjának folyamatát vizsgálták egy endogén egér FcRn-t is kifejező törzsből, melyben a tejmirigy-specifikus β -kazein promóter szabályozza a bFcRn α -

lánc és bovin β_2m kifejeződését a transzgenikus egerek tejmirigyében (Lu et al., 2007). A Tg állatok szérumában és tejében szignifikánsan magasabb IgG szintet mértek, és a beinjektált humán IgG felezési ideje is hosszabbnak bizonyult, ami arra utal, hogy bFcRn hatékonyan köti és védi meg a lebomlástól mind az endogén egér IgG-t, mind az exogén humán IgG molekulákat. A Tg nőstény egerek tejében nem volt kimutatható sem az endogén egér IgG, sem az állatokba fecskendezett bovin IgG felhalmozódása, ami egy korábbi feltételezést (Cianga et al., 1999) megerősítve arra utal, hogy az IgG tejebe irányuló transzportja fordítottan arányos az FcRn iránti kötési erősségével (Lu et al., 2007) (ld. korábban).

A bFcRn overexpresszió hatásainak elemzésére Bösze és Kacs Kovics hozott létre mesterséges bakteriális kromoszóma (BAC) transzgenikus egereket FVB/N genetikai háttéren. A szarvasmarha BAC genomi könyvtárból izolált 102 kb hosszúságú klón magában foglalja a receptor α -lánc teljes kódoló szakaszát és a gén 20, illetve 70 kb hosszú határoló régióját az 5' és 3' irányban. Az eljárás során két független, a mendeli szabályoknak megfelelően örökítő transzgenikus egervonalat alapítottak, az egyik vonal (#14) egyedei 2, illetve 4, míg a másik vonal (#19) egyedei 5, illetve 10 kópiában hordozzák a bFcRn-t hemi-, illetve homozigóta formában; ezek az egerek az endogén egér FcRn-t is kifejezik. A transzgen bFcRn szövet- és kópiaszám-függő kifejeződését mRNS és fehérje szinten is igazolták Northern blot és Western blot technikával (Bender et al., 2007). Saját vizsgálataimat is ezeken az állatmodelleken végeztem.

4 Célkitűzések

4.1 bFcRn overexpresszió IgG védő hatásának vizsgálata (az IgG felezési idejének meghatározása) *in vivo* transzgenikus egérmodellen

- Vérpályába fecskendezett egér IgG1 felezési idejének meghatározása FVB/N háttérű vt és bFcRn Tg egerekben
- Vérpályába fecskendezett kétféle dózisu humán IgG felezési idejének meghatározása FVB/N háttérű vt és bFcRn Tg egerekben

4.2 bFcRn overexpresszió humorális immunválaszra gyakorolt egyes paramétereinek vizsgálata *in vivo* transzgenikus egérmodellen

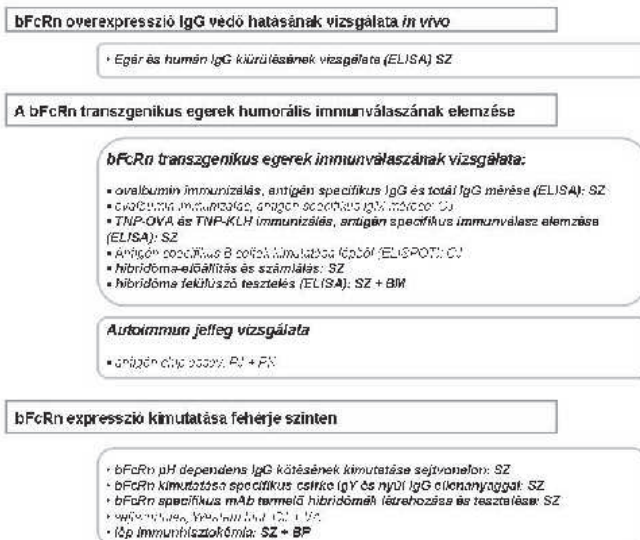
- T-dependens antigénnel (ovalbumin) történő immunizálás hatására képződő antigén specifikus IgG titerének, valamint a totál IgG koncentrációjának meghatározása és összehasonlítása vt és bFcRn Tg egerekben
- Balb/c háttérre keresztezést követően az immunizálatlan vt és Tg egerek szérumbeli totál IgG és albumin koncentrációjának meghatározása
- Kétféle konjugátummal (TNP-OVA, TNP-KLH) történő immunizálást követően a Balb/c vt és Tg egerek haptén és hordozó specifikus IgG titerének összehasonlítása, a lépsejtek és antigén specifikus lépsejtek számának meghatározása
- A TNP-OVA és TNP-KLH immunizált egerekből származó lépsejtek fúzionáltatása Sp2/0-Ag14 mielóma sejtekkel, és a keletkező hibridómák, valamint az antigén specifikus IgM és IgG pozitív hibridóma mikrokultúrák számának és arányának összehasonlítása vt és Tg egerek esetén
- Autoimmun ellenanyagok monitorozása idős (7-10 hónapos) vt és Tg egerek szérumból

4.3 FcRn expresszió kimutatása transzgenikus egér sejteken és szöveteken

- Konfokális mikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatok pH-dependens FcRn-IgG interakció kimutatására (bFcRn-t natív, funkcióképes állapotban alapszinten expresszáló és overexpresszáló sejtvonal segítségével)

- A munkacsoport által korábban létrehozott bFcRn α -lánc egy konzervatív szakaszát reprezentáló peptidre specifikus nyúlban termelt poliklonális ellenanyag fluoreszcens mikroszkópos tesztrendszerben történő beállítása és vizsgálata
- bFcRn specifikus egér monoklonális ellenanyagot termelő hibridómasejtek előállítás, ELISA, Western blot és konfokális mikroszkópos tesztrendszerben történő beállítása és vizsgálata
- A munkacsoport által korábban létrehozott, szolubilis bFcRn-re specifikus, csirkében termelt poliklonális ellenanyag fluoreszcens mikroszkópos tesztrendszerben történő beállítása, immunizálatlan vt és bFcRn Tg egerek lépének vizsgálata

Munkám során a bFcRn transzgenikus egerek immunválaszának karakterizálására irányuló fenti kísérleteket munkatársaimmal szoros együttműködésben végeztem, az egyes részfeladatokkal kapcsolatos munkamegosztást a **9. ábra** szemlélteti.



BP: Balogh Péter, BM: Buzsáki Mária, CJ: Csizsáncz János, FN: Fodor Kriszta, PJ: Pék Judit, SZ: Székelydi Zita, KA: Kéri Anikó.

9. ábra A dolgozatban szereplő részfeladatok munkamegosztása

5 Anyag és módszer

5.1 Kísérleti állatok

Vizsgálataink során egyrészt FVB/N genetikai háttérű vad típusú (vt), illetve ugyanilyen genetikai háttéren létrehozott bFcRn transzgenikus (Tg) egereket használtunk, melyek a bFcRn α -lánc génjét tartalmazó mesterséges bakteriális kromoszóma (bacterial artificial chromosome, BAC) megtermékenyített egér oocitákba történő mikroinjektálásával állítottunk elő (Bender et al., 2007). Ezzel a módszerrel két, a bFcRn-t különböző kópiaszámban expresszáló egértörzs jött létre, melyek közül kísérleteinkhez a #14-es vonal homozigóta és a #19-es vonal heterozigóta egyedeket használtuk, 4 (FVB/N_{tg4}), illetve 5 (FVB/N_{tg5}) kópiaszámú receptor expresszióval.

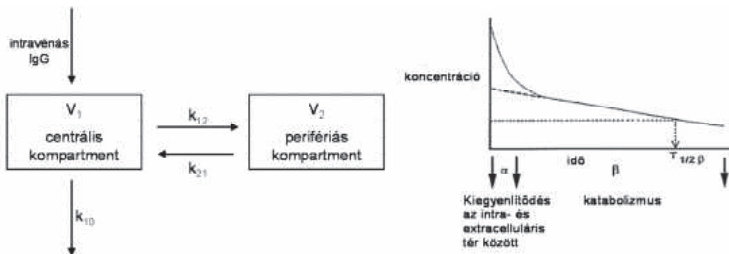
A hibridóma-előállításához használt Balb/c_{tg5} vonalat az FVB/N_{tg5} törzs Balb/c háttérre történő átkeresztelésével állították elő, melynek több, mint 10. generációs egyedeket használtuk, így azok kongenikusnak minősülnek (Flaherty, 1981; Silver, 1995), vagyis egyedük csak egyetlen gén-lókuszbán (bFcRn α -lánc génje) különböznek egymástól. A vt kontroll állatok mindkét genetikai háttér esetében a Charles River Laboratories budapesti telephelyéről származtak. Az FVB/N háttérű egereket a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont konvencionális állatházában, a Balb/c háttérű egereket az ELTE Immunológiai Tanszékének állatházában tartottuk meghatározott kórokozóktól mentes (SPF) körülmények között.

Az autoreaktív ellenanyagok szintjének kimutatásához 7-10 hónapos Balb/c_{tg5} és kontroll állatokat, illetve pozitív kontrollként fehérjevizelés és lupus betegség (SLE) tüneteit mutató 6 hónapos MRL/lpr egér szérumát használtuk. Az állatkísérletek a hatályos állatvédelmi jogszabályokkal és a 22.1/828/003/2007 számú, Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi és Állatvédelmi Igazgatóság által kiadott engedéllyel összhangban kerültek elvégzésre, a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság engedélye alapján és az egyetem állatkísérleti szabályzatában (etikai kódexében) foglaltaknak megfelelően.

5.2 IgG-kiürülés elemzése

Monoklonális eger IgG1 kiürülésének vizsgálatához megegyező korú és nemű vad típusú illetve homozigóta 4 kópiás bFcRn tg egerekbe (FVB/N háttér) 10 mg/ttkg ovalbumin specifikus monoklonális eger IgG1-et (Sigma-Aldrich Company) injektáltunk intravénásan. Az injektálás előtt, majd azt követően rendszeres időközönként (0, 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 óra) 50 µl vért vettünk a retroorbitális plexusból, melyet szobahőmérsékleten hagytunk megalvadni, a centrifugálást követően nyert szérumot felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A humán IgG kiürülésének vizsgálata analóg módon történt, 10 illetve 20 mg/ttkg humán IgG (Gammonativ, OctaPharma) iv injektálásával.

A kiürülés vizsgálat során meghatározott időközönként vett vérminták szérumából az injektált monoklonális eger IgG, valamint humán IgG koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg. A 96 lyukú ELISA lemezeket (Corning Inc.) 5 µg/ml OVA vagy 2 µg/ml humán IgG specifikus kecske IgG (Pierce) 0,1 M nátrium-karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9,6) hígított oldatával fedtük. Szobahőmérsékleten 2 órán át tartó inkubálást követően a lemezeket 0,05 % Tween-20 detergenst tartalmazó 0,1 M PBS oldattal (PBS-T) mostuk. Blokkoláshoz 1 % BSA-t tartalmazó PBS oldatot használtunk. A mosási lépést követően a megfelelő hígítású mintákat a lemezekre pipettáztuk és 1 órán át állni hagytuk, majd a mosás után tormaperoxidázzal (HRP) konjugált eger IgG specifikus ellenanyagot (Southern Biotechnology Associates Inc.) adtunk a rendszerhez. A kötődött tormaperoxidáz-konjugált ellenanyagokat ortofeniléndiamin (OPD, Fluka Chemie GmbH) szubsztráttal mutattuk ki, a lezajlott színreakció mértékét Multiscan EX Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc) készüléken 405 nm hullámhosszon mértük. A szérum minták injektált IgG koncentrációját ismert koncentrációjú standard sorhoz viszonyítva GraphPad Prizm 4 program segítségével, a felezési időt a WinNonLin professional 5.1 program (Pharsight Corp.) kétkompartmentes, nem-lineáris regressziószámítási modelljével határoztuk meg (ahogy mások, (Datta-Mannan et al., 2007; Garg and Balthasar, 2007, 2009; Igawa et al., 2010). A mintákat triplikátumban mértük, az egyes lépések között a lemezt ötször mostuk PBS-T oldattal.



10. ábra A vérpályába fecskendezett IgG megoszlásának és kétfázisú kiürülésének sematikus modellje

(A) Az intravénás IgG a centrális kompartmentbe kerül, majd megoszlik a perifériás kompartmentben is. A két kompartment között dinamikus anyagáramlás zajlik, a befecskendezett anyag mennyiségét elimináció csökkenti.

(B) A befecskendezett IgG vérbeli koncentrációját reprezentáló kétfázisú görbe első fázisa (α -fázis) az intra- és extravaszkuláris kompartmentek közötti gyors megoszlást ábrázolja, míg a második fázis (β -fázis) az FcRn függő lassú eliminációt jeleníti meg

5.3 Antigének és immunizálási protokollok

A kísérletek során használt állatok, antigének és immunizálási stratégiák jellemzőit az alábbiakban kísérletenként ismertetem. Az ovalbumin (OVA) és kulcslyuk csiga hemocianin (KLH) (Sigma-Aldrich Company) konjugátumok Rittenberg és Amkraut módszerének alkalmazásával készültek (Rittenberg and Amkraut, 1966), melynek során az antigéneket trinitrobenzén szulfonsavval (Pierce Chemical Company) reagáltattuk. A TNP specifikus ellenanyagok kimutatását célzó ELISA módszer során hasonló módon elkészített TNP-BSA konjugátumot használtunk a lemezek fedésére. Az immunizálás során az állatoktól rendszeres időközönként vért vettünk, és a szérumot felhasználásig - 20 °C-on tároltuk.

5.3.1 Ovalbumin (OVA) immunizálás

Megegyező életkorú és nemű, FVB/N háttérű vt, illetve 4 és 5 kópiás bFcRn tg egereket (5 állat csoportonként) immunizáltunk ovalbuminnal. Az első oltás (0. nap) állatonként 250 μ g OVA és komplett Freund adjuváns (CFA) hasüregbe (intrapéritoneális, ip) történő injektálásával történt, melyet a 14. napon 250 μ g OVA és inkomplett Freund adjuváns (IFA) ip oltása követett.

5.3.2 Trinitrofenillel konjugált ovalbumin (TNP-OVA) immunizálás

Megegyező életkorú és nemű, Balb/c háttérű vad típusú, illetve 5 kópiás bFcRn tg egereket (3 állat csoportonként) immunizáltunk TNP-OVA antigénnel. Az első oltás (0. nap) állatonként 200 µg TNP-OVA és CFA ip injektálásával történt, melyet a 21. napon 100 µg TNP-OVA és IFA ip. oltása követett. Végül az immunizálás 43. napján 50 µg antigént ip és 50 µg antigént intravénásan (iv) juttattunk az állatok szervezetébe.

5.3.3 Trinitrofenillel konjugált kulcslyuk csiga hemocianin (TNP-KLH) immunizálás

Megegyező életkorú és nemű, Balb/c háttérű vad típusú, illetve 5 kópiás bFcRn tg egereket (4 állat csoportonként) immunizáltunk TNP-KLH antigénnel. Az első oltás (0. nap) állatonként 200 µg antigén és CFA ip injektálásával történt, melyet a 21. és 43. napon 100 µg TNP-OVA és IFA ip. oltása követett. Végül az immunizálás 70. napján 50 µg antigént ip és megegyező mennyiséget iv oltottunk állatonként.

5.3.4 Immunizálás rekombináns szolubilis bFcRn (sbFcRn) fehérjével

Két hónapos Balb/c háttérű vad típusú egeret 50 µg szolubilis bFcRn (sbFcRn) és CFA homogenizátumával oltottunk ip. A sbFcRn molekula a bFcRn α -lánc és bovin β_2 -mikroglobulin rekombináns úton előállított, funkcionális egysége, amely nem tartalmazza a receptor transzmembrán és citoplazmikus régióját (Kacs Kovics et al., 2006a). Az első oltást követő 23. és 42. napon 50 µg antigén és IFA adjuváns homogenizátumával oltottunk ip., majd a 63. napon 25 µg antigént iv és 25 µg antigént ip injektáltunk.

5.4 Ellenanyagok szintjének mérése

5.4.1 Totál IgG és albumin koncentráció meghatározása szérumból

A megegyező korú és nemű ovalbuminnal immunizált 4 és 5 kópiás FVB/N (5.4.1), valamint az immunizálatlan 5 kópiás Balb/c genetikai háttérű egerekből vett vérmintákból származó szérum totál egér IgG koncentrációját ELISA módszerrel elemeztük. A 96 lyukű ELISA lemezeket (Corning Inc.) 2 µg/ml egér IgG specifikus poliklonális kecske ellenanyag (Southern Biotechnology Associates Inc.) 0,1 M

nátrium-karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9,6) hígított oldatával fedtük. Szobahőmérsékleten 2 órán át tartó inkubálást követően a lemezeket 0,05 % Tween-20 detergenst tartalmazó 0,1 M PBS oldattal (PBS-T) mostuk. Ezt követően az ismert koncentrációjú egér IgG-ből (Sigma) álló standard sort, illetve a standard sor lineáris szakaszára esően hígított szérum mintákat a lemezekre pipettáztuk és 1 órán át állni hagytuk, majd a mosás után tormaperoxidázzal (HRP) konjugált egér IgG specifikus ellenanyagot (1:4000 hígítás, Southern Biotechnology Associates Inc.) adtunk a rendszerhez. A kötődött tormaperoxidáz-konjugált ellenanyagokat 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin (TMB, Sigma-Aldrich Company) szubsztráttal mutattuk ki, a lezajlott színreakció mértékét Multiscan EX Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc) készüléken 450 nm hullámhosszon mértük. A szérum minták standard sorhoz viszonyított totál egér IgG koncentrációját GraphPad Prizm 4 program segítségével határoztuk meg. A mintákat duplikátumban mértük, az egyes lépések között a lemezt ötször mostuk PBS-T oldattal.

Az immunizálatlan Balb/c háterű vt illetve 5 kópiás Tg egerek szérum albumin koncentrációjának meghatározása során a 96 lyukú ELISA lemezeket (Corning Inc.) 5 µg/ml egér albumin specifikus poliklonális kecskében termelt ellenanyag (Bethyl Laboratories Inc.) 0,1 M nátrium-karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9,6) hígított oldatával fedtük. A lemezeket 2 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd albumin blokkoló oldattal fedtük, ezt követően az ismert koncentrációjú egér albuminból (Sigma-Aldrich Comp.) álló standard sort, illetve a standard sor lineáris szakaszára esően hígított szérum mintákat a lemezekre pipettáztuk és 1 órán át állni hagytuk, majd mosási lépést követően HRP-konjugált egér albumin specifikus ellenanyagot (1:10000 hígítás, Bethyl Laboratories Inc.) adtunk a rendszerhez. A kötődött tormaperoxidáz-konjugált ellenanyagokat 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin (TMB, Sigma-Aldrich Company) szubsztráttal mutattuk ki, a lezajlott színreakció mértékét Multiscan EX Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc) készüléken 450 nm hullámhosszon mértük. A szérum minták standard sorhoz viszonyított szérum albumin koncentrációját GraphPad Prizm 4 program segítségével határoztuk meg. A mintákat duplikátumban mértük, az egyes lépések között a lemezt ötször mostuk albumin hígító oldattal.

5.4.2 OVA, TNP és KLH specifikus IgM és IgG meghatározása immunizált állatok szérumból és hibridóma felülűszóból

Az immunizálás során a kísérleti állatokból rendszeres időközönként vett vérmintákból származó szérum, illetve a 96 lyukú sejtenyészítő lemezekből vett hibridóma felülűszó antigén specifikus ellenanyag tartalmát ELISA módszerrel elemeztük. Az OVA, TNP és KLH specifikus IgG és IgM titer meghatározása során 96 lyukú ELISA lemezeket (Corning Inc.) 5 µg/ml OVA, TNP-BSA vagy KLH 0,1 M nátrium-karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9,6) hígított oldatával fedtük. Szobahőmérsékleten 2 órán át tartó inkubálást követően a lemezeket 0,05 % Tween-20 detergenst tartalmazó 0,1 M PBS oldattal (PBS-T) mostuk. Ezt követően a szérumok megfelelő hígítási sorozatát, illetve a kétszeres hígítású felülűszó mintákat a lemezekre pipettáztuk és 1 órán át állni hagytuk, majd a mosás után tormaperoxidázzal (HRP) konjugált egér IgG specifikus ellenanyagot (Southern Biotechnology Associates Inc.) adtunk a rendszerhez. A kötődött tormaperoxidáz-konjugált ellenanyagokat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB, Sigma-Aldrich Company) szubsztráttal mutattuk ki, a lezajlott színreakció mértékét Multiscan EX Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc) készüléken 450 nm hullámhosszon mértük. A szérum minták antigén specifikus IgG titer értékét (maximális kötődése feléhez tartozó szérum hígítási fok) GraphPad Prizm 4 program segítségével határoztuk meg. A mintákat duplikátumban mértük, az egyes lépések között a lemezt ötször mostuk PBS-T oldattal.

5.5 Antigén specifikus B sejtek kimutatása (ELISPOT)

A MultiScreen-HTS mikrotiter lemezeket (Millipore) 20 µg/ml TNP-BSA-val vagy KLH-val fedtük PBS pufferben és 3 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután a lemezeket hatszor mostuk PBS-sel, majd RPMI-1640 + 5 % FCS + MeOH médiummal 30 percig blokkoltuk a szabadon maradt kötőhelyeket. Ennek eltávolítása után a lépések megfelelő hígítási sorozatát a blokkoláshoz használt médiumban a lemezekre pipettáztuk és 37°C-os termosztátban, 5% CO₂ tartalom mellett inkubáltuk egy éjszakán át. A mosási lépést (PBS-T) követően a sejtek által termelt és felszínhez kötődött ellenanyagokat HRP-konjugált egér IgM vagy IgG specifikus kecske ellenanyaggal (Southern Biotechnology Associates Inc.) jelöltük. Az 1 óra szobahőmérsékleten történt inkubálást követően háromszor PBS-T-vel, majd háromszor PBS-sel mostuk a

lemezeket. Az előhívás szobahőmérsékleten, hidrogén-peroxid jelenlétében 3-amino-9-etilkarbazol (AEC, Sigma) szubsztráttal történt, a színreakciót vizes mosással állítottuk le. Az eredményt ImmunoScan ELISPOT reader (Cellular Technology Ltd.) készülék segítségével olvastuk le és ImmunoSpot 3.2 program segítségével értékeltük.

5.6 Hibridóma-előállítás

A kísérleti egerek lépéből nyert sejtek 1/3-ad (TNP-OVA immunizálás) illetve 1/4-ed (TNP-KLH immunizálás) részét gyűjtöttük össze csoportonként, így egy-egy állatnak megfelelő mennyiségű sejtet végeztük el a fúziót az egyedenkénti variabilitás csökkentése érdekében. Egy ml mennyiségű polietilén-glikol (PEG, Sigma-Aldrich Company) lassú hozzáadásával a lépsejteket Sp2/0-Ag14 mielóma sejtekkel fuzionáltattuk 5:1 arányban. A keletkezett hibridómák szelekciója DMEM + 10 % FCS + MeOH + HAT médiumban, 96 lyukú sejtenyésző lemezekon (Corning Inc.) történt. A hibridómák mikroszkóp segítségével történő megszámlálására a fúziót követő 6. és 7. napon került sor.

A sbFcRn specifikus hibridóma előállítása ezzel analóg módon történt, az állatból kinyert összes lépsejt fuzionáltatásával.

5.7 Autoreaktív ellenanyagok kimutatása

A vizsgálathoz használt dupla szálú DNS-t (dsDNS, Sigma) borjú pajzsmirigyből izolált DNS jelentette, a denaturált szimpla szálú DNS (ssDNS) ebből készült 95 °C-on 10 perces inkubációt követő jeges hűtéssel. Nukleoszóma kivonatot korábban leírt módon állítottunk elő (Voynova et al., 2005) BL41 humán limfóma sejtek felhasználásával. Az oldatok DNS koncentrációja OD260 érték alapján 0,6 mg/ml volt. A hiszton II-A fehérjét a Sigma-Aldrich Co-tól, a Jo-1 antigént az Arotec Diagnostic Limited cégtől (Wellington, New Zealand) szereztük be.

Az antigéneket triplikátumban nitrocellulózzal borított tárgylemezekre nyomtattuk (FAST-slides, Whatman, Kent, UK) BioOdyssey Calligrapher miniarrayer készülék segítségével (BioRad, CA) és felhasználásig 4 °C-on lezárt tasakban tároltuk. A szárított lemezeket használat előtt PBS-ben inkubáltuk 15 percig, majd 20 % szérummal 37 oC-

on egy órán át blokkoltuk, a mintákat 5 % BSA, 2,5 mM Ca²⁺ és 0,7 mM Mg²⁺ tartalmú veronál pufferben hígítottuk. Ezt követően a lemezeket PBS-T oldattal mostuk és 1:5000 hígítású Cy5-konjugált kecskében termelt egér IgG specifikus reagenssel inkubáltuk (szobahőmérséklet, 30 perc, 5 % BSA-val kiegészített PBS-T-ben hígítva). Mosási lépés után a lemezeket megszáritottuk és a jeleket Axon GenePix 4200A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) készülékkel rögzítettük. A felvételeket GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices, Corp.) szoftver segítségével elemeztük, minden pont esetében kiszámolva a fluoreszcencia intenzitás (FI) értékét ($FI = \frac{FI_{\text{medián(pontok pixele)}}}{FI_{\text{medián(helyi háttér pixele)}}$), a további analízishez a triplikátumok medián értékét használtuk.

5.8 Fluoreszcens immuncitokémia

5.8.1 A bFcRn funkcióképességének (IgG kötő képességének) vizsgálata sejtvonalon

A teszteléshez használt MacT szarvasmarha tőgyhámepítél sejteket, illetve annak bFcRn α -láncát overexpresszáló változatát (B4) (Kacs Kovics et al., 2006a) 8-lyukú boroszilikát sejtenyésző lemezre (Nunc) szélesztettük és a kísérlet előtt 30 percig FCS mentes DMEM médiumban tartottuk. Ezt követően a sejtekhez pH 6.0 és pH 7,4 kémhatású FCS mentes médiumban Alexa Fluor 488-konjugált kecske IgG és F(ab')₂, valamint LysoTracker reagenst (Molecular Probes) adtunk. Egy órással, 37 °C-on zajló inkubálást követően a sejteket a megfelelő kémhatású pufferrel mostuk, a konfokális lézerpászttázó mikroszkópos felvételeket Olympus IX81 mikroszkóp és Fluoview500 program segítségével készítettük.

5.8.2 A bFcRn specifikus poliklonális nyúl és csirke ellenanyagok tesztelése sejtvonalon

A teszteléshez használt MacT szarvasmarha tőgyhámepítél sejteket, illetve annak bFcRn-t overexpresszáló változatát (B4) (Kacs Kovics et al., 2006a) 8-lyukú boroszilikát sejtenyésző lemezen (Nunc) fixáltuk 4 % paraformaldehid oldattal 30 percig, 0,2 % TritonX-100 (Sigma) tartalmú PBS-sel 20 percig permeabilizáltuk, majd 30 percig 5 % BSA tartalmú PBS-sel blokkoltuk a sejteket. Ezt követően egyrészt a munkacsoport által korábban előállított és Western blot (Kacs Kovics et al., 2006a),

valamint immunhisztokémia (Mayer et al., 2004) módszerrel tesztelt affinitástisztított FcRn specifikus poliklonális nyúl IgG-vel, másrészt a szintén a munkacsoport által előállított FcRn specifikus poliklonális csirke IgY-nal (Lemos et al., 2012) egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a sejteket. A kötődött ellenanyagot Alexa Fluor 488 fluorokrómval konjugált anti-nyúl IgG-vel (Invitrogen/Molecular Probes), valamint Dylight488 konjugált nyúlban termelt anti-csirke IgY F(ab')₂ reagenssel mutattuk ki, a sejtmagot Draq5 (Biostatus) segítségével tettük láthatóvá. A jelölés folyamata szobahőmérsékleten történt, a lépések között háromszor 5 percig mostuk a sejteket. Izotípus kontrollként aspecifikus csirke IgY-t használtunk. A konfokális lézerpasztázó mikroszkópos felvételeket Olympus IX81 mikroszkóp és Fluoview500 program segítségével készítettük.

5.8.3 A bFcRn specifikus monoklonális ellenanyagot termelő hibridóma klónok felülűszójának tesztelése sejtvonalon

A teszteléshez használt MacT szarvasmarha tögyhámepítél sejteket, illetve annak bFcRn-t overexpresszáló változatát (B4) (Kacs Kovics et al., 2006a) 8-lyukú boroszilikát sejtenyésző lemezen (Nunc) fixáltuk 4 % paraformaldehid oldattal 30 percig, majd 1 % BSA és 0.5 % szaponin tartalmú PBS oldattal blokkoltuk, és a további jelölési lépések során is ezt a puffert használtuk. Blokkolást követően kétszeres hígítású hibridóma felülűszót mértünk a sejtekre és 30 percig inkubáltunk. A kötődött monoklonális ellenanyagot kecskében termelt, Cy5 fluorokrómval konjugált egér IgG/IgM specifikus másodlagos ellenanyaggal (Jackson Laboratories) mutattuk ki. A jelölés folyamata szobahőmérsékleten történt, a lépések között háromszor 5 percig mostuk a sejteket. A konfokális lézerpasztázó mikroszkópos felvételeket Olympus IX81 mikroszkóp és Fluoview500 program segítségével készítettük.

A pozitív hibridóma mikrokulturából limitált hígítással állítottunk elő egyedi klónokat, melyek izotípusát és alosztályát specifikus HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal (Southern Biotechnology Associates Inc.) határoztuk meg. A felülűszóból protein G segítségével tisztítottuk az ellenanyagot és Alexa Fluor 488 fluorokrómval konjugáltuk.

5.8.4 Immunizálatlan vt és bFcRn Tg egerek lépének fluoreszcens immunhisztokémiai elemzése

Immunizálatlan 2 hónapos nőstény vt és bFcRn Tg egerek (Balb/c) lépéből fagyasztva metsszével 8 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket 5 percig acetonnal fixáltunk, majd 20 percig 5 %-os BSA oldattal blokkoltunk. Ezt követően a metszeteket 45 percig 50 µg/ml bFcRn-specifikus csirke IgY-nal (Lemos et al., 2012), majd Dylight488 konjugált nyúlban termelt anti-csirke IgY F(ab')₂ reagenssel inkubáltuk. Mosás után a metszeteket 2 %-os normál patkány szérummal blokkoltuk, ezt követően 45 percig Alexa Fluor 647-konjugált anti-B220/CD45RA (RA3-6B2, American Type Culture Collection), Alexa Fluor 568-konjugált anti-Thy-1/CD90 (IBL-1, (Balogh et al., 1994), illetve Cy3-konjugált anti-MARCO (IBL-12, (Kvell et al., 2006) monoklonális ellenanyaggal jelöltük. Az ellenanyagok hibridóma felülűszóból történő tisztítását és fluorokrómmal konjugálását a Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében végezték. Az egyes jelölési lépések között háromszor 5 percig mostuk a sejteket. Izotípus kontrollként aspecifikus csirke IgY-t használtunk. A felvételeket Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóp és anlySIS szoftver használatával készítettük.

5.9 Western blot

A fehérjemintákat 10 %-os poliakrilamid gélben futtattuk, a mintákat redukáló mintapufferben mértük a géلزsebekbe, 10 perc 95 °C-os hőkezelést követően. Az elektroforézist BioRad ProteanIV készülékben végeztük, 110 V feszültséggel. A minták futtatását követően a szétválasztott fehérjéket azonnal blottoltuk polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra (Millipore) 200 mA áramerősséggel, 90 percen keresztül. A membrán ezt követően 5 % sovány tejpört tartalmazó TBS-T oldattal blokkoltuk egy éjszakán át 4 °C-on, majd a munkacsoport által létrehozott csirkében termelt bFcRn specifikus poliklonális ellenanyaggal jelöltük egy órán át szobahőmérsékleten. Másodlagos ellenanyagként tormaperoxidázzal konjugált csirke IgY specifikus nyúl ellenanyagot alkalmaztunk (ImmunoPure). Az előhívást SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztráttal végeztük (Thermo Scientific), a jelet röntgenfilmen rögzítettük (Agfa-Gevaert N. V.). A fehérje frakciók molekulatömegét az egyidejűleg

futtatott mólsúly standard segítségével határoztuk meg (Fermentas), az egyes lépések között háromszor hét percig mostuk a membránt.

A bFcRn-specifikus hibridómák tesztelése során kétszeresen hígított hibridóma felülűsöt használtunk elsődleges, és 10.000-szeresen hígított anti-egér IgG-HRP ellenanyagot másodlagos reagensként. A pozitív hibridóma mikrokultúrából limitált hígítással állítottunk elő egyedi klónokat, melyek izotípusát és alosztályát specifikus HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal (Southern Biotechnology Associates Inc.) határoztuk meg.

5.10 Peritoneális makrofágok és neutrofil granulociták kinyerése

Peritoneális makrofágok izolálásához vt és bFcRn Tg egerek (Balb/c) hasüregébe 1 ml Brewer-féle tioglikolat oldatot oltottunk, három nap elteltével az állatok életét kioltottuk és hasüregükből kinyertük a peritoneális sejteket. A peritoneális neutrofil granulociták izolálásához 1 ml 10 mg/ml-es koncentrációjú kazein oldatot oltottunk, melyet 12 órával később megismételtünk, és 3 óra elteltével kimostuk az állatok hasüregét. A neutrofil granulocitákat Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) centrifugálással tisztítottuk tovább. A sejtpopulációk tisztaságát Alexa Fluor 647-konjugált anti-CD11b (eBioscience) és PE-konjugált anti-Gr1 (BD Pharmingen) reagens segítségével ellenőriztük.

5.11 Csontvelői eredetű dendritikus sejtek differenciálata

Vt és bFcRn Tg egerek (Balb/c) combcsontjából és sípcsontjából csontvelőt izoláltunk, és 10 ng/ml rekombináns egér GM-CSF (Millipore) és 10 ng/ml rekombináns egér IL-4 (eBioscience) jelenlétében sejtenyésző edényben inkubáltuk, a sejtenyésző médium kétharmad mennyiségét kétnaponta cseréltük. A 7. napon a csontvelői eredetű dendritikus sejtek tisztaságát PE-konjugált anti-MHCII (eBioscience), Alexa Fluor 647-konjugált anti-CD11b, PE-konjugált anti-CD11c, PE-konjugált anti-Gr1 és FITC-konjugált anti-CD14 (valamennyi BD Pharmingen) jelöléssel ellenőriztük.

5.12 Áramlási citofluorimetria

Az 1F2/3 mAb tesztelése során MacT és bFcRn-t overexpresszáló B4 sejteket 3 µg Alexa Fluor 488-konjugált 1F2/3 ellenanyaggal inkubáltuk jégen, fénytől elzárva 20 percig 0,2 % szaponin és 0,1 % BSA tartalmú PBS oldatban, majd ezzel az oldattal mostuk a sejteket. A méréseket Beckton Dickinson FACSCalibur áramlási citofluoriméteren CellQuest Pro program segítségével végeztük, az adatokat FCSEXPRESS programmal értékeltük és a fluoreszcens jel mértani középértékét ábráztuk.

5.13 Oldatok, sejttenyésztő médiumok és sejtvonalak

5.13.1 PBS

A fiziológiás foszfát puffer (PBS) 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,4 g/l Na₂HPO₄·H₂O és 0,2 g/l KH₂PO₄ pH 7,4 kémhatású vizes oldata.

5.13.2 PBS-T

A PBS oldat és 0,05 % Tween-20 detergens elegye.

5.13.3 Albumin blokkoló oldat

Az albumin blokkoló 6,055g/l Tris, 8,176 g/l NaCl és 1 % BSA pH 8,0 kémhatású vizes oldata.

5.13.4 Albumin hígító oldat

Az albumin hígító 6,055g/l Tris, 8,176 g/l NaCl, 0 % BSA és 0,05 % Tween-20 detergens pH 8,0 kémhatású vizes oldata.

5.13.5 Albumin mosó oldat

Az albumin blokkoló 6,055g/l Tris, 8,176 g/l NaCl és 0,05 % Tween-20 detergens pH 8,0 kémhatású vizes oldata.

5.13.6 GKN

A glükóz-kálium-nátrium puffer (GKN) 0,4 g/l KCl, 8 g/l NaCl, 1,77 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,69 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g/l glükóz és 10 mg/l fenolvörös vizes oldata.

5.13.7 SDS-PAGE futtató puffer

Az SDS-PAGE futtató puffer 3 g/l Tris/HCl (0,5M pH 6,8), 10 ml/l 10 % SDS és 14,4 g/l glicin vizes oldata.

5.13.8 Western blot puffer

Megegyezik az SDS-PAGE futtató pufferrel, de nem tartalmaz SDS-t.

5.13.9 SDS-PAGE ötszörös töménységű redukáló mintapuffer

A mintapuffer 3,79 g Tris, 5 g SDS, 5 ml 2-merkaptotanol, 50 ml glicerol, 2 mg brómfenolkék 100 ml mennyiségre kiegészített vizes oldata, mely a minták elkészítésénél ötszörös hígításban használandó.

5.13.10 TBS

A Tris puffer (TBS) 8 g/l NaCl és 2,42 g/l Tris vizes oldata.

5.13.11 TBS-T

A TBS oldat és 0,05 % Tween-20 detergens elegye.

5.13.12 DMEM + 10 % FCS + MeOH

A DMEM sejtenyésző médium a Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (Sigma-Aldrich) felhasználásával a gyártó útmutatásai alapján készül, kiegészítve 10 % fetális borjúsavóval (FCS) és 50 μM 2-merkaptotanolal, valamint 3,7 g NaHCO_3 , 0,11 g nátrium-piruvát, 200 mM L-glutamin, aminosavak, 0,1 g

sztreptomycin, 60 mg/l penicillin és vitaminok, esszenciális aminosavak hozzáadásával.

5.13.13 DMEM + 10 % FCS + HAT

A DMEM tápfolyadék 10 % FCS-sel, valamint 10 μ M hipoxantinnal, 0,4 μ M aminopterinnel és 16 μ M timidinnel kiegészített változata.

5.13.14 DMEM + 10 % FCS + HT

A DMEM tápfolyadék 10 % FCS-sel, valamint 10 μ M hipoxantinnal és 16 mM timidinnel kiegészített változata.

5.13.15 RPMI-1640 + 5 % FCS + MeOH

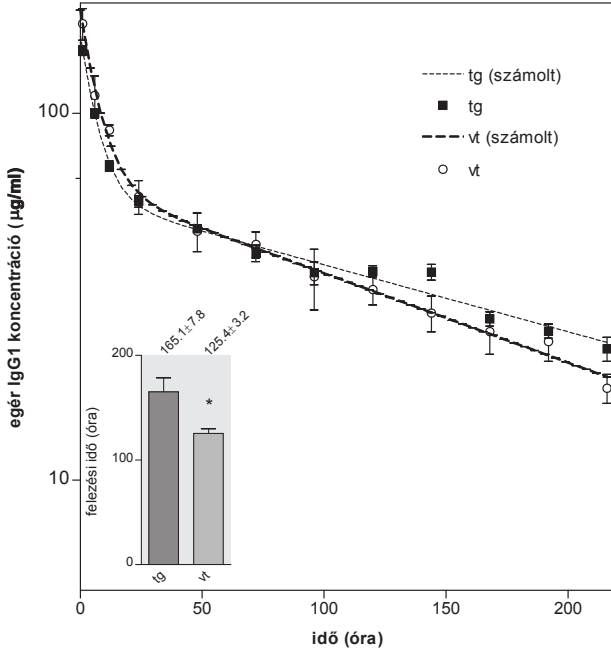
Az RPMI tápfolyadék a RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich Company) felhasználásával a gyártó útmutatásai alapján készül, kiegészítve 5 % FCS-sel és 50 μ M 2-merkaptóetanollal, valamint 2 g/l NaHCO_3 , 110 mg/l nátrium-piruvát, 292 mg/l L-glutamin, aminosavak, 0,1 g sztreptomycin, 60 mg/l penicillin és vitaminok, esszenciális aminosavak hozzáadásával.

6 Eredmények

6.1 FcRn overexpresszió csökkenti az egér és a humán IgG molekulák lebomlását

6.1.1 A befecskendezett OVA-specifikus egér IgG1 felezési ideje hosszabb a Tg egerekben

Az előállított bFcRn Tg egerek különböző szöveteiből kimutatható volt a bFcRn α -lánc jelenléte DNS, mRNS és fehérje szinten is (Bender et al., 2007), így a receptor funkcionális működőképességét az IgG védelemben betöltött szerepe alapján teszteltük. A kísérlet során 10 mg/ttkg mennyiségű ovalbumin specifikus monoklonális IgG1 ellenanyagot fecskendeztünk intravénásan vt és 4 extra kópia bFcRn-t hordozó Tg egerekbe (FVB/N háttér), majd lemértük annak szérumbeli koncentrációját a meghatározott időközönként vett vérmintákból. A kiürülési görbe matematikai modellezése jól korrelált az FcRn mediált IgG farmakokinetika általános sémájával (Lobo et al., 2004), így meghatároztuk az α - vagy megoszlási és a β - vagy kiürülési fázisra vonatkozó felezési időt. Az α -fázis felezési ideje mind a vt, mind a Tg egerekben hasonló, 5 óra közeli értéket adott. A β -fázisra vonatkozó értékek vt egerek esetén megfeleltek az irodalmi adatoknak ($125,4 \pm 3,2$ óra), míg a bFcRn Tg egerekben szignifikánsan magasabbnak bizonyultak (vt $125,4 \pm 3,2$ óra, tg $165,1 \pm 7,8$ óra, **11. ábra**).

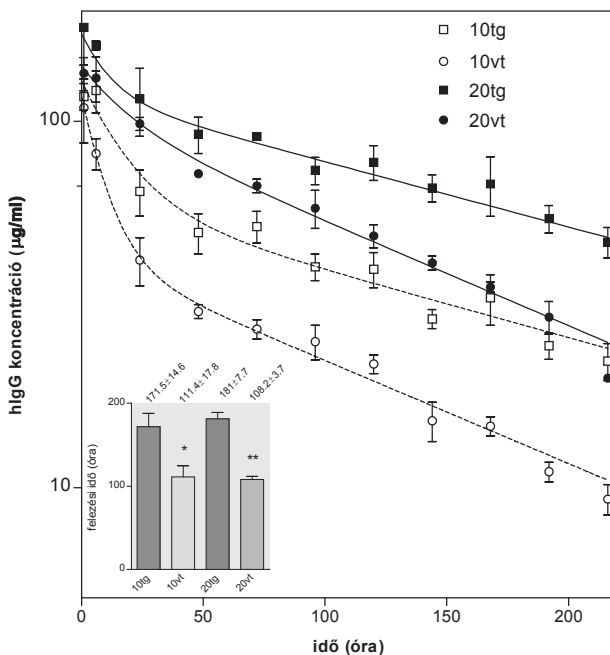


11. ábra Egér IgG1 farmakokinetikai elemzése vt és 4 kópiás bFcRn Tg (FVB/N) egerekben Az ábrán 10 mg/ttkg ovalbumin specifikus egér IgG1 intravénás injektálását követően az ellenanyag átlagos koncentrációja ± SEM került feltüntetésre, az oszlopdiaagram a WinNonLin program kétkompartmentes modelljének alkalmazásával kiszámolt felezési időt jelzi (* $p < 0,05$, Student-féle t-próba).

6.1.2 A kétféle dózisban befecskendezett humán IgG felezési ideje hosszabb a Tg egerekben

Annak eldöntésére, hogy a Tg egerekben kifejeződő bFcRn molekula képes-e nemcsak az egér, hanem az emberi IgG molekulát is nagyobb hatékonysággal megóvni a lebomlástól, az előző kísérlethez hasonló módon FVB/N háttérű vt és 4 kópiás Tg egerekbe 10, illetve 20 mg/ttkg humán IgG injektáltunk intravénásan. Az állatokból

vett vérmintákból meghatároztuk a befecskendezett humán IgG koncentrációját, illetve két-kompartmentes, nem-lineáris regressziószámítással a felezési időt. A humán IgG felezési ideje ezek alapján 10 mg/ttkg befecskendezett humán IgG esetén Tg állatokban $171,5 \pm 14,6$ óra, vt társaikban $111,4 \pm 17,8$ óra, míg 20 mg/ttkg emberi ellenanyag intravénás injekcióját követően Tg egerekben $181 \pm 7,7$ óra, vt kontrollokban $108,2 \pm 3,7$ óra (**12. ábra**). Összességében elmondható, hogy a bFcRn Tg állatokban a humán IgG felezési ideje mindkét esetben szignifikánsan meghosszabbodott a kontroll állatokhoz képest.

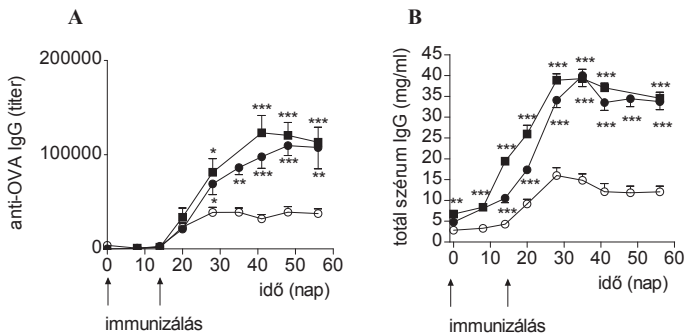


12. ábra Kétféle dóziszú humán IgG farmakokinetikai elemzése vt és 4 kópiás bFcRn Tg (FVB/N) egerekben. Az ábrán 10 (10tg, 10vt) illetve 20 (20tg, 20vt) mg/ttkg humán IgG intravénás beinjektálását követően mért átlag IgG koncentráció \pm SEM került feltüntetésre, az oszlopdiagram a WinNonLin program kétkompartmentes modelljének alkalmazásával kiszámolt felezési időt jelzi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA).

6.2 FcRn overexpresszió humorális immunválaszra gyakorolt egyes paramétereinek vizsgálata *in vivo* transzgenikus egérmodellen

6.2.1 A bFcRn Tg egerek T-dependens antigénnel történő immunizálása magasabb antigén specifikus IgG titerrel és totál IgG koncentrációval jár

A Tg egerekben kifejeződő bFcRn funkcionálisan aktívnak bizonyult és ezért a következőkben az vizsgáltuk, hogy vajon a receptor jelenléte befolyásolja-e az állatok immunválaszát. A bFcRn overexpresszió immunválaszban betöltött szerepének vizsgálatára standard, T-dependens antigénnel (ovalbumin, OVA) immunizáltunk FVB/N háttérű vt, valamint 4 és 5 kópiás bFcRn Tg egereket, és meghatároztuk az antigén specifikus IgG szintjét, továbbá a totál IgG koncentrációját (13. ábra). Az OVA specifikus IgG tekintetében a primer immunválasz során nem volt különbség a két állatcsoport között, de a ráoltást követően a Tg egerekben szignifikánsan több, két-háromszoros mennyiségű OVA specifikus IgG-t mutattunk ki. A totál egér IgG koncentrációja már immunizálatlan állapotban is szignifikánsan magasabbnak bizonyult mindkét Tg egérvonal egyedeiben, mint a vt kontrollokban. Az immunizálás folyamata során a vt állatok esetén a 28., míg Tg állatoknál a 35. napon érte el a legmagasabb értéket. Ekkor a vt állatokban $14,8 \pm 2,6$ mg/ml, míg a 4 kópiás Tg egerekben $39,9 \pm 2,7$, az 5 kópiás Tg egerekben $39,3 \pm 2,2$ mg/ml értéket mértünk.

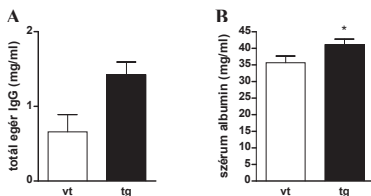


13. ábra A bFcRn Tg egerek antigén specifikus IgG titer és totál IgG koncentrációja Vad típusú (üres kör), 4 illetve 5 kópia bFcRn-t hordozó Tg egerek (fekete kör, illetve négyzet) ovalbuminnal történő immunizálása jelentősen nagyobb antigén specifikus IgG titer (A), illetve totál szérums IgG (B) növekedéssel járt együtt a Tg egerek esetén, mint a vt kontrollokban (átlag \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Student-féle t próba)

Kutatócsoportunk kimutatta továbbá, hogy az immunizálás során nem csupán az antigén specifikus IgG, hanem az antigén specifikus IgM titere is jelentősen emelkedett a Tg egerek szérumban a másodlagos immunválasz során (Cervenak et al., 2011). Az immunizált Tg egerek szignifikánsan nagyobb méretű léppel és emelkedett lépsejtszámmal rendelkeztek, és az ELISPOT vizsgálat jelentősen nagyobb számú ovalbumin specifikus IgM és IgG termelő lépsejt jelenlétét mutatta a Tg állatokban, vt társaikhoz viszonyítva (Cervenak et al., 2011).

6.2.2 A Tg egerek szérumbeli totál IgG és albumin koncentrációja Balb/c háttérre keresztezést követően is magasabb

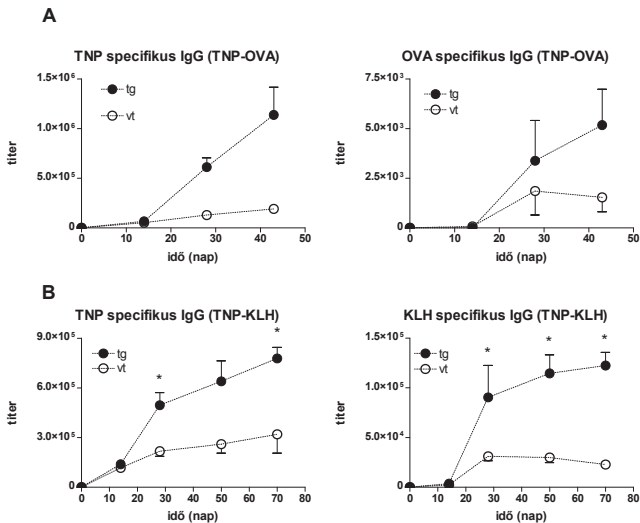
A bFcRn Tg egerekben kifejeződő receptor szerepének IgG védelemben és T-dependens antigénnel történő immunválaszban betöltött szerepének vizsgálata az eredetileg létrehozott, a transzgenézisre kifejezetten alkalmas FVB/N genetikai háttérű állatokban történt. Az immunológiai kutatásokban a Balb/c genetikai háttérű egerek használata elterjedtebb, jobban karakterizált, így a további vizsgálatokhoz erre a genetikai háttérre keresztezték át az állatokat. A 10. keresztezést követően, az elméleti számítások alapján csak a transzgen maradt a Balb/c törzsű állatok genomjában, egyéb FVB/N specifikus genetikai elemek nem (kongenikus törzs) (Flaherty, 1981). A funkcionális bFcRn kifejeződés tesztelésére megmértük az immunizálásra használandó egerek totál eger IgG, valamint szérumban albumin koncentrációját. Ezek a paraméterek a korábbi kísérletek során szignifikánsan különböztek vt és bFcRn Tg egerekben (**13/B ábra**) és (Cervenak et al., 2011) és a Balb/c genetikai háttéren is kimutatható volt az eltérés az állatcsoportok között (**14. ábra, A és B**), így a továbbiakban megvizsgáltuk az állatok immunválaszának hatékonyságát és hibridóma-előállítási képességét.



14. ábra Balb/c genetikai háttérre keresztezett vt és bFcRn Tg egerek totál IgG és albumin koncentrációja
 Vad típusú (üres oszlop), illetve bFcRn Tg (fekete oszlop) egerek szérumbeli totál eger IgG (A), illetve szérumban albumin (B) koncentrációja, az adatok átlag ± SEM formátumban szerepelnek (* p< 0.05, Mann-Whitney teszt)

6.2.3 A Balb/c háttérű Tg egerek immunválasza hatékonyabb

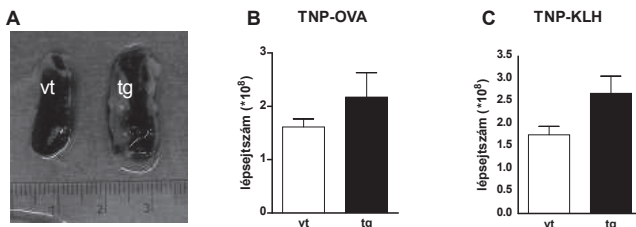
A Balb/c genetikai háttérre keresztezett heterozigóta, 5 kópia bFcRn-t kifejező Tg egereket, valamint vt alomtársaikat 200 µg TNP-OVA illetve TNP-KLH konjugátum és CFA homogenizátummal immunizáltunk, 100 µg antigén + IFA-val ismételtlen oltottunk, végül adjuváns nélkül 50 µg antigént i.v. és 50 µg antigént ip juttattunk az állatok szervezetébe. Az immunizálás során rendszeresen vett mintákból ELISA módszerrel megmértük az ennek hatására keletkező szérumbeli haptén-, valamint hordozó-specifikus IgG titert (15. ábra). A két állatcsoport között a 28. naptól kezdődően vált megfigyelhetővé a különbség, és az immunizálás végére a TNP-OVA antigén esetén 6-szor, TNP-KLH antigén esetén 2,5-szer magasabb TNP specifikus IgG titert mutattunk ki a tg egerekben. Hordozó specifikus IgG tekintetében három-, illetve ötszörös különbség alakult ki a Tg állatok javára.



15. ábra Antigen specifikus szérumbelű IgG titer TNP-OVA és TNP-KLH immunizált vt és bFcRn Tg egerekben

Vad típusú (üres kör), valamint 5 kópiás bFcRn Tg (fekete kör) egerek haptén és hordozó specifikus IgG szintjének változása TNP-OVA (A ábra), illetve TNP-KLH (B ábra) immunizálás során. Az adatok inflexió titer átlag ± SEM formátumban szerepelnek, a csoportok közötti szignifikancia vizsgálatára Mann-Whitney U tesztet használtunk.

Az utolsó immunizálás után 3 nappal az állatok lépét eltávolítottuk és a lépsejtekkel ELISPOT, valamint fúziós kísérletet végeztünk. A Tg egerek lépének nagyobb mértékű megnagyobbodása szabad szemmel is látható volt, és a lépsejtek száma is emelkedett a vt kontrollokhoz képest (**16/A-C ábra**).

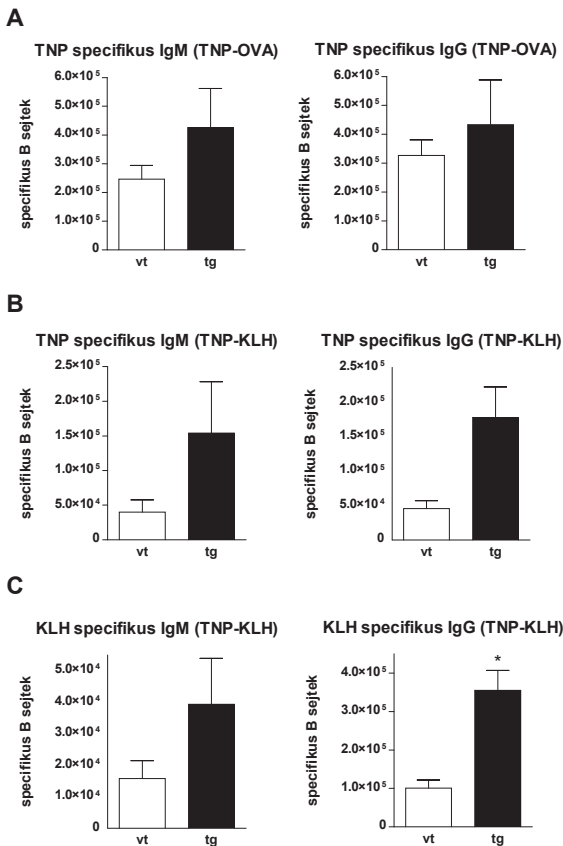


16. ábra Lép és lépsejtek száma TNP-OVA és TNP-KLH immunizálást követően vt és bFcRn Tg egerekben

(A) Mindkét immunizálási protokoll esetén a Tg egerek lépe nagyobbak bizonyult, mint vt társaiké, egy reprezentatív minta az A ábrán látható. (B) A lépsejtek száma TNP-OVA immunizálást követően (3-3 állat). (C) A lépsejtek száma TNP-KLH immunizálást követően (4-4 állat). Az üres oszlop a vt, a fekete oszlop a Tg egerek adatát szimbolizálja, az értékek átlag \pm SEM formátumban szerepelnek.

Az ELISPOT vizsgálatok alapján a TNP-OVA immunizálás esetén a Tg egerekben körülbelül 70 %-kal több TNP-specifikus IgM és 35 %-kal több TNP-specifikus IgG termelő lépsejt volt jelen, mint vt társaikban (**17/A ábra**). A TNP-KLH immunizálás végére jóval nagyobb különbség alakult ki a vt és Tg egerek ezen paramétereit között, a Tg állatokban mind a haptén specifikus IgM, mind a haptén specifikus IgG termelő lépsejtek száma négyszerese volt a vad típusúak esetén kapott értéknek (**17/B ábra**). A TNP specifikus ellenanyagot termelő sejtek arányában a két immunizálás során jelentkező számottevő különbségre magyarázatot adhat egyrészt a TNP-KLH immunizálás hosszabb protokollja (eggyel több ismétlődő oltás), valamint az a tény, hogy a KLH nagyobb immunogenitású molekula, mint az OVA.

A TNP-KLH immunizálás esetén meghatároztuk a hordozó (KLH) specifikus IgM és IgG termelő lépsejtek számát is, mely a Tg egerekben 2,5, illetve 3,5-ször haladta meg a vt társaiknál kapott értéket (**17/C ábra**). Összességében megállapítható, hogy a bFcRn overexpressziója megnövekedett antigén-specifikus B-sejt expanszióval jár a Tg egerek lépében immunizálás hatására.



17. ábra Antigen specifikus lépsejtek mennyisége a fúzió napján TNP-OVA és TNP-KLH immunizálást követően, vt és bFcRn Tg egerekben (A) ELISPOT assay segítségével meghatározott TNP specifikus IgM és IgG termelő lépsejtek száma TNP-OVA immunizálást követően (3-3 állat). (B) TNP specifikus IgM és IgG termelő lépsejtek száma TNP-KLH immunizálást követően (4-4 állat). (C) KLH specifikus IgM és IgG termelő lépsejtek száma TNP-KLH immunizálást követően (4-4 állat). Az üres oszlop a vt, a fekete oszlop az 5 kópiás bFcRn Tg egerek adatait jelzi, az antigén specifikus lépsejtek száma az összes lépsejt figyelembe vételével került meghatározásra. Az értékek átlag ± SEM formátumban szerepelnek, a szignifikanciaszintet Mann-Whitney U teszttel értékeltük (* $p < 0,05$).

6.2.4 A bFcRn Tg egerek hibridóma-előállítási képessége fokozott

Az ELISPOT vizsgálatokkal párhuzamosan mindkét immunizálás esetén fúziós kísérletet végeztünk a vt és Tg egerek lépsejtjeivel, a hibridóma-előállítási képességük összehasonlítása céljából. Az egyénekenkénti variabilitás csökkentése érdekében a TNP-OVA immunizálás esetén (3-3 egér) minden vt, illetve Tg állat lépsejtjeinek 1/3-ad, míg a TNP-KLH immunizálás után (4-4 egér) minden vt, illetve Tg állat lépsejtjeinek 1/4-ed részét összekevertük, és az így kapott, egy állatnak megfelelő mennyiségű lépsejttel végeztük a fúziót. A polietilén-glikollal (PEG) elvégzett fúziót és HAT szelekciót követően megállapítottuk, hogy a Tg egerek lépsejtjeiből mindkét immunizálás után körülbelül kétszer annyi hibridóma mikrokultúra (MC) képződött, mint vt társaik esetén (**1. táblázat**). Ez arra utal, hogy a Tg egerek lépsejtjeiből nem csak számában, de arányaiban is több hibridóma képződik, mivel a lépsejtek száma nem érte el a vt egerek lépsejtjeinek kétszeresét, csak 35, illetve 50 %-kal volt több lépsejt (TNP-OVA, illetve TNP-KLH immunizálás, **16. ábra**), mint a vt állatok esetén. A hibridóma mikrotenyészetek mikroszkópos vizsgálata során a megfigyelhető klónok megszámlálásával megállapítottuk továbbá, hogy a Tg egerek lépsejtjeiből több életképes hibridóma klón keletkezik. A TNP-OVA immunizálást követő fúzió a Tg egerek esetén 4077, míg a vt egerek esetén 1274 hibridóma klónt eredményezett, a TNP-KLH immunizálás esetén Tg egerek lépsejtjeiből 3530, a vt lépsejtekből 1641 hibridóma klón képződött. Összességében elmondható, hogy a bFcRn Tg egerek immunizálásával mintegy kétszer (TNP-OVA immunizálás), illetve háromszor (TNP-KLH immunizálás) annyi hibridóma keletkezett, mint kontrollok esetén (**1. táblázat**).

1. táblázat A vt és bFcRn Tg egerek lépsejtjeiből képződő hibridómák és hibridóma mikrokultúrák számának és specifitásának meghatározása

Immunogén	Egér genotípus	Lépsejtek száma (*10 ⁶)	#MC ^a	#Klónok ^b	átlag klón / MC ^a	TNP-specifikus IGM pozitív MC ^a	TNP-specifikus IgG pozitív MC ^a	hordozó-specifikus IgM pozitív MC ^a	Hordozó-specifikus IgG pozitív MC ^a
TNP-OVA	vt	1.61	627	1274	2.03	147	307	n.t.	n.t.
	Tg	2.175	1302	4077	3.13	387	886	n.t.	n.t.
TNP-KLH	vt	1.752	725	1641	2.26	133	191	26	194
	Tg	2.672	1443	3530	2.45	293	721	64	1231

^a MC (mikrotenyészet) a 96 well sejtenyésztő tálca egy „well”-ében lévő sejtek, amelyek több hibridómától is származhatnak

^b egyedi hibridóma klónok száma, a fúzió utáni 6. és 7. napon számolva
n. t.: nem tesztelt

Fehér háttérrel kiemelve a TNP-specifikus IgG pozitív MC-k száma.

2. táblázat A vt és bFcRn Tg egerek lépsejtjeiből képződő hibridómák és hibridóma mikrokultúrák száma és specificitása egyenlő lépsejtszámra számolva (1×10^6) meghatározása

Immunogén	Egér genotípus	TNP-specifikus IgM pozitív MC ^a	TNP-specifikus IgG pozitív MC ^a	Hordozó-specifikus IgM pozitív MC ^a	Hordozó-specifikus IgG pozitív MC ^a
TNP-OVA	vt	91	190	n.t.	n.t.
	Tg	175	407	n.t.	n.t.
TNP-KLH	vt	76	109	15	111
	Tg	110	270	24	461

^a MC (mikrotenyészet) a 96 well sejtenyészto plate egy wellében lévő sejtek, amelyek több hibridómától is származhatnak
n. t.: nem tesztelt

Féher háttérrel kiemelve a TNP-specifikus IgG pozitív MC-k száma.

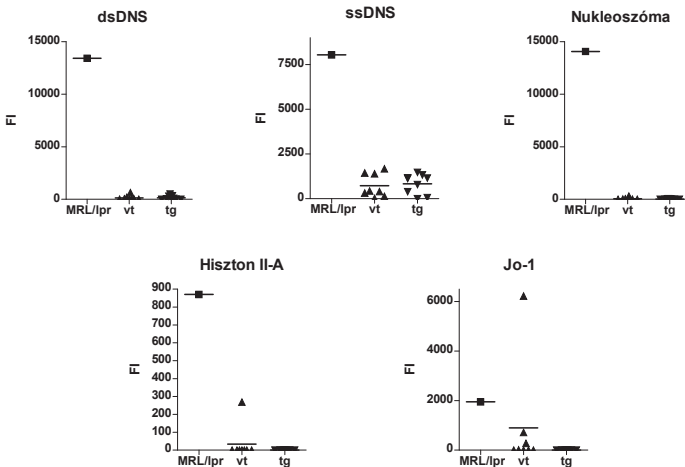
A hibridóma klónok megszámlálását követően a mikrokultúrák által termelt monoklonális ellenanyag (mAb) specificitását is teszteltük. Mindkét immunizálás esetén körülbelül kétszer annyi TNP-specifikus IgM és háromszor annyi TNP-specifikus IgG termelő mikrokultúrát találtunk a Tg egerek esetén, mint a vt kontrollnál (**1. táblázat**). A TNP-KLH immunizálás esetén meghatároztuk a hordozó specifikus mikrotenyészetek számát is, és azt találtuk, hogy a Tg egerek esetén háromszor annyi KLH-specifikus IgM és hatszor annyi KLH-specifikus IgG pozitív mikrokultúra keletkezett, mint a kontroll társaik esetén (**1. táblázat**). Így megállapítható, hogy mindkét immunizálást követően a bFcRn Tg egerek lépsejtjeiből jóval több antigén specifikus mAb termelő hibridóma keletkezik, mint a vt egerek lépsejtjeiből.

Ezt követően meghatároztuk a fúziók hibridizációs frekvenciáját, vagyis a keletkezett hibridóma klónok számát azonos lépsejtszámra (esetünkben 1×10^8 lépsejt) vonatkoztatva. A hordozó-, illetve haptén-specifikus IgG termelő mikrotenyészetek száma 2-4-szer magasabbnak bizonyult a Tg egerek esetén, és az antigén specifikus IgM pozitív mikrotenyészetek száma is minden esetben meghaladta a vt kontrollokban kapott értéket (**2. táblázat**). A monoklonális ellenanyag előállításban leginkább fókuszban lévő haptén specifikus IgG termelő hibridóma mikrotenyészetek száma Tg állatok esetén 2-2,5-szerese a vt kontrollnak a TNP-OVA illetve TNP-KLH immunizálást követően (**2. táblázat**).

6.2.5 A bFcRn túltermelése nem jár együtt autoreaktív ellenanyagok képződésével

A hibridóma-előállítás fokozására korábban tesztelt egértörzseknel minden esetben fokozódott az autoreaktív ellenanyagok mennyisége (Knott et al., 1996; Takai et al., 1996; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Ennek ellenőrzésére vizsgáltuk az idős bFcRn Tg egerek autoellenanyag profilját.

Az autoreaktív ellenanyagok jelenlétét a szérumban az ELTE Immunológiai Tanszékén kifejlesztett microarray formátumú ellenanyag profil vizsgálattal teszteltük, ismert autoantigének széles skáláját használva (Papp et al., 2007). Pozitív kontrollként autoimmun betegség tüneteit mutató MRL/lpr egér széruma szolgált, negatív kontrollként a Tg egerek egykorú vt alomtársainak szérumát használtuk. Míg típusos autoantigének ellen (dupla és szimpla szálú DNS, nukleoszóma, hiszton II-A, Jo-1) mérhető autoellenanyag termelést mutattunk ki az MRL/lpr egér mintájában, addig ezek egyike sem jelent meg a bFcRn Tg egerekben. Egy vt egér esetében hiszton II-A, illetve Jo-1 specifikus ellenanyagot detektáltunk, véletlenszerű egyedi autoimmunitást jelezve (18. ábra).



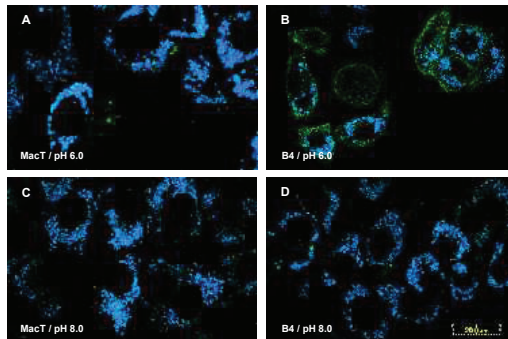
18. ábra Idős vt és bFcRn Tg egerek autoimmun ellenanyag profilja

Tipikus autoantigének (dupla szálú DNS, szimpla szálú DNS, nukleoszóma, hiszton II-A és Jo-1) elleni ellenanyagok szintje autoimmun modell MRL/lpr, vt és bFcRn Tg egerek szérumában. A szimbólumok az egyedi minták autoimmun IgG fluoreszcencia intenzitását (FI) mutatják, a vízszintes szakasz a csoportok átlagát jeleníti meg.

6.3 FcRn expresszió kimutatása transzgenikus egér sejteken és szöveteken

6.3.1 A pH-dependens FcRn-IgG interakció kimutatása sejtvonalakon

A bFcRn fehérje szintű expressziójának kimutatására használt ellenanyagok specifikus kötődésének tesztelésére rendelkezésünkre állt bFcRn-t alapszinten expresszáló szarvasmarha tőgyhámepítél sejtvonal (MacT), valamint ugyanezen sejtvonal bFcRn-nel stabilan transzfektált változata (B4) (Kacskovics et al., 2006a). E két sejtvonal sejtjeiben kifejeződő bFcRn mennyiségének összehasonlítására és funkcióképességének igazolására az FcRn pH-dependens IgG kötő tulajdonságán alapuló vizsgálatot végeztünk (enyhén savas környezetben létrejön a kötődés, semleges-enyhén lúgos pH-n disszociál az FcRn-IgG komplex). Az alapszintű bFcRn-nel rendelkező és azt fokozott mértékben kifejező sejtekhez pH 6.0, illetve pH 8.0 médiumban fluorokrómmal jelölt kecske IgG-t, valamint lizoszómákat jelölő reagenst (LysoTracker) adtunk. Enyhén savas környezetben a MacT sejteken alig tapasztaltunk IgG kötődést, míg a B4 sejteken jelentős IgG felhalmozódást figyeltünk meg, amely vezikuláris lokalizációval jellemezhető (19. ábra, A és B). Enyhén lúgos környezetben sem a MacT, sem a B4 sejtek esetén nem tapasztaltunk IgG kötődést (19. ábra, C és D). Az IgG egyik esetben sem volt detektálható a lizoszómákban. A vizsgálatot fluorokrómmal jelölt $F(ab')_2$ fragmentummal elvégezve egyik pH-n sem kaptunk értékelhető jeleket egyik sejtvonal esetén sem.

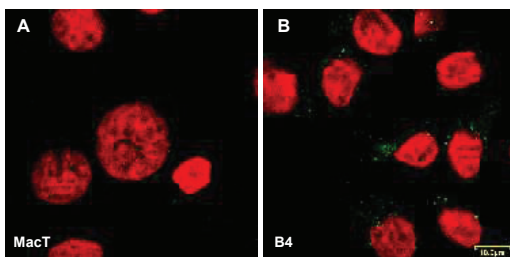


19. ábra A pH-dependens FcRn-IgG kötődés kimutatása bFcRn-t alapszinten expresszáló és overexpresszáló sejtvonalon

Fluorokrómmal jelölt kecske IgG (zöld) kötődése bFcRn-t alapszinten expresszáló MacT (A), valamint a receptort overexpresszáló B4 sejteken (B) enyhén savas (pH 6.0) környezetben, illetve fiziológiás kémhatáson (pH 7.4) MacT (C) és B4 (D) sejteken. A lizoszómákat a kék színű LysoTracker mutatja. A mércé 20 μm -es távolságot jelöl.

6.3.2 FcRn specifikus poliklonális nyúl ellenanyag tesztelése

A bFcRn sejteken történő kimutatására a munkacsoport által korábban előállított, az FcRn α -lánc egy konzervatív szakaszát (173-186 aminosav, CLEWKEPPSMRLKAR) reprezentáló peptidre specifikus, affinitástisztított poliklonális nyúl IgG-t használtuk, amely korábban Western blot (Kacskovics et al., 2006a) és immunhisztokémia (Mayer et al., 2004) vizsgálatok során szarvasmarha fajban alkalmasnak bizonyult a receptor kimutatására. A reagens detektálta a bFcRn fehérje szintű kifejeződésének különbségét az alapszintű (MacT), illetve bFcRn overexpresszióval jellemezhető (B4) szarvasmarha tőgyhámepítél sejteken fluoreszcens vizsgálatok során (**20. ábra**), és a jel lokalizációja is valószínűleg a citoplazma endoszómáira utal. (Sajnos a rendelkezésre álló ellenanyag nem tette lehetővé hosszútávú kísérletek tervezését és elvégzését.)



20. ábra A bFcRn kimutatása poliklonális nyúl ellenanyaggal fluoreszcens immunocitokémia során

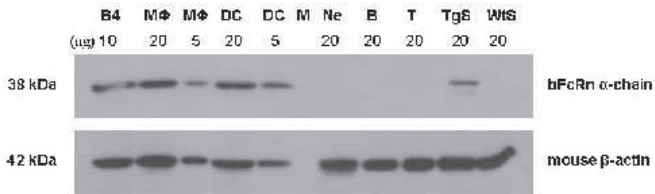
A bFcRn kimutatása konfokális mikroszkóppal a receptort alapszintben expresszáló MacT (A) és azt overexpresszáló B4 (B) sejteken. Zöld: FcRn specifikus poliklonális nyúl IgG, piros: Draq5. A mércé 10 μ m-es távolságot jelöl.

6.3.3 bFcRn specifikus egér monoklonális ellenanyagok fejlesztése

Mivel a korábban létrehozott poliklonális nyúl ellenanyag nem tette lehetővé a bFcRn fehérje szintű, fajspecifikus és nagy érzékenységű detektálását bFcRn Tg egérben, így célul tűztük ki bFcRn specifikus egér monoklonális ellenanyag fejlesztését. Rekombináns szolubilis bFcRn (sbFcRn) (Kacskovics et al., 2006a) fehérjével immunizáltunk Balb/c egeret és az immunizálást követően a fúzió révén keletkezett hibridómák közül ELISA-val választottuk ki a magas optikai denzitást mutató

kultúrákat. A pozitív felülúszókat Western blot, illetve fluoreszcens immuncitokémiai rendszerben vizsgáltuk és a pozitív hibridóma mikrokultúrából limitált hígítással egyedi hibridóma klónt állítottunk elő.

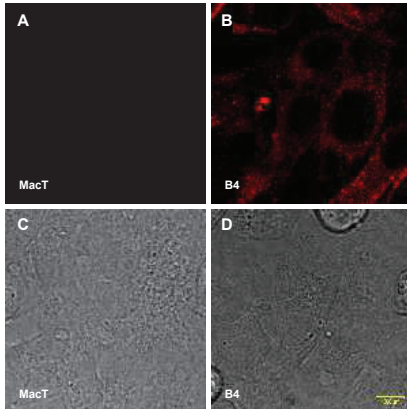
A Western blot rendszerben a bFcRn α -láncát denaturált állapotban specifikusan detektáló **1E5/2** monoklonális ellenanyaggal kimutattuk a bFcRn Tg egerek lépsejtjeiből, dendritikus sejtjeiből és makrofágjaiból a receptor jelenlétét (**21. ábra**).



21. ábra A bFcRn Tg egerek peritoneális makrofágjai és csontvelői eredetű dendritikus sejtjei erősen kifejezik a bFcRn-t

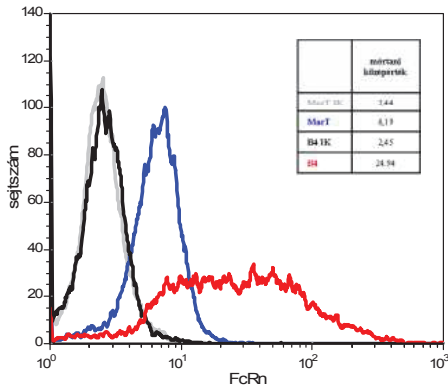
A bFcRn α -láncának kifejeződése immunizálatlan bFcRn Tg egerek makrofágjaiban (M Φ ; 99,3 %-os tisztaság), dendritikus sejtjeiben (DC; 97,8 %-os tisztaság), peritoneális neutrofil granulocitáiban (Ne; 91,4 %-os tisztaság), B-sejtjeiben (B; 99,4 %-os tisztaság), T-sejtjeiben (T; 99,5 %-os tisztaság) és lépében (TgS). A jelölés specifikusságát a megfelelő méreten (38 kDa) kívül a pozitív kontrollként használt B4 sejtvonal bFcRn expressziójának kimutatása is alátámasztotta. A negatív kontrollként alkalmazott wt egér lép esetén a jel hiánya arra utal, hogy az ellenanyag nem keresztreakál az egér FcRn α -láncával. A membránt az anti-bFcRn reagens eltávolítása után β -aktin specifikus ellenanyaggal is előhívtuk mennyiségi kontrollként (Vegh et al., 2012).

A fúziót követően izoláltunk egy másik, fluoreszcens immuncitokémiában pozitívnek bizonyult **1F2/3** hibridóma vonalat is, amely által termelt mAb esetén a B4 sejtek citoplazmájában megfigyelhető intenzív vezikuláris festődés megfelel a bFcRn lokalizációjának (**22. ábra**), illetve citofluorimetriás tesztelés során jelzi a két sejtvonal bFcRn expressziójának különbségét (**23. ábra**), de az ellenanyag alkalmazhatóságának megítéléséhez annak további karakterizálása szükséges.



22. ábra Bovin FcRn kimutatása IF2/3 monoklonális ellenanyaggal fluoreszcens immuncitokémiával

Bovin FcRn specifikus monoklonális ellenanyagot tartalmazó IF2/3 hibridóma klón felülészójának tesztelése bFcRn-t alapszinten expresszáló MacT (A, C) és overexpresszáló B4.3 (B, D) sejteken. (A, B) bFcRn specifikus fluoreszcens jel (piros), (C, D) ugyanazon felvételek differenciál interferencia kontraszt képe. A mérce 10 µm-es távolságot jelöl.

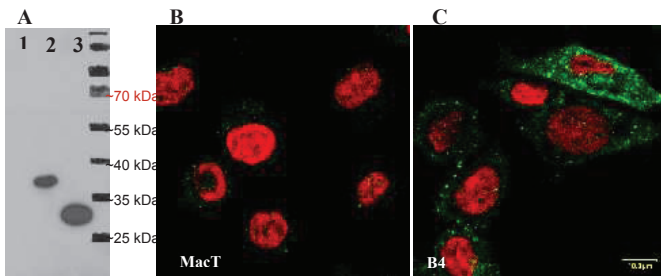


23. ábra Bovin FcRn kimutatása IF2/3 monoklonális ellenanyaggal áramlási citofluorimetrával

Bovin FcRn-t alapszinten kifejező MacT és a receptort overexpresszáló B4 sejtek intracelluláris FcRn expressziójának detektálása A488-konjugált IF2/3 mAb-bal. IK: izotípus kontroll

6.3.4 A bFcRn specifikus csirkében termelt poliklonális ellenanyag tesztelése, az FcRn expresszió kimutatása vt és Tg egér lépében

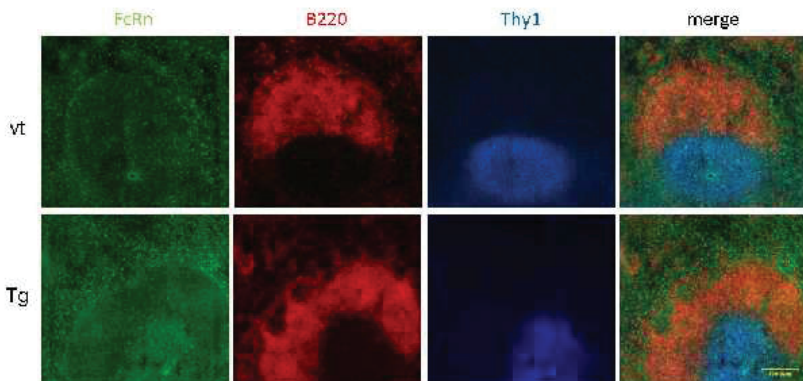
A továbbiakban egy rekombináns sbFcRn-nel (Kacs Kovics et al., 2006a) immunizált tyúkocokból származó poliklonális IgY ellenanyaggal (Lemos et al., 2012) folytattuk a receptor fehérje szintű kimutatását. A készítmény igen nagy érzékenységgel detektálta a bFcRn α -láncát Western blot módszerrel (24/A ábra). A MacT és B4 sejtvonal immuncitokémia során detektálható volt a két sejt bFcRn kifejeződésében mutatkozó jelerősség különbség, illetve a vezikuláris lokalizáció is a bFcRn felismerésére utal (24. ábra, B és C).



24. ábra A bFcRn kimutatása poliklonális csirke ellenanyaggal Western blot és fluoreszcens immuncitokémia során

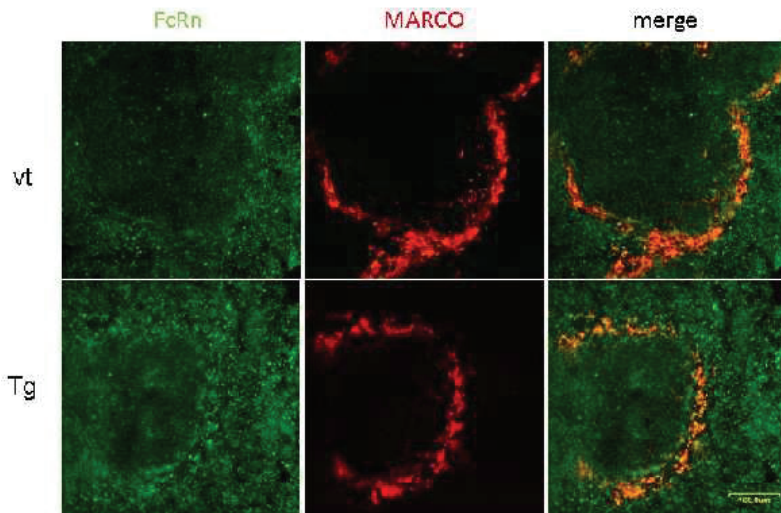
(A) A bFcRn kimutatása Western blot módszerrel (1, 20 μ g MacT sejtlizátum, 2, 20 μ g B4.3 sejtlizátum, 3, 200 ng szolubilis bFcRn). A bFcRn fehérje szintű kimutatása konfokális mikroszkóppal a receptort alapszinten expresszáló MacT (B) és azt overexpresszáló B4 (C) sejteken. Zöld: FcRn specifikus poliklonális csirke IgY, piros: Draq5

Ezt követően immunizálatlan vt és bFcRn Tg egerek lépének FcRn expresszióját hasonlítottuk össze a reagens segítségével (25. ábra). A poliklonális csirke IgY a vt lépmetseteken is specifikus jelölést mutatott az izotípus kontroll IgY-hoz képest, ami az egér FcRn molekula felismerésére is utal, így a Tg metseteken látható nagyobb intenzitású jelölés vélhetően az egér és szarvasmarha FcRn együttes jelölődésének következménye. Az erősen FcRn pozitív sejtek leginkább a T- és B-sejtes zónán kívül, a marginális zónában illetve vörös pulpában lokalizálódnak, bár szórványos FcRn pozitív sejtcsoportokat a folliculusban is látunk. A bFcRn Tg egerek lépszervezete (T- és B-sejtes zónája) alapvetően nem tér el a vt kontrolltól. Az FcRn-t erősen kifejező sejtek azonosítása céljából jelöltük továbbá a marginális zóna makrofágokat is, melyek az FcRn pozitív sejtpopuláció egy részét alkotják (26. ábra).



25. ábra FcRn-t expresszáló sejtek kimutatása vt és bFcRn Tg egér lépében egy folliculus környékén

Immunizálatlan vt és 5 kópiás bFcRn Tg egerek FcRn (zöld), B220 (piros) és Thy-1 (kék) jelölése, illetve a jelölések kolokalizációja. A mércé 100 µm-es távolságot jelöl.



26. ábra FcRn-t expresszáló sejtek a marginális zónában és a vörös pulpában vt és bFcRn Tg egerek lépében

Immunizálatlan vt és bFcRn Tg egerek FcRn (zöld) és MARCO (piros) jelölése, illetve a jelölések kolokalizációja egy folliculus környékén. A mércé 100 µm-es távolságot jelöl.

7 Diszkusszió

A poliklonális ellenanyagok előállítása folyamán a lehető legmagasabb specifikus ellenanyag koncentráció érdekében az állatokat gyakori immunizálásnak vetik alá. A hiperimmunizálás során az antigénspecifikus immunglobulin G (IgG) molekulák szintje jelentősen meghaladhatja a fajra jellemző normál értéket, aminek következményeképpen a megtermelt értékes ellenanyagok gyorsabb ütemben bomlanak le (Andersen and Bjorneboe, 1964; Brambell et al., 1964). Ezért folyamatos és gyakori immunizálásra van szükség ahhoz, hogy a specifikus immunglobulinok magas szérumszintje megmaradjon.

A neonatális Fc receptor (FcRn) jól dokumentált szerepe, hogy az IgG molekulák sejten belüli és sejten keresztüli transzportálása révén szabályozza az IgG homeosztázist (Akilesh et al., 2007). Az FcRn-mediált reciklizáció folyamata a magas endogén IgG koncentráció fő fenntartója, és az IgG szint és IgG katabolizmus mértéke közötti összefüggést intenzíven tanulmányozták a korábbiakban (Bleeker et al., 2001; Fahey and Robinson, 1963; Humphrey and Fahey, 1961; Junghans and Anderson, 1996; Sell and Fahey, 1964; Waldmann and Strober, 1969). A magas szérum IgG szint stabilizálása és a hiperimmunizálás maximális kihasználása érdekében a bFcRn α -láncát különböző kópiaszámban, szövetspecifikusan kifejező transzgenikus egerek (Bender et al., 2007) karakterizálását tűztük ki célul. Az IgG eliminációját részben az FcRn iránti affinitása befolyásolja (Lobo et al., 2004), így először meghatároztuk az egér IgG félélet-idejét vt és 4 kópiás bFcRn Tg egerekben (**11. ábra**). Kísérleteink során a különböző kópiaszámú Tg törzsek közül a 4 vagy 5 kópiás bFcRn expressziójú egyedeket használtuk, melyek relatív magas bFcRn expressziója lehetővé teszi az IgG katabolizmusra gyakorolt hatás kimutatását, de a gén kifejeződése nem olyan intenzív, ami már károsíthatja a sejten belüli homeosztázist és a modell funkcionális alkalmasságát (Praetor and Hunziker, 2002). Kiemelendő, hogy a különböző bFcRn Tg törzsek vagy a vt kontrollok egyedei nem mutattak semmilyen fenotípusos különbséget (Bender et al., 2007). E modell alkalmasságával kapcsolatban két kérdés szorult tisztázásra: az egér és bFcRn α -lánc, valamint egér β 2m sejten belüli ekvilibriuma, valamint a bFcRn α -lánc és egér β 2m alkotta heterodimer receptor funkcióképessége. Az első kérdést illetően számos farmakokinetikai (Ghetie et al., 1996; Israel et al., 1996; Junghans and Anderson, 1996) és sejszintű (Ellinger et al., 2005; Praetor et al., 2002; Zhu et al., 2002) tanulmány vetett fel problémákat, és utóbbival kapcsolatban is merültek fel aggályok (Claypool et al., 2002). Korábban kiderült, hogy a bFcRn α -lánc funkcionális formában kifejeződik

patkány epitél sejtvonalban (IMDC) és köti a szarvasmarha IgG-t (Kacs Kovics et al., 2000). Mivel a patkány és egér közeli rokon faj és β 2-mikroglobulinjuk erősen konzervált (Tysoe-Calnon et al., 1991), feltételezhető volt, hogy a Tg egérben kifejeződő hibrid FcRn is megőrzi megfelelő kötőképességét és IgG metabolizmusban betöltött szerepét. Az ennek igazolása érdekében elvégzett egér IgG kiürülés vizsgálat megerősítette, hogy nincs kimutatható β 2m deficiencia a Tg egerekben és a bFcRn α -lánc funkcionális egységet alkot az egér β 2m-nal (**11. ábra**). Eredményeink alapján az egér IgG kiürülése vad típusú egérben jól korrelált a korábban publikált adatokkal (Ghetie et al., 1996; Ghetie et al., 1997; Israel et al., 1996; Medesan et al., 1997), míg Tg egérben szignifikánsan csökkent, jelezve, hogy a beinjektált IgG lebomlását jelentősen csökkenti az egér FcRn mellett kifejeződő bFcRn-egér β 2m hibrid *in vivo*. A kísérlet arra is utal, hogy a bFcRn α -lánc citoplazmikus doménje megfelelően vesz részt az egér sejtekben zajló jelátviteli folyamatban (protein-sorting). Habár a bFcRn citoplazmikus doménje 10 aminosavval rövidebb, mint az egér FcRn esetén (Kacs Kovics et al., 2000), az intracelluláris útvonalban kulcsfontosságú szerepet játszó motívumok nem különböznek (Ward and Ober, 2009).

Korábbi *in vitro*, valamint normál és humán IgG-t termelő transzkromoszómális borjakban végzett *in vivo* kísérletek kimutatták, hogy a bFcRn erősebben köti a humán IgG molekulákat, mint a fajazonos szarvasmarha IgG-t (Kacs Kovics et al., 2006a). A bFcRn α -lánc és egér β 2m hibrid receptor humán IgG kötési tulajdonságának tesztelésére kétféle dózisu humán IgG-t fél-életidejét határoztuk meg vt és 4 kópiás bFcRn Tg egerekben (**12. ábra**). A Tg egerekben megfigyelhető csökkent hIgG kiürülési ráta arra utal, hogy a hibrid receptor és humán IgG interakciója az FcRn Tg egerekben is megvalósul, azaz a receptor képes megóvni a humán IgG molekulákat a lebomlástól. A kétféle dózisu humán IgG beinjektálását követően kapott fél-életidő gyakorlatilag megegyezik a két vad típusú, valamint a két Tg egércsoport között (vt $111,4 \pm 17,8$ és $108,2 \pm 3,7$ óra, Tg $171,5 \pm 14,6$ és $181 \pm 7,7$ óra), jelezve, hogy a kétszeres mennyiségű humán IgG bejuttatása sem telíti a receptorkészletet és nem változtatja meg az állatok fiziológiás IgG homeosztázisát. Ezek a kísérletek és mások által végzett vizsgálatok (Lu et al., 2007; Petkova et al., 2006) is rámutattak arra, hogy a normálisnál magasabb FcRn expresszió csökkenti az exogén IgG katabolizmusát.

Munkacsoportunk ezt követően egy másik izgalmas kérdést vizsgált, azaz a bFcRn Tg egerek antigén specifikus ellenanyag termelését. Az FVB/N genetikai háttérű vad típusú és 4, illetve 5 kópia bFcRn-t hordozó Tg egereket ovalbuminnal immunizálva az antigén

specifikus IgG (**13/A ábra**) és IgM (Cervenak et al., 2011) szintje a szekunder immunválasz során szignifikánsan magasabbnak bizonyult a Tg egerekben. A totál egér IgG koncentrációja már immunizálatlan állapotban is magasabb volt a Tg állatokban, majd állandó emelkedést követően a szekunder immunválasz során mindkét transzgenikus egérvonal egyedeiben sokszorososan meghaladta a vt kontrollokban mérhető értéket (**13/B ábra**). A megnövekedett ellenanyagszintet a lép méretének, a lépsejtek és antigén specifikus ellenanyagot termelő lépsejtek számának növekedése kísérte (Cervenak et al., 2011). A lépből izolált sejtpopulációk vizsgálata rávilágított arra, hogy a Tg egerek lépe valamivel több T és B sejtet, és jelentősen több granulocitát, plazmasejtet és dendritikus sejtet tartalmaz, mint vt társaik esetében (Cervenak et al., 2011).

Az immunkomplexek jelentős humorális immunválaszt kiváltó tulajdonsága régóta ismert, több tanulmány igazolta, hogy képesek az ellenanyagtermelés növelésére (Coulie and Vansnick, 1985; Kunkl and Klaus, 1981; Laissue et al., 1971). Nemrégiben kimutatták, hogy az antigén és a primer immunválasz során termelődött, már jelenlévő ellenanyag által *in vivo* formált immunkomplexek aktiválják a naív B-sejteket, felgyorsult kinetikájú és megnövekedett mértékű válaszra készítetve azokat (Goins et al., 2010). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a szekunder immunválasz során megfigyelt megnövekedett antigénspecifikus IgM és IgG szint a naív és memória B-sejtek hatékonyabb aktivációjának eredménye a Tg egerekben, ami egyúttal megmagyarázza a szekunder immunválasz során az antigén specifikus ellenanyagok szintjének különbségét vt és Tg egerekben. Az immunizált vt és Tg egerekben jelentkező erőteljes neutrofil beáramlással (Cervenak et al., 2011) párhuzamba állítható az a megfigyelés, miszerint antigén-IgG által formált immunkomplexek jelenlétében a területet ellátó nyirokcsomókban az antigénspecifikus sejtek döntő többsége neutrofil granulocita és az immunkomplex mennyisége jól korrelál a nyirokcsomókba belépő neutrofil granulociták számával (Maletto et al., 2006). Mivel a Tg egerek jóval több antigénspecifikus IgG-t termeltek, mint a kontrollok, így arra következtethetünk, hogy a granulociták számában a Tg egerek javára jelentkező különbséget legalább részben a Tg állatokban kialakuló több immunkomplex magyarázza. A neutrofil granulociták adaptív immunválaszt fokozó fontos és sokrétű tevékenységére utaló eredményeket nemrég foglalták össze (Soehnlein, 2009). Már korábban bizonyították az FcRn jelenlétét a neutrofil granulocitákban, és részvételét a fagocitózis folyamatában (Vidarsson et al., 2006). Munkacsoportunk igazolta, hogy a bFcRn kifejeződik a Tg egerek neutrofil granulocitáiban, valamint azt, hogy ezen sejtek fagocitózisa fokozottabb, mint a vt egerek esetén (Cervenak et al.,

2011). Az FcRn B-sejtek klonális expanziója révén kiváltott, humorális immunválaszt befolyásoló hatása meglepő felismerés volt. Korábbi tanulmányok ellentmondó eredményei szerint az antigénstimulusra adott IgG válasz csökken (Christianson et al., 1997; Ghetie et al., 1996; Israel et al., 1995) vagy növekszik (Lehmann-Grube et al., 1993; Noble et al., 1998) funkcionális FcRn-t kifejezni képtelen $\beta 2m$ -hiányos egerekben. Ezzel szemben az IgG szintézis károsodása nem volt kimutatható FcRn α -lánc KO egerekben, és a megfigyelhető alacsony szérum IgG okaként a hiányos IgG védelmet jelölték meg (Roopenian et al., 2003).

Mindezek mellett az FcRn kifejeződését nemrégiben kimutatták a humorális immunválaszban kulcsszerepet játszó professzionális antigénprezentáló sejtekben (APC) is (Liu et al., 2007; Mi et al., 2008; Qiao et al., 2008; Zhu et al., 2001). Az elvégzett vizsgálatok alapján az FcRn hatékonyan fokozza a fagocitózist és az IgG-antigén immunkomplexeket a lizoszómákba irányítja (Mi et al., 2008; Qiao et al., 2008). A receptor utóbbi funkcióját az is alátámasztja, hogy az általában APC-re korlátozódoan megjelenő, MHC II molekulához kapcsolódó invariáns lánc kapcsolódhat az FcRn-nel és a lizoszómákba irányíthatja azt (Ye et al., 2008). Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy az FcRn degradációs sejtkompartmentekbe irányítja az IgG-vel kapcsolt antigént, ami kapcsolatban áll az MHC II molekulák antigénből származó peptidekkel való feltöltésével (Ward and Ober, 2009). Mivel a bFcRn Tg egerek lépe jelentősen több dendritikus sejtet (DC) tartalmaz (Cervenak et al., 2011), és mind a DC-kben, mind a makrofágokban kimutatható a bFcRn fehérje szinten (**21. ábra**), valamint a Tg makrofágok és dendritikus sejtek fagocitózisa hatékonyabb, és a DC-k sokkal nagyobb T_H-sejt proliferációt indukálnak a vt kontrollokhoz képest (Vegh et al., 2012), így valószínűsíthető, hogy a T_H-sejtek fokozott aktiválása is hozzájárul a bFcRn Tg egerek jelentősen fokozott szekunder immunválaszához. Az eddigi eredmények alapján feltételezhető, hogy az FcRn kifejeződésének fokozódása nem csupán megvédi az antigénspecifikus IgG-t a lebomlástól, hanem fokozza az antigénspecifikus B-sejtek és plazmasejtek expanzióját is a másodlagos nyirokszervekben. Habár ez a két hatás egymást erősíti, a Tg egerekben az IgG megővésében jelentkező viszonylag kis előny (~30 %-kal hosszabb féléletidő vt kontrollokhoz képest, **11. ábra**), szemben az antigénspecifikus IgG szint meredek emelkedésével (**13/A ábra**) arra utal, hogy a fokozott immunválasz és IgG termelés jelentősége meghaladja az IgG védelemre gyakorolt hatást. Igaz ez különösen abban az esetben, amikor a plazma IgG koncentrációja relatív alacsony és a rendelkezésre álló FcRn-készlet nem telített.

A bFcRn Tg egerek immunválaszában megnyilvánuló különbségek igen előnyösek lehetnek nem csak a poliklonális, hanem a monoklonális ellenanyagok előállítására terén is, így a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a lépbeli antigén-specifikus B-sejtek nagy száma együttjár-e több antigénspecifikus hibridóma képződésével. Vizsgálatainkhoz az eredeti, BAC transzgenézis során előnyösebben használható FVB/N genetikai háttér helyett már az immunológiai kutatásokban és a monoklonális ellenanyagok előállításában elterjedtebben alkalmazott Balb/c háttérre keresztezett állatokat használtuk, melyek 5 kópia bFcRn-t hordoznak. Az 10. generációs egyedek genetikai háttér szempontjából kongenikusnak minősülnek (Flaherty, 1981; Silver, 1995), így kísérleteinkbe ezek utódait vontuk be. Az immunizálatlan vt és bFcRn Tg Balb/c egerek totál szérum IgG (**14/A ábra**), valamint szérum albumin (**14/B ábra**) koncentrációja is különbséget mutatott a Tg állatok javára, jelezve a receptor magasabb szintű kifejeződésének e két fehérjére gyakorolt védő hatásának meglétét. Az állatokat hibridóma-előállítás céljából két standard antigénnel (TNP-OVA és TNP-KLH konjugátum) immunizálva a Tg egerekben jelentősen megemelkedett mind a haptén-, mind a hordozó-specifikus IgG títere (**15. ábra**), bizonyítva a Tg állatok kimagasló immunválaszában genetikai háttértől való függetlenségét. A bFcRn overexpressziója immunizálás hatására nagyobb méretű lép kialakulását eredményezte (**16/A ábra**), amely több lépsejtet (**16. ábra, B és C**), valamint több antigénspecifikus B-sejtet és plazmasejtet (**17. ábra**) tartalmazott, mint a vt állatok esetén. A kísérleti állatok kis egyedszáma miatt (3 illetve 4 egér csoportonként) az adatok nem minden esetben bizonyultak szignifikánsan különbözőnek, de teljesen megegyeznek a bFcRn Tg egerek fokozott immunválaszáról szóló korábbi megfigyelésekkel (Cervenak et al., 2011; Vegh et al., 2011).

Ezt követően standard Sp2/0-Ag14 mielóma sejtekkel fuzionáltattuk az immunizált állatok lépsejtjeit, és kimutattuk, hogy a Tg egerek sejtjeiből kétszer annyi hibridóma mikrokultúra (MC) jött létre, mint a vt kontrollok esetén. (A hibridóma mikrokultúra kifejezés a sejtenyésző edény egy mélyedésében növekvő sejtek összességét jelenti, melyek lehetnek egy vagy több hibridóma utódsejtjei, ellentétben a hibridóma vagy hibridóma klón fogalmával, mely egyetlen sejtől származó populációt jelöl.) A hibridóma mikrokultúrák további elemzése kimutatta, hogy ezek közül Tg állatok esetén jóval nagyobb arányban találunk haptén- vagy hordozó-specifikus IgM vagy IgG ellenanyagot termelő MC-t (**1. táblázat**). Mindezek alapján elmondható, hogy a bFcRn kifejeződés fokozódása nem gátolta a fúziót és nem csökkentette a hibridómák életképességét. A hibridizációs frekvencia adatok (keletkezett hibridóma MC száma

azonos lépsejtszámra vonatkoztatva) alapján a Tg egerek esetén a 10^8 lépsejtből kialakuló antigén-specifikus ellenanyagot termelő MC száma többszöröse a kontrolloknak (**2. táblázat**)

A monoklonális ellenanyagok fejlesztésének növekvő igényével már korábban előtérbe került olyan genetikailag módosított egértörzsek alkalmazásának lehetősége, melyek használata több hibridóma kialakulását eredményezi. Ilyen például az MRL/lpr egértörzs, melynek egyedei spontán kialakult Fas molekula hiánnyal jellemezhetők, amely poliklonális B sejt proliferációval és hipergammaglobulinémiával jár. Takahashi és munkatársai immunizálást követően nyolcszor annyi katalitikus ellenanyagot termelő hibridómát izoláltak MRL/lpr egerekből, mint kontroll társaikból, melyre magyarázatot adhat az állatok lépsejtjeiben a Fas gén hiányának következtében létrejövő apoptózis-rezisztencia, így a negatív szelekció kikerülése (Takahashi et al., 2000). Egy másik munkacsoport 8 immunizálatlan nőtény MRL/lpr egér lép- és nyirokcsomó sejtjeiből sikeresen létrehozott 15, retrovírus gp70 specifikus autoellenanyagot termelő hibridóma klónt (Tabata et al., 2000).

Az apoptózis gátlásának hatásait vizsgálták továbbá olyan transzgenikus egerek immunválasza kapcsán is, amelyekben fokozottan termelődik az antiapoptotikus Bcl-2 molekula (Strasser et al., 1990). Ezen állatok immunizálása juh vörösvértestekkel fokozott és időben meghosszabbodott antigén specifikus IgM és IgG válasszal járt (Strasser et al., 1991). A Bcl-2 Tg egerek β -galaktozidázal történő immunizálása a vt kontrollokhöz képest 2-5-ször nagyobb számú lépsejt keletkezésével járt, amelyek mielóma sejtekkel történő fúzionáltatása több antigén specifikus ellenanyagot termelő hibridóma mikrokultúrát eredményezett (Knott et al., 1996). Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy az apoptózist gátló gének módosítása fokozott hibridóma termeléssel járhat együtt; mindazonáltal erősen autoimmun tulajdonságaik jelentősen korlátozzák a Tg egértörzsek használatát. Az autoimmun ellenanyagok nagy mennyisége előnyös lehet, ha ilyen immunglobulint termelő hibridóma izolálása a cél, ugyanakkor jelentősen növelhetik az antigén specifikus klón kiválasztásához szükséges időt és anyagköltséget. Emellett ezekben az egerekben spontán kifejlődik az emberi szisztémás lupusz eritematózusra hasonlító immunkomplex-mediált betegség (Andrews et al., 1978; Strasser et al., 1991; Vyse and Kotzin, 1998).

A kívánt antigénnel szembeni fokozott immunválasz kiváltásának egy másik eszköze az immunkomplexek hatékonyabb immunválaszt kiváltó tulajdonságán alapul (Coulie and Vansnick, 1985; Kunkl and Klaus, 1981; Laissue et al., 1971). Keler és munkatársai

kimutatták, hogy humán Fc γ RI (CD64) transzgenikus egerekben a receptorhoz irányított antigén áttörheti a saját antigénnel szembeni immunológiai válaszképtelenséget (Keler et al., 2000). Mivel ebben az esetben az antigént speciális irányító molekulával kell összekapcsolni, ez a módszer alkalmasabb emberi vakcinázás hatékonyságának növelésére, mint hibridóma előállítására (Keler et al., 2005). Ugyanekkor újabb vizsgálatok megerősítik ezen eljárás szerepét a mAb előállítása kapcsán is (Yan et al., 2009).

A nagy mennyiségű immunkomplex jelenlétében életbe lépő, immunválaszt szabályozó mechanizmusok blokkolása, vagyis a B-sejt aktiválást gátló Fc γ RIIB receptorok eltávolítása újabb ígéretes lehetőséget jelentett az immunválasz fokozás és nagyobb számú antigén specifikus B-sejt képződés irányába. Az Fc γ RIIB hiányos egerek valóban fokozott ellenanyag termeléssel, azonban egyúttal megnövekedett anafilaktikus reakcióval is jellemezhetők (Takai et al., 1996), ezenkívül spontán sejtmag ellenes ellenanyagokat (antinuclear antibodies, ANA) termelnek és végzetes glomerulonefritiszt alakul ki szervezetükben (Bolland et al., 2002; Tiller et al., 2010). Kiderült az is, hogy a folliculáris dendritikus sejteken kifejeződő Fc γ RIIB fontos szerepet tölt be az antigén prezentációjában, azaz a receptor hiánya ezt az alapvetően fontos folyamatot is károsítja (Qin et al., 2000). Mindezek alapján ez a Tg modell sem váltotta be a hatékonyabb mAb előállításhoz fűzött reményeket.

Ezek az eredmények jól példázzák, hogy az immunválasz fokozása növeli az autoimmun betegségek kockázatát. Annak kizárására, hogy a bFcRn Tg egerek megnövekedett immunválaszát a B-sejt szelekció szabályozásának zavara kíséri, az ELTE Immunológiai Tanszéken kifejlesztett microarray formátumú ellenanyag profil vizsgálatot végeztünk, ismert autoantigének széles skáláját használva (Papp et al., 2007). Az idős bFcRn Tg egerek ellenanyag profilja ugyanolyannak bizonyult, mint a vt kontrollokban, és egyik esetben sem volt kimutatható sejtmag ellenes ellenanyagok jelenléte (**18. ábra**). A fokozott immunválasz nem eredményezte spontán autoimmun körkép kialakulását a bFcRn Tg egerekben, így autoimmun jelleg nem korlátozza ezen állatok mAb előállítási eljárásokban való részvételét.

A bFcRn overexpresszió immunválaszt fokozó mechanizmusainak megértése érdekében szükséges a receptor érzékeny, fehérje szintű kimutatása (akár a sejten belüli folyamatok detektálása). A bFcRn DNS és RNS szintű kimutatása megoldott, de fehérje szintű detektálása Western blot és immunhisztokémia módszerre korlátozódik. A Tg egerek sejteiben és szöveteiben lévő kifejeződő receptor fluoreszcens rendszerekben történő

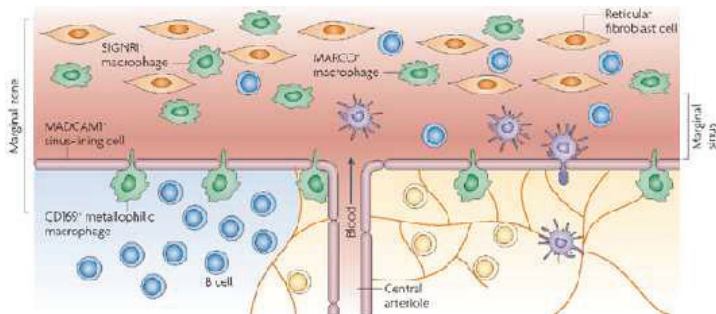
detektálására (citofluorimetria, fluoreszcens mikroszkópia) először a munkacsoport által korábban létrehozott, immunizált nyulakból (Kacskovics et al., 2006a; Mayer et al., 2004; Mayer et al., 2002) nyert poliklonális ellenanyagot teszteltük. A teszteléshez bFcRn-t alapszinten (MacT), illetve fokozottan (B4) kifejező szarvasmarha sejtvonalat használtunk (Kacskovics et al., 2006a), a sejtekben termelődő receptor mennyiségének és funkcióképességének igazolására annak pH-dependens IgG kötő tulajdonságát elemeztük (19. ábra). A két sejtvonalt alkotta tesztrendszerben vizsgálva a poliklonális nyúl ellenanyag által detektálható jel erőssége és lokalizációja az FcRn felismerésére utalt (20. ábra), de mennyiségi korlátok miatt nem tudtuk alkalmazni a bFcRn Tg egerek sejtjeiben a transzgen kifejeződésének vizsgálatára.

A továbbiakban sbFcRn-nel immunizált egér lépsejtjeinek fúziójával előállítottunk olyan hibridóma vonalakat, amelyek által termel monoklonális ellenanyag a bFcRn specifikus felismerésére képes. Az 1E5/2 jelű ellenanyag a bFcRn denaturált állapotú α -láncát detektálta nagy érzékenységgel a Tg egerek hasüregi makrofágjaiban és csontvelői eredetű dendritikus sejtjeiben (DC) (21. ábra), amely sejtek fokozott immunkomplex fagocitózissal és hatékonyabb antigén prezentációval jellemezhetők, mint vt eredetű társaik (Vegh et al., 2012). E két sejt típusban kimutatható erős bFcRn kifejeződés összhangban van az egér FcRn hasonlóan nagymértékű expressziójával (Immunological Genome Project, www.immgen.org). Ez arra utal, hogy a bFcRn α -lánc génjét megfelelően szabályozzák az egér transzkripció mechanizmusai a Tg egérmodellben. A Tg DC-ben a bFcRn körülbelül tízszer akkora mértékben fejeződik ki mRNS szinten, mint az egér FcRn, ami esetleg a csontvelői eredetű DC differenciálathoz használt IL-4 és/vagy GM-CSF bFcRn expressziót stimuláló hatásának következménye, míg ugyanezen faktorok az egér FcRn expressziójára vélhetően nem gyakorolnak ekkora hatást (Vegh et al., 2012).

Habár neutrofil granulocitákban mások reverz transzkriptáz, citofluorimetriás, elektron- és konfokális mikroszkópos (Vidarsson et al., 2006), valamint korábbi saját reverz transzkriptáz PCR eredményeink (Cervenak et al., 2011) alapján kimutatható az FcRn jelenléte, az elvégzett Western blot (21. ábra) során nem volt detektálható a receptor kifejeződése. Ehhez hasonlóan a B-sejtekben az utóbbi időben reverz transzkriptáz PCR-rel és citofluorimetriával kimutatták az FcRn expresszióját (Mi et al., 2008; Montoyo et al., 2009), bár ezt sem a korábbi vizsgálatok (Akilesh et al., 2007; Ghetie et al., 1996; Zhu et al., 2001), sem saját Western blot eredményünk (21. ábra) nem igazolta. Talán egy érzékenyebb módszer (pl. monoklonális ellenanyaggal elvégzett áramlási

citofluorimetria) alkalmasabb lehet az FcRn kimutatására a bFcRn Tg állatoknak ezekben a sejteiben is (amelyek vélhetően csak kismértékben fejezik ki a receptort), mint a nagyobb mennyiségű fehérjét megbízhatóan kimutató Western blot technika.

A sbFcRn-nel immunizált állat lépsejtjeinek fúziója során előállítottunk egy olyan hibridóma klónt is (1F2/3), amely által termelt monoklonális ellenanyag fluoreszcens mikroszkópos és citofluorimetriás tesztrendszerben a bFcRn lokalizációjának és expresszió-különbségének megfelelő jelet adott (**22. és 23. ábra**), de a monoklonális ellenanyag alkalmazhatóságának megítéléséhez további vizsgálatok elvégzése szükséges. Mindezek után, a munkacsoport által korábban létrehozott bFcRn specifikus poliklonális csirke IgY-t teszteltük, amely a MacT, valamint a bFcRn-t fokozottan kifejező B4 sejtek alkotta tesztrendszerben az FcRn expresszió-különbségének és vezikuláris lokalizációjának megfelelő jelet adott (**24. ábra, B és C**), és az FcRn α -láncának specifikus felismerését a sejtek lizátumával elvégzett Western blot is megerősítette (**24/A ábra**). A reagens segítségével így kimutattuk az FcRn expresszióját immunizálatlan vt és bFcRn Tg egerek lépmezetein is (**25. és 26. ábra**). A vt egerek mintáján megfigyelhető specifikus jelölés arra utal, hogy a poliklonális ellenanyag az egér FcRn molekuláját is felismeri (és a nyúl FcRn-nel is reagál (Lemos et al., 2012)). A receptor jele a Tg mintákon több sejten és nagyobb intenzitással látszik, ami fentiek ismeretében valószínűleg az egér és szarvasmarha FcRn együttes felismeréséből adódik. Az egyidejűleg alkalmazott sejtmarkerek révén azonosítható, hogy az erősen FcRn pozitív sejtek leginkább a T- és B-sejtes zónán kívül, a marginális zónában illetve vörös pulpában, kisebb mértékben ugyanakkor a B-sejtes zónában, elszórtan is lokalizálódnak (**25. ábra**). Az FcRn-t erősen kifejező sejtek azonosítása céljából jelöltük továbbá a MARCO+ (macrophage receptor with a collagenous structure) marginális zóna makrofágokat is, melyek az FcRn pozitív sejtpopuláció egy részét alkotják (**26. ábra**). A lokalizáció alapján az FcRn-t kifejező sejtek között lehetnek még a vörös pulpa makrofágok, valamint a MAdCAM-1+ (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule) marginális szinusz bélő endotélsejtek és a CD169+ metallofil makrofágok is, melynek tisztázása további vizsgálatok elvégzését teszi szükségessé. A lép marginális zónájában lokalizálódó, különböző sejtmarkerekkel rendelkező makrofág populációk elhelyezkedését a **27. ábra** szemlélteti.



27. ábra A lép marginális zónájának és makrofágjainak sematikus bemutatása

A CD169+ metallofil makrofágok a marginális szinusz belső felületén lokalizálódnak, és a MADCAM+ marginális szinusz endotélsejtek választják el a marginális zóna külső részén található MARCO+ makrofágoktól, melyek populációja részben átfed a SIGIRR1+ makrofágokkal. (Junt et al., 2008)

Az FcRn legkorábban dokumentált szerepe az IgG molekulák megóvása a lebomlástól (Brambell et al., 1964), így a marginális zóna sejtcsoportjainak FcRn kifejeződése hozzájárulhat a bFcRn Tg egerekben tapasztalható magasabb IgG szint kialakulásához. Nemrégiben Akilesh és munkatársai kimutatták, hogy az FcRn a csontvelői eredetű sejtekben is kifejeződik és az ereket bélelő endotélsejtekben expresszálódó FcRn-nel együtt az IgG homeosztázis fő fenntartójaként funkcionál. Az általuk elvégzett immunhisztokémiai jelölés során FcRn detekciót tapasztaltak vt egerek lépének szinuszoidjaiban és a marginális szinusz endotéliumban, valamint kimutatták, hogy az erősen jelölődő sejtek egy része F4/80 pozitív vörös pulpa makrofág (Akilesh et al., 2007). Egyéb sejtmarker hiányában csupán a lokalizáció alapján valószínűsíthető, hogy a marginális zóna sejtjei is az FcRn expresszióval jellemezhető sejtek között találhatóak és vélhetően részt vesznek az IgG molekulák féléletidejében meghosszabbításában.

A FcRn az IgG megóvásán túl szerepet játszik a fagocitózis és az antigén prezentáció folyamatában is, hozzájárulva a humorális immunválasz kialakulásához. A neutrofil granulociták, bélrendszeri makrofágok, vérbeli monociták és dendritikus sejtek esetén bizonyított az FcRn funkcionális kifejeződése, valamint neutrofil granulociták és dendritikus sejtek esetén szerepe a fagocitózis és antigén prezentáció folyamatában (Baker et al., 2011; Qiao et al., 2008; Vidarsson et al., 2006; Zhu et al., 2001), és ez a folyamat a bFcRn Tg egerek neutrofil granulocitái, peritoneális makrofágjai és csontvelői eredetű dendritikus sejtjei esetén hatékonyabb, mint vt társaikban (Cervenak et al., 2011;

Vegh et al., 2012). A marginális zóna makrofág populációiban kifejeződő FcRn szerepe tisztázásra vár, de e sejtek lokalizációja ideális a vér által szállított antigének megkötésére (27. ábra). A CD169+ metallofil makrofág populáció sejtjeiről igen korán leírták, hogy szükségesek a patogének ellen kialakuló T-dependens immunválasz létrejöttéhez (Buiting et al., 1996), és különböző patogéneket (baktérium, vírus, prion) kötnek meg a másodlagos nyirokszervekben (Aichele et al., 2003; Buiting et al., 1996; Hickman et al., 2008; Manuelidis et al., 2000). A patogénekon kívül a szervezetben eredendően jelenlévő természetes ellenanyagok és antigének alkotta immunkomplexek megkötésére is képesek (Ochsenbein and Zinkernagel, 2000). Régóta ismert, hogy immunizálatlan emberek és egerek szervezetében spontán kialakuló, természetesen ellenanyagok léteznek különböző antigének ellen (Avrameas, 1991; Herzenberg and Kantor, 1993). A vérkeringésbe jutó antigéneket a természetes ellenanyagok megkötik, így azok jóval hatékonyabban szűrődnek ki a lépben (Lutz et al., 1987; Ochsenbein et al., 1999). Ezen ellenanyagok többsége IgM, de IgG izotípust is leírták (Avrameas, 1991), ami felveti az IgG tartalmú immunkomplexek megkötésére képes FcRn szerepének lehetőségét is ezekben a sejtekben. Ezenkívül intenzíven kutatott terület a CD169+ metallofil makrofágok funkciója az antigén prezentációs folyamatok (B-sejtek, iNKT-sejtek és CD8+ T-sejtek aktiválása) során (Martinez-Pomares and Gordon, 2012); a metallofil makrofágokban esetlegesen kifejeződő FcRn hozzájárulhat ezekhez a mechanizmusokhoz.

A lép marginális zónájában a CD169+ metallofil makrofágok mellett található továbbá SIGNR1 (C-type lektin specific intracellular adhesion molecule –grabbing nonintegrin receptor 1) pozitív makrofágok is (27. ábra), melyek ugyancsak a patogének filtrációjában vesznek részt, különösen a vérbeli bakteriális antigének karbohidrátját kötik hatékonyan (Geijtenbeek et al., 2002; Kang et al., 2004). A MARCO receptorral jellemezhető marginális zóna makrofág populáció is képes patogének megkötésére, továbbá részt vesz a nyirokcsomó mikrokörnyezetének fenntartásában és a T-independent B-sejt válasz kialakulásában (Chen et al., 2005). Nemrégiben kimutatták, hogy az FcγRII/III receptorokhoz irányított immunkomplexek a MARCO+ marginális zóna makrofágokban lokalizálódnak (Angyal et al., 2009; Szarka et al., 2012) és mind T-independent, mind T-dependens antigén esetén növelik a haptén-specifikus IgM és IgG termelő lépsejtek számát (Angyal et al., 2009). Ismeretes az is, hogy a marginális zóna makrofágok MARCO és SIGNR1 receptorai nem csupán az antigének megkötésében játszanak fontos szerepet, hanem ezek a molekulák a marginális zóna B-sejtek antigén kötéséhez is szükségesek (You et al., 2011). A közelmúltban bizonyították, hogy a

marginális zóna B-sejtek „ingáznak” a marginális zóna és a B-sejtes folliculusok között és hatékonyan juttatják el az antigént a folliculáris dendritikus sejteknek (Cinamon et al., 2008). Régóta ismert, hogy a folliculáris dendritikus sejtek felelősek az immunkomplexek hosszú idejű retenciójáért (Chen et al., 1978; Mandel et al., 1980; Tew et al., 1980). Mind a C3d borított antigének (Dempsey et al., 1996), mind az IgG-antigén alkotta immunkomplexek (Fossum, 1980; Nossal et al., 1965) jelenléte a folliculáris dendritikus sejteken a B-sejt aktiváció stimulálásával jár (Ild. korábban).

Az FcRn jelenléte a MARCO+ marginális zóna makrofágokban így hozzájárulhat az IgG-antigén immunkomplexek megkötéséhez, esetleges feldolgozásához, amely folyamatot a bFcRn Tg egerek fokozott FcRn expressziója hatékonyabbá teheti. A MARCO+ marginális zóna makrofágok (és egyéb lépsejtpopulációk) FcRn expressziója így szerepet játszhat a lépben zajló fagocitózis és antigén prezentációs folyamatokban.

Érdekes megfigyelés továbbá, hogy LPS hatására a MARCO receptor kifejeződése nagymértékben megnő a lépbeli marginális zóna makrofágokon (Chen et al., 2010), és munkacsoportunk kimutatta, hogy LPS hatására bFcRn Tg egerek lépében az FcRn expressziója is jelentősen emelkedik (Cervenak et al., 2008) – az esetleges interakció felderítése hozzájárulhat a bFcRn Tg egerekben tapasztalható fokozott immunválasz mechanizmusainak mélyebb megértéséhez.

A felmerült kérdések kapcsán a továbbiakban tervezzük immunizált vt és bFcRn Tg egerek lépében lokalizálódó sejtpopulációk (CD169+ makrofágok, marginális zóna B-sejtek, dendritikus sejtek, folliculáris dendritikus sejtek, germinális centrumok, stb) azonosítását, lokalizációjának és mennyiségének összehasonlítását, az FcRn-t kifejező sejtek azonosítását és a receptor-expresszió változásának monitorozását, valamint az egerek vérkeringésébe juttatott IgG-antigén immunkomplexek sorsának követését.

Mindehhez szükség lehet az FcRn érzékenyebb, akár citofluorimetriás rendszerben történő kimutatására is, melyre a jelenleg tesztelés alatt álló monoklonális ellenanyagok biztosíthatnak lehetőséget. Az FcRn kifejeződésének pontosabb elemzése a másodlagos nyirokszervekben e receptor működésének további karakterizálásához vezethet.

Összefoglalásként elmondható, hogy a poli- és monoklonális ellenanyag termelés hatékonyságának növelése érdekében a transzgenézissel kiváltott FcRn kifejeződés fokozása mindaddig ismeretlen megközelítésnek számított. A bFcRn Tg egerek fokozott immunválasza és hibridóma-előállítási képessége az antigénprezentáció és a termelődött ellenanyagok diverzitásának növekedésével társul (Vegh et al., 2012), és a Tg állatok

gyengén immunogén antigénekre is megfelelő mértékű specifikus ellenanyag-termeléssel reagálnak (Onisk et al., 2012; Vegh et al., 2011). Mindezeket figyelembe véve sokat ígérő lehetőséget jelenthet a bFcRn túltermeltetése emberi ellenanyagot termelő humanizált egerekben is, hiszen ismeretes, hogy a humán IgG-t termelő transzgenikus egerek immunválasza nem minden esetben kielégítő (Carter, 2006). Az erős bFcRn-humán IgG interakció (Kacs Kovics et al., 2006a), valamint saját eredményeink (**13. ábra**) alapján feltételezhető, hogy a bFcRn túltermeltetése jelentősen fokozza a humanizált egerek immunválaszát. Munkacsoportunk a közelmúltban karakterizálta a nyúl FcRn-t és kimutatta, hogy azok a transzgenikus nyulak, amelyek fokozott mértékben fejezik ki a nyúl FcRn-t – a bFcRn Tg egerekhez hasonlóan – hatékonyabb humorális immunválasszal rendelkeznek (Lemos et al., 2012). Tekintettel arra, hogy az FcRn minden emlős fajban jelen van és hasonló funkciókkal bír, kijelenthetjük, hogy az FcRn kifejeződésének mesterséges fokozása transzgenikus állatokban alkalmas eszköz a poli- és monoklonális ellenanyagok hatékonyabb előállítására.

8 Új tudományos eredmények

1. Megállapítottuk, hogy a bFcRn Tg egerekben a bFcRn α -lánc és az endogén egér β 2-mikroglobulin funkcionális receptort alkot, és hatékonyan megóvjva az egér IgG1 és humán IgG molekulákat a lebomlástól.
2. Megállapítottuk, hogy T-dependens antigénnel immunizálva a bFcRn Tg egerekben (FVB/N és Balb/c genetikai háttéren) szignifikánsan magasabb antigén specifikus IgG és IgM, valamint totál IgG mérhető, mint a vad típusú kontrollokban.
3. Kimutattuk, hogy a hibridóma-előállítás célzó immunizálást követően a bFcRn Tg egerek lépének mérete és lépsejtjeinek száma nagyobb, és lépsejtjeiből jelentősen több hibridóma mikrokultúra keletkezik, mint a vad típusú állatok lépsejtjeiből.
4. Megállapítottuk, hogy a bFcRn Tg egerek lépsejtjeiből keletkezett hibridóma mikrokultúrák jóval nagyobb számban termelnek hordozó- és/vagy haptén-specifikus ellenanyagot, mint a kontrollok esetén.
5. Megállapítottuk, hogy a bFcRn Tg egerek lépsejtjeiből nem csak számában, hanem arányában is több hibridóma mikrokultúra képződik, így a fúzió hibridizációs frekvenciája magasabb.
6. Igazoltuk, hogy idős (nem immunizált) bFcRn Tg egerekben nem mutatható ki autoimmun ellenanyagok jelenléte.
7. A bFcRn fehérje szintű kimutatásához egér monoklonális ellenanyagokat fejlesztettünk.
8. Kimutattuk, hogy immunizálatlan bFcRn Tg egerek lépének szerkezete (T- és B-sejtes zóna) alapvetően nem tér el a vt kontrollhoz képest, és a MARCO+ marginális zóna makrofágok nagymértékben kifejezik az FcRn-t

9 Összefoglalás

A specifikus ellenanyagok előállításánál a termelésbe bevont állatokat többször immunizálják, hogy a specifikus ellenanyagok szintje a lehető legmagasabb legyen (hiperimmunizálás). Az eljárás során az antigénre specifikus IgG szintje meghaladhatja a fajra jellemző normál értéket, aminek következtében telítődik az IgG protektív FcRn molekula és ezért az IgG lebomlásának üteme felgyorsul.

Az MHC I-szerű, α -lánc és β_2 -mikroglobulin alkotta neonatális Fc receptor (FcRn) szabályozza az IgG és albumin molekulák homeosztázisát, közreműködik a maternális immuntranszportban, fontos szerepet játszik a fagocitózis és antigén prezentáció folyamatában. Annak érdekében, hogy az immunizált állatokban fenntartható legyen a magas antigén-specifikus IgG szint, illetve a hiperimmunizáció során termelt értékes ellenanyagok lebomlása kisebb mértékű legyen, elemeztük az FcRn-t fokozottan kifejező (overexpresszió) transzgenikus egerekben a humorális immunválaszt.

Kimutattuk, hogy a szarvasmarha FcRn (bFcRn) α -láncát overexpresszáló transzgenikus (Tg) egerek vérpályájába juttatott egér és humán IgG felezési ideje megnövekedett a vad típusú társaikhoz képest, így a receptor nehézlánca működőképes egységet alkot az egér β_2 -mikroglobulinnal és hatékonyan óvja meg az IgG molekulákat a lebomlástól. A Tg egerek T-dependens antigénnel történő immunizálása szignifikánsan magasabb antigén specifikus IgM és IgG szintet, nagyobb méretű lépset, több lépsejtet és antigén-specifikus ellenanyagot termelő lépsejtet eredményez. A lépsejtek fúziója számában és arányában is több antigén-specifikus ellenanyagot termelő hibridóma mikrokultúra képződésével jár, és az állatokban idős korban sem mutatható ki autoreaktív ellenanyagok jelenléte, mely korlátozná felhasználásukat. A Tg egerekben zajló sejtszintű folyamatok vizsgálatát elősegítő, bFcRn-specifikus monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő, és kimutattuk, hogy a Tg egerek peritoneális makrofágjai, csontvelői eredetű dendritikus sejtjei és lép marginális zóna makrofágjai nagymértékben kifejezik az FcRn molekulát.

Összességében elmondható, hogy munkacsoportunk eredményei alapján az FcRn-t fokozott mértékben kifejező Tg állatok (egerek és nyulak) jelentős előnyt biztosítanak a poliklonális és monoklonális ellenanyagok előállítására.

10 Summary

The production of specific antibodies requires continuous immunization of the animals involved in the preparation process to achieve highest possible level of specific antibodies (a process referred to as hyperimmunization). Level of antigen-specific IgG can exceed normal values of the species during the process, resulting in saturation of FcRn molecule and accelerated IgG degradation as a consequence.

The neonatal Fc receptor (FcRn) is a heterodimer MHC I-like molecule and it is composed of an α -chain and a β_2 -microglobulin. This receptor has several functions: regulates IgG and albumin homeostasis, mediates maternal IgG transport, takes active part in phagocytosis and delivers antigen for presentation. To maintain high level of antigen-specific IgG in immunized animals we studied the effects of FcRn overexpression to humoral immune response in transgenic (Tg) mice.

We have confirmed that transgenic mice overexpressing the α -chain of bovine FcRn (bFcRn) show increased *in vivo* half-life of mouse and human IgG compared to wild type controls, demonstrating a functional unit of bovine α -chain and mouse β_2 -microglobulin that efficiently protects IgG molecules from degradation efficiently. Immunization of these Tg mice results in significantly increased antigen-specific IgM and IgG titers and is associated with larger spleen, more splenocytes, as well as with increased number of antigen-specific spleen B-cells and plasma cells in the spleen. Fusion of the splenocytes resulted in elevated number and ratio of antigen-specific antibody producing hybridoma microculture in Tg mice compared to controls. The augmented humoral immune response in these mice did not result in production of autoantibodies that could limit their use.

We have developed bFcRn-specific monoclonal antibodies with which we demonstrated strong bFcRn expression in peritoneal macrophages, bone marrow derived dendritic cells and spleen marginal zone macrophages.

In conclusion, these and our earlier results indicate that transgenic animals (mice and rabbits) that overexpress FcRn offer major advantages in production of polyclonal and monoclonal antibodies.

11 Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kacs Kovics Irmének az elmúlt években végzett munkám irányítását és támogatását, valamint a kísérlettervezés, laboratóriumi munka és prezentálása terén nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Erdei Annának támogatásáért és hogy lehetőséget biztosított számomra a Tanszéken való munkavégzésre.

Hálás vagyok Dr. Mayer Balázsnak, aki e munka első fázisát és egyben első laboratóriumi próbálkozásaimat egyengette türelemmel és segítőkészséggel.

Köszönöm Dr. László Glóriának a hibridóma-előállítással kapcsolatos számtalan gyakorlati és elméleti útmutatást.

Köszönöm Dr. Cervenak Juditnak, hogy baráti segítségére, széleskörű tapasztalatára mindig számíthattam.

Ezúton is köszönöm a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban dolgozó munkatársaknak, különösen Dr. Bősze Zsuzsának és Dr. Bender Balázsnak az egérkísérletek során nyújtott segítséget és útmutatást.

Köszönöm Dr. Prechl Józsefnek és Dr. Papp Krisztiánnak az antigén chip assay elvégzését és az ezzel kapcsolatos eszmecsereket.

Hálás vagyok Prof. Dr. Matkó Jánosnak és Dr. Balogh Andreának, hogy bevezettek az immuncitokémia, immunhisztokémia és konfokális mikroszkópia világába.

Köszönöm Dr. Balogh Péternek, valamint az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben dolgozó munkatársaknak a lép szövettani elemzése során nyújtott nélkülözhetetlen segítséget.

Hálás vagyok Pásztor Márta, Gősiné Kolena Gizella és Mikešy Árpád sokrétű technikai segítségéért.

Köszönöm a labor és a tanszék minden munkatársának segítségét és a jó hangulatot, ami még a hosszúra nyúlt kísérletek elvégzését is könnyebbé tette.

Végül, de nem utolsósorban hálásan köszönöm családom és barátaim türelmét, támogatását és bizalmát.

12 Saját közlemények jegyzéke

12.1 Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Bender, B., Bodrogi, L., Mayer, B., Schneider, Z., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Eggen, A., Kacs Kovics, I., Bosze, Z.: **Position independent and copy-number-related expression of the bovine neonatal Fc receptor alpha-chain in transgenic mice carrying a 102 kb BAC genomic fragment.** Transgenic Research 2007. 16, 613-627. (IF: 2,532)

Cervenak, J., Bender, B., Schneider, Z., Magna, M., Carstea, B.V., Liliom, K., Erdei, A., Bosze, Z., Kacs Kovics, I.: **Neonatal FcR overexpression boosts humoral immune response in transgenic mice.** Journal of Immunology 2011. 186(2), 959-968. (IF: 5,745)

Schneider, Z., Cervenak, J., Baranyi, M., Papp, K., Prechl, J., Laszlo, G., Erdei, A., Kacs Kovics, I.: **Transgenic expression of bovine neonatal Fc receptor in mice boosts immune response and improves hybridoma production efficiency without any sign of autoimmunity.** Immunology Letters 2011. 137(1-2), 62-69. (IF: 2,511)

Vegh A, Farkas A, Kovesdi D, Papp K, Cervenak J, Schneider Z., Bender B, Hiripi L, Laszlo G, Prechl J, Matko J, Kacs Kovics I (2012) **FcRn Overexpression in Transgenic Mice Results in Augmented APC Activity and Robust Immune Response with Increased Diversity of Induced Antibodies.** PLoS One 7 (4):e36286. doi:10.1371/journal.pone.0036286 (IF: 4,411)

12.2 Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Faigl, V., Keresztes, M., Marton, A., Schneider, Z., Korvin, L., Sandor, S., Novotnine, G.D., Arnyasi, M., Kulcsar, M., Javor, A., Cseh, S., Huszenicza, G.: **Melatonin-, ill. fénykiegészítés alapú ciklusindukciós technikák kiskérődzőkben. Élettani vonatkozások és gyakorlati alkalmazás. Irodalmi áttekintés.** Magyar Allatorvosok Lapja 2007. 129(4), 219-230. (IF: 0,104)

12.3 Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztraktok

Bender, B., Bodrogi, L., Mayer, B., Schneider, Z., Baranyi, M., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Bosze, Z., Kacskovics, I.: **BAC transgenic mouse model to analyze the role of the bovine FcRn in IgG and albumin metabolism.** In: 2nd European Workshop of Veterinary Immunology, Paris, France, 2006

Bender, B., Bodrogi, L., Cervenak, J., Schneider, Z., Mayer, B., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Eggen, A., Bosze, Z., Kacskovics, I.: **The role of the neonatal Fc receptor in IgG catabolism and homeostasis: IgG metabolism in bovine FcRn transgenic mice.** In: 8th International Veterinary Immunology Symposium, Ouro Preto, Brasil, 2007

Schneider, Z., Cervenak, J., Magna, M., Bender, B., Erdei, A., Bosze, Z., Kacskovics, I.: **FcRn overexpression boosts humoral immune response.** In: 2nd European Congress of Immunology, Berlin, Germany, 2009

Cervenak, J., Magna, M., Bender, B., Schneider, Z., Hiripi, L., Erdei, A., Bosze, Z., Kacskovics, I.: **Antibody production in FcRn transgenic animals.** In: 7th UC Davis Transgenic Animal Research Conference, Tahoe City, California, 2010

Schneider, Z., Cervenak, J., Baranyi, M., Papp, K., Prechl, J., Laszlo, G., Erdei, A., Kacskovics, I.: **Transgenic expression of bovine neonatal Fc receptor in mice boosts immune response and improves hybridoma production efficiency without any sign of autoimmunity.** In: Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies, Visegrad, Hungary, 2011

12.4 Hazai konferencia kiadványban megjelent absztraktok

Mayer, B., Bender, B., Schneider, Z., Bodrogi, L., Bosze, Z., Zhao, Y., Hammarstroem, L., Kacskovics, I.: **Humán IgG szérumbeli felezési idejének összehasonlítása vad típusú és a bovin neonatális Fc receptor (FcRn) α -láncát hordozó transzgenikus egerekben.** In: Magyar Immunológiai Társaság 35. Vándorgyűlése, Sopron, Hungary, 2005

Mayer, B., Bender, B., Schneider, Z., Bodrogi, L., Bosze, Z., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Kacs Kovics, I.: **A kapillaris endothel sejtkben expresszálódo FcRn szerepe az IgG és az albumin homeosztázisában.** In: 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Hungary, 2006

Mayer, B., Bender, B., Schneider, Z., Bodrogi, L., Bosze, Z., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Kacs Kovics, I.: **Szarvasmarha neonatalis Fc receptor (FcRn) transzgenikus eger modell előállítása a receptor expressziójának és funkciójának tanulmányozására.** In: Állatbiotechnológiai kutatások Magyarországon, MTA Székház, Budapest, Hungary, 2006

Cervenak, J., Bender, B., Magna, M., Schneider, Z., Erdei, A., Bosze, Z., Kacs Kovics, I.: **Az IgG kötő FcRn fokozott expressziója jelentősen növeli az immunizálás hatékonyságát.** In: Magyar Immunológiai Társaság 36. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, Hungary, 2007

Schneider, Z., Cervenak, J., Laszlo, G., Erdei, A., Kacs Kovics, I.: **A bovin FcRn overexpresszió növeli az antigénspecifikus hibridómák számát.** In: Magyar Immunológiai Társaság 39. Vándorgyűlése, Szeged, Hungary, 2010

Schneider, Z., Cervenak, J., Baranyi, M., Papp, K., Prechl, J., Laszlo, G., Erdei, A., Kacs Kovics, I.: **A bFcRn overexpresszió autoimmunitásra utaló jelek nélkül növeli az antigénspecifikus hibridómák számát.** In: Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Kecskemét, Hungary, 2011.

13 Irodalom

- Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R.A., Kaufmann, S.H.E., Seiler, P., 2003, Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J. Immunol.* 171, 1148-1155.
- Akilesh, S., Christianson, G.J., Roopenian, D.C., Shaw, A.S., 2007, Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J. Immunol.* 179, 4580-4588.
- Allen, C.D., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fuji, N., Cyster, J.G., 2004, Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology* 5, 943-952.
- Allen, C.D., Okada, T., Cyster, J.G., 2007, Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190-202.
- Andersen, J.T., Daba, M.B., Berntzen, G., Michaelsen, T.E., Sandlie, I., 2010, Cross-species Binding Analyses of Mouse and Human Neonatal Fc Receptor Show Dramatic Differences in Immunoglobulin G and Albumin Binding. *J. Biol. Chem.* 285, 4826-4836.
- Andersen, J.T., Dalhus, B., Cameron, J., Daba, M.B., Plumridge, A., Evans, L., Brennan, S.O., Gunnarsen, K.S., Bjoras, M., Sleep, D., Sandlie, I., 2012, Structure-based mutagenesis reveals the albumin-binding site of the neonatal Fc receptor. *Nature Communications* doi: 10.1038/ncomms1607.
- Andersen, J.T., Qian, J.D., Sandlie, I., 2006, The conserved histidine 166 residue of the human neonatal Fc receptor heavy chain is critical for the pH-dependent binding to albumin. *Eur. J. Immunol.* 36, 3044-3051.
- Andersen, S.B., Bjerneboe, 1964, Gamma globulin turnover in rabbits before and during hyperimmunization. *J. Exp. Med.* 119, 537-546.
- Anderson, A.O., Anderson, N.D., 1975, Studies on the structure and permeability of the microvasculature in normal rat lymph nodes. *American Journal of Pathology* 80, 387-418.
- Anderson, C.L., Chaudhury, C., Kim, J., Bronson, C.L., Wani, M.A., Mohanty, S., 2006, Perspective - FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends in Immunology* 27, 343-348.
- Angyal, A., Szekeres, Z., Balogh, P., Neer, Z., Szarka, E., Virag, V., Medgyesi, D., Prechl, J., Sarmay, G., 2009, CD16/32-specific biotinylated 2.4G2 single-chain Fv complexed with avidin-FITC enhances FITC-specific humoral immune response *in vivo* in a CD16-dependent manner. *Int. Immunol.* 22, 71-80.
- Avrameas, S., 1991, Natural antibodies: from "horro autotoxicus" to "gnothi seauton". *Immunology Today* 12, 154-159.
- Baker, K., Qiao, S.W., Kuo, T.T., Aveson, V.G., Platzer, B., Andersen, J.T., Sandlie, I., Chen, Z., de Haar, C., Lencer, W.I., Fiebiger, W.I., Blumberg, R.S., 2011, Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates cross-presentation of IgG immune complexes by CD8-CD11b+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9927-9932.
- Balogh, P., Szekeres, G., Nemeth, P., 1994, Hapten-mediated identification of cell-membrane antigens using az anti-FITC monoclonal antibody. *J. Immunol. Methods* 169, 35-40.
- Beltman, J.B., Allen, C.D., Cyster, J.G., J., d.B.R., 2011, B cells within germinal centers migrate preferentially from dark to light zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8755-8760.

- Bender, B., Bodrogi, L., Mayer, B., Schneider, Z., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Eggen, A., Kacs Kovics, I., Bosze, Z., 2007, Position independent and copy-number-related expression of the bovine neonatal Fc receptor alpha-chain in transgenic mice carrying a 102 kb BAC genomic fragment. *Transgenic Res.* 16, 613-627.
- Bergtold, A., Desai, D.D., Gavhane, A., Clynes, R., 2005, Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23, 503-514.
- Bleeker, W.K., Teeling, J.L., Hack, C.E., 2001, Accelerated autoantibody clearance by intravenous immunoglobulin therapy: studies in experimental models to determine the magnitude and time course of the effect. *Blood* 98, 3136-3142.
- Bolland, S., Yim, Y.S., Tus, K., Wakeland, E.K., Ravetch, J.V., 2002, Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in Fc gamma RIIB^{-/-} mice. *J. Exp. Med.* 195, 1167-1174.
- Borvak, J., Richardson, J., Medesan, C., Antohe, F., Radu, C., Simionescu, M., Ghetie, V., Ward, E.S., 1998, Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int. Immunol.* 10, 1289-1298.
- Brambell, F.W.R., 1970, The transmission of passive immunity from mother to young. Vol 18. North-Holland Pub. Co.
- Brambell, F.W.R., Halliday, R., Morris, I.G., 1958, Interference by human and bovine serum and serum protein fractions with the absorption of antibodies by suckling rats and mice. *Proceedings of the Royal Society, Series B* 149.
- Brambell, F.W.R., Hemmings, W.A., Morris, I.G., 1964, A theoretical model of gammaglobulin catabolism. *Nature* 203, 1352-1355.
- Buiting, A.M.J., DeRover, Z., Kraal, G., VanRooijen, N., 1996, Humoral immune responses against particulate bacterial antigens are dependent on marginal metallophilic macrophages in the spleen. *Scandinavian Journal of Immunology* 43, 398-405.
- Burmeister, W.P., Gastinel, L.N., Simister, N.E., Blum, M.L., Bjorkman, P.J., 1994, Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 372, 336-343.
- Butler, J.E., 1983, Bovine immunoglobulins - an augmented review. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 4, 43-152.
- Carrasco, Y., Batista, F., 2007, B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 160-171.
- Carter, P.J., 2006, Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology* 6, 343-357.
- Cervenak, J., Bender, B., Doleschall, Z., Mayer, B., Doleschall, M., Bosze, Z., Kacs Kovics, I., 2008, Szarvasmarha neonatális Fc receptor (bFcRn) génjének expressziós elemzése *in vitro* és *in vivo*. In Magyar Immunológiai Társaság XXXVII Vándorgyűlése, Falus, A., ed. (Budapest).
- Cervenak, J., Bender, B., Schneider, Z., Magna, M., Carstea, B.V., Liliom, K., Erdei, A., Bosze, Z., Kacs Kovics, I., 2011, Neonatal FcR overexpression boosts humoral immune response in transgenic mice. *J. Immunol.* 186, 959-968.
- Chaudhury, C., Brooks, C.L., Carter, D.C., Robinson, J.M., Anderson, C.L., 2006, Albumin binding to FcRn: Distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry* 45, 4983-4990.
- Chaudhury, C., Mehnaz, S., Robinson, J.M., Hayton, W.L., Pearl, D.K., Roopenian, D.C., Anderson, C.L., 2003, The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J. Exp. Med.* 197, 315-322.

- Chen, L., Frank, A., Adams, J.M., Steinman, R.M., 1978, Distribution of horseradish peroxidase (HRP)-anti-HRP immune complexes in mouse spleen with special reference to follicular dendritic cells. *J. Cell Biol.* 79, 184-199.
- Chen, Y.Y., Pikkarainen, T., Elomaa, O., Soininen, R., Kodama, T., Kraal, G., Tryggvason, K., 2005, Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. *J. Immunol.* 175, 8173-8180.
- Chen, Y.Y., Wermeling, F., Sundqvist, J., Jonsson, A.B., Tryggvason, K., Pikkarainen, T., Karlsson, M.C.I., 2010, A regulatory role for macrophage class A scavenger receptors in TLR4-mediated LPS responses. *Eur. J. Immunol.* 40, 1451-1460.
- Cianga, P., Cianga, C., Cozma, L., Ward, E.S., Carasevici, E., 2003, The MHC class I related Fc receptor, FcRn, is expressed in the epithelial cells of the human mammary gland. *Hum. Immunol.* 64, 1152-1159.
- Cianga, P., Medesan, C., Richardson, J.A., Ghetie, V., Ward, E.S., 1999, Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. *Eur. J. Immunol.* 29, 2515-2523.
- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., Cyster, J.G., 2008, Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature Immunology* 9, 54-62.
- Clark, S., 1962, The reticulum of lymph nodes in mice studied with the electron microscope. *American Journal of Anatomy* 110, 217-257.
- Claypool, S.M., Dickinson, B.L., Yoshida, M., Lencer, W.I., Blumberg, R.S., 2002, Functional reconstitution of human FcRn in Madin-Darby canine kidney cells requires co-expressed human beta(2)-microglobulin. *J. Biol. Chem.* 277, 28038-28050.
- Colino, J., Shen, Y., Snapper, C., 2002, Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses *in vivo* through distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* 195, 1-13.
- Coulie, P.G., Vansnick, J., 1985, Enhancement of IgG anti-carrier responses by IgG2 anti-hapten antibodies in mice. *Eur. J. Immunol.* 15, 793-798.
- Datta-Mannan, A., Witcher, D.R., Tang, Y., Watkins, J., Wroblewski, V.J., 2007, Monoclonal antibody clearance - Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 1709-1717.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., Trombetta, E., 2005, Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630-1634.
- Dempsey, P., Allison, M., Akkaraju, S., Goodnow, C., Fearon, D., 1996, C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271, 348-350.
- Drinker, C.K., Field, M.E., Ward, H.K., 1934, The filtering capacity of lymph nodes. *J. Exp. Med.* 59, 393-405.
- Dudzziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C., 2007, Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. *Science* 315, 107-111.
- Ehrlich, P., 1982, Ueber Immunität durch Vererbung und Säugung. *Zeitschrift fuer Hygiene und Infektionskrankheiten* 12, 183-203.
- Elgueta, R., de Vries, V.C., Noelle, R.J., 2010, The immortality of humoral immunity. *Immunol. Rev.* 236, 139-150.
- Fahey, J.L., Robinson, A.G., 1963, Factors controlling serum gamma-globulin concentration. *J. Exp. Med.* 118.

- Farr, A., Cho, Y., De Bruyn, P., 1980, The structure of the sinus wall of the lymph node relative to its endocytic properties and transmural cell passage. *American Journal of Anatomy* 157, 265-284.
- Flaherty, L., 1981, Congenic strains. In: Foster, H.L., Small, J.D., Fox, J.G. (Eds.) *The mouse in biomedical research*. Academic Press, New York, pp. 215-225.
- Fossum, S., 1980, The architecture of rat lymph nodes. IV. Distribution of ferritin and colloidal carbon in the draining lymph nodes after foot-pad injection. *Scandinavian Journal of Immunology* 12, 433-441.
- Garg, A., Balthasar, J.P., 2007, Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model to predict IgG tissue kinetics in wild-type and FcRn-knockout mice. *Journal of Pharmacokinetics and pharmacodynamics* 34, 687-709.
- Garg, A., Balthasar, J.P., 2009, Investigation of the influence of FcRn on the distribution of IgG to the brain. *AAPS Journal* 11, 553-557.
- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J., Jenkins, M.K., 1998, Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 281, 96-99.
- Gatto, D., Paus, D., Basten, A., Mackay, C.R., Brink, R., 2009, Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses. *Immunity* 31, 259-269.
- Geijtenbeek, T.B.H., Groot, P.C., Nolte, M.A., van Vliet, S.J., Gangaram-Panday, S.T., van Duijnhoven, G.C.F., Kraal, G., van Oosterhout, A.J.M., van Kooyk, Y., 2002, Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* 100, 2908-2916.
- Ghetie, V., Hubbard, J.G., Kim, J.K., Tsen, M.F., Lee, Y.F., Ward, E.S., 1996, Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 26, 690-696.
- Ghetie, V., Popov, S., Borvak, J., Radu, C., Matesoi, D., Medesan, C., Ober, R.J., Ward, E.S., 1997, Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* 15, 637-640.
- Ghetie, V., Ward, E.S., 2002, Transcytosis and catabolism of antibody. *Immunol. Res.* 25, 97-113.
- Goins, C.L., Chappell, C.P., Shashidharamurthy, R., Selvaraj, P., Jacob, J., 2010, Immune complex-mediated enhancement of secondary immune responses. *J. Immunol.* 184, 6293-6298.
- Hauser, A.E., Shlomchik, M.J., Haberman, A.M., 2007, *In vivo* imaging studies shed light on germinal-centre development. *Nature Reviews Immunology* 7, 499-504.
- Herzenberg, L.A., Kantor, A.B., 1993, B-cell lineages exist in the mouse. *Immunology Today* 14, 79-83.
- Heyman, B., 2000, Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 709-737.
- Hickman, H.D., Takeda, K., Skon, C.N., Murray, F.R., Hensley, S.E., Loomis, J., Barber, G.N., Bunnick, J.R., Yewdell, J.W., 2008, Direct priming of antiviral CD8(+) T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nature Immunology* 9, 155-165.
- Huang, N., Han, S.H., Hwang, I., Kehrl, J., 2005, B cells productively engage soluble antigen-pulsed dendritic cells: visualization of live-cell dynamics of B cell-dendritic cell interactions. *J. Immunol.* 175, 7125-7134.
- Humphrey, J.H., Fahey, J.L., 1961, The metabolism of normal proteins and gamma-myeloma protein in mice bearing plasma-cell tumors. *Journal of Clinical Investigation* 40, 1696-1705.

- Igawa, T., Tsunoda, H., Tachibana, T., Maeda, A., Mimoto, F., Moriyama, C., Nanami, M., Sekimori, Y., Nabuchi, Y., Aso, Y., Hattori, K., 2010, Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Engineering, design & selection* 23, 385-392.
- Israel, E.J., Patel, V.K., Taylor, S.F., Marshakrothstein, A., Simister, N., 1995, Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice. *J. Immunol.* 154, 6246-6251.
- Israel, E.J., Wilsker, D.F., Hayes, K.C., Schoenfeld, D., Simister, N.E., 1996, Increased clearance of IgG in mice that lack beta(2)-microglobulin: Possible protective role of FcRn. *Immunology* 89, 573-578.
- Itano, A.A., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Ehst, B.D., Ingulli, E., Rudensky, A.Y., Jenkins, M.K., 2003, Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19, 47-57.
- Jones, E.A., Waldmann, T.A., 1972, The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *Journal of Clinical Investigation* 51, 2916-2927.
- Junghans, R.P., 1997, Finally! The Brambell receptor (FcRB) - Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. *Immunol. Res.* 16, 29-57.
- Junghans, R.P., Anderson, C.L., 1996, The protection receptor for IgG catabolism is the beta(2)-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5512-5516.
- Junt, T., Mosseman, E.A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., van Rooijen, N., Mempel, T.R., Whelan, S.P., von Andrian, U.H., 2007, Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450, 110-114.
- Junt, T., Scandella, E., Ludewig, B., 2008, Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nature Reviews Immunology* 8, 764-775.
- Kacs Kovics, I., 2003, A tehéntej immunglobulinja - a jövő precíziós fegyvere a bélfertőzések ellen. *Magyar Tudomány* 4, 461-469.
- Kacs Kovics, I., Kis, Z., Mayer, B., West, A.P., Tiangco, N.E., Tilahun, M., Cervenak, L., Bjorkman, P.J., Goldsby, R.A., Szenci, O., Hammarstrom, L., 2006a, FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. *Int. Immunol.* 18, 525-536.
- Kacs Kovics, I., Mayer, B., Kis, Z., Frenyo, L.V., Zhao, Y., Muyldermans, S., Hammarstrom, L., 2006b, Cloning and characterization of the dromedary (*Camelus dromedarius*) neonatal Fc receptor (drFcRn). *Developmental and Comparative Immunology* 30, 1203-1215.
- Kacs Kovics, I., Wu, Z., Simister, N., Frenyo, L.V., Hammarstrom, L., 2000, Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc receptor. *J. Immunol.* 164, 1889-1897.
- Kang, Y.S., Kim, J.Y., Bruening, S.A., Pack, M., Charalambous, A., Pritsker, A., Moran, T.M., Loeffler, J.M., Steinman, R.M., Park, C.G., 2004, The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 215-220.
- Katakai, T., Hara, T., Lee, J.H., Gonda, H., Sugai, M., Shimizu, A., 2004, A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int. Immunol.* 16, 1133-1142.
- Katakai, T., Suto, H., Sugai, M., Gonda, H., Togawa, A., Suematsu, S., Ebisuno, Y., Katagiri, K., Jinashi, T., Shimizu, A., 2008, Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* 181, 6189-6200.

- Keler, T., Guyre, P.M., Vitale, L.A., Sundarapandiyam, K., van de Winkel, J.G.J., Deo, Y.M., Graziano, R.F., 2000, Targeting weak antigens to CD64 elicits potent humoral responses in human CD64 transgenic mice. *J. Immunol.* 165, 6738-6742.
- Keler, T., He, L.Z., Graziano, R.F., 2005, Development of antibody-targeted vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7, 157-163.
- Kim, J.K., Tsen, M.F., Ghetie, V., Ward, E.S., 1994, Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor. *Eur. J. Immunol.* 24, 2429-2434.
- Klaus, G.G.B., Humphrey, J.H., 1977, The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of B memory cells. *Immunology* 33, 31-40.
- Knott, C.L., Reed, J.C., Bodrug, S., Saedi, M.S., Kumar, A., KuusReichel, K., 1996, Evaluation of Bcl-2/B cell transgenic mice (B6) for hybridoma production. *Hybridoma* 15, 365-371.
- Koller, B.H., Marrack, P., Kappler, J.W., Smithies, O., 1990, Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* 248, 1227-1230.
- Kosco-Vilbois, M.H., Scheidegger, D., 1995, Follicular dendritic cells: antigen retention, B cell activation, and cytokine production. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 201, 69-82.
- Krimpenfort, P., Rudenko, G., Hochstenbach, F., Guessow, D., Berns, A., Ploegh, H., 1987, Crosses of two independently derived transgenic mice demonstrate functional complementation of the genes encoding heavy (HLA-B27) and light (beta 2-microglobulin) chains of HLA class I antigens. *Embo Journal* 6, 1673-1676.
- Kunkel, E.J., Butcher, E.C., 2003, Plasma-cell homing. *Nature Reviews Immunology* 3, 822-829.
- Kunkl, A., Klaus, G.G.B., 1981, The generation of memory cell. 4. immunization with antigen-antibody complexes accelerates the development of B-memory cells, the formation of germinal centres and the maturation of antibody affinity in the secondary response. *Immunology* 43, 371-378.
- Kvell, K., Czompoly, T., Pikkarainen, T., Balogh, M., 2006, Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 1193-1202.
- Laissue, J., Cottier, H., Hess, M.W., Stoner, R.D., 1971, Early and enhanced germinal center formation and antibody responses in mice after primary stimulation with antigen-antibody complexes as compared with antigen alone. *J. Immunol.* 107, 822-831.
- Lehmann-Grube, F., Lohler, J., Utermohlen, O., Gegin, C., 1993, Antiviral immune responses of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice lacking CD8⁺ T lymphocytes because of disruption of the beta2-microglobulin gene. *J. Virol.* 67, 332-339.
- Lemos, A.P.C., Cervenak, J., Bender, B., Hoffmann, O.I., Baranyi, M., Kerekes, A., Farkas, A., Bosze, Z., Hiripi, L., Kacs Kovics, I., 2012, Characterization of the rabbit neonatal Fc receptor (FcRn) and analyzing the immunophenotype of the transgenic rabbits that overexpress FcRn. *Plos One* 7, e28869.
- Liu, X., Lu, L., Yang, Z., Palaniyandi, S., Zeng, R., Gao, L.Y., Mosser, D.M., Roopenian, D.C., Zhu, X., 2011, The neonatal FcR-mediated presentation of immune-complexed antigen is associated with endosomal and phagosomal pH and antigen stability in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 186, 4674-4686.
- Liu, X.D., Ye, L.L., Christianson, G.J., Yang, J.Q., Roopenian, D.C., Zhu, X.P., 2007, NF-kappa 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.

- Lobo, E.D., Hansen, R.J., Balthasar, J.P., 2004, Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* 93, 2645-2668.
- Lu, W., Zhao, Z., Zhao, Y., Yu, S., Fan, B., Kacs Kovics, I., Hammarstroem, L., 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, 401-408.
- Lutz, H.U., Bussolino, F., Flepp, R., Fasler, S., Stammler, P., Kazatchkine, M.D., Arese, P., 1987, Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7368-7372.
- Maletto, B.A., Ropolo, A.s., Alignani, D.O., Liscovsky, M.V., Ranocchia, R.P., Moron, V.G., Pistoresi-Palencia, M.C., 2006, Presence of neutrophil-nearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* 108, 3094-3102.
- Mandel, T., Phipps, R., Abbot, A., Tew, J., 1980, The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol. Rev.* 53, 29-59.
- Manuelidis, L., Zaitsev, I., Koni, P., Lu, Z.Y., Flavell, R.A., Fritch, W., 2000, Follicular dendritic cells and dissemination of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* 74, 8614-8622.
- Martin, F., Oliver, A.M., Kearney, J.F., 2001, Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617-629.
- Martinez-Pomares, L., Gordon, S., 2012, CD169(+) macrophages at the crossroads of antigen presentation. *Trends in Immunology* 33, 66-70.
- Martinez-Pomares, L., Kosco-Vilbois, M., Darley, E., Tree, P., Herren, S., Bonnefoy, J.Y., Gordon, S., 1996, Fc chimeric protein containing the cysteine-rich domain of the murine mannose receptor binds to macrophages from splenic marginal zone and lymph node subcapsular sinus and to germinal centers. *J. Exp. Med.* 184, 1927-1937.
- Mayer, B., Doleschall, M., Bender, B., Bartyik, J., Bosze, Z., Frenyo, L.V., Kacs Kovics, I., 2005, Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Research* 72, 107-112.
- Mayer, B., Kis, Z., Kajan, G., Frenyo, L.V., Hammarstrom, L., Kacs Kovics, I., 2004, The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 98, 85-89.
- Mayer, B., Zolnai, A., Frenyo, L.V., Jancsik, V., Szentirmay, Z., Hammarstrom, L., 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, 288-296.
- Mebius, R.E., Kraal, G., 2005, Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology* 5, 606-616.
- Medesan, C., Mateosi, D., Radu, C., Ghetie, V., Ward, E.S., 1997, Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1. *J. Immunol.* 158, 2211-2217.
- Mi, W.T., Wanjie, S., Lo, S.T., Gan, Z., Pick-Herk, B., Ober, R.J., Ward, E.S., 2008, Targeting the neonatal Fc receptor for antigen delivery using engineered Fc fragments. *J. Immunol.* 181, 7550-7561.
- Montoyo, H.P., Vaccaro, C., Hafner, M., Ober, R.J., Mueller, W., Ward, E.S., 2009, Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2788-2793.
- Mueller, S.N., Germain, R.N., 2009, Stromal cell contribution to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 9, 618-629.

- Nielsen, K., Sheppard, J., Holmes, W., Tizard, I., 1978, Experimental bovine trypanosomiasis. Changes in the catabolism of serum immunoglobulins and complement components in infected cattle. *Immunology* 35, 811-816.
- Noble, A., Zhao, Z.S., Cantor, H., 1998, Suppression of immune responses by CD8 cells. II. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses. *J. Immunol.* 160, 566-571.
- Nossal, G., Abbot, A., Mitchell, J., Lummus, Z., 1968, Antigens in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. *J. Exp. Med.* 127, 277-290.
- Nossal, G., Ada, G., Austin, C., Pye, J., 1965, Antigens in immunity. 8. Localization of 125-I-labelled antigens in the secondary response. *Immunology* 9, 349-357.
- Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1999, Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286, 2156-2159.
- Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M., 2000, Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunology Today* 21, 624-630.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., Cyster, J., 2005, Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *Plos Biology* 3, e150.
- Onisk, D., Brown, M., Keter, D., Chambers, R.S., Moriango, J., Kacsokovics, I., Lindpaintner, K., 2012, Efficient production of CXCR4 specific monoclonal antibodies using transgenic mice that overexpress the bovine neonatal Fc receptor (bFcRn). mAbs pending.
- Papamichail, M., Gutierrez, C., Embling, P., Johnson, P., Holborow, E.J., Pepys, M.B., 1975, Complement dependence of localisation of aggregated IgG in germinal centres. *Scandinavian Journal of Immunology* 4, 343-347.
- Pape, K., Catron, D., Itano, A., Jenkins, M.K., 2007, The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26, 491-502.
- Papp, K., Szekeres, Z., Terenyi, N., Isaak, A., Erdei, A., Prechl, J., 2007, On-chip complement activation adds an extra dimension to antigen microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 133-140.
- Pereira, J.P., Kelly, L.M., Xu, Y., Cyster, J.G., 2009, EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* 460, 1122-1126.
- Petkova, S.B., Akilesh, S., Sproule, T.J., Christianson, G.J., Al Khabbaz, H., Brown, A.C., Presta, L.G., Meng, Y.G., Roopenian, D.C., 2006, Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int. Immunol.* 18, 1759-1769.
- Phan, T.G., Green, J.A., Gray, E.E., Xu, Y., Cyster, J.G., 2009, Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nature Immunology* 10, 786-U153.
- Phan, T.G., Grigorova, I., Okada, T., Cyster, J.G., 2007, Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nature Immunology* 8, 992-1000.
- Praetor, A., Hunziker, W., 2002, Beta(2)-microglobulin is important for cell surface expression and pH-dependent IgG binding of human FcRn. *Journal of Cell Science* 115, 2389-2397.
- Qi, H., Egen, J.G., Huang, A.Y., Germain, R.N., 2006, Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312, 1672-1676.

- Qiao, S.W., Kobayashi, K., Johansen, F.E., Sollid, L.M., Andersen, J.T., Milford, E., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., Blumberg, R.S., 2008, Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9337-9342.
- Qin, D., Wu, J.S., Vora, K.A., Ravetch, J.V., Szakal, A.K., Manser, T., Tew, J.G., 2000, Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *J. Immunol.* 164, 6268-6275.
- Rajewsky, K., 1996, Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Rittenberg, M.B., Amkraut, A.A., 1966, Immunogenicity of trinitrophenyl-hemocyanin: production of primary and secondary anti-hapten precipitins. *J. Immunol.* 97, 421-430.
- Roberts, D.M., Guenther, M., Rodewald, R., 1990, Isolation and characterization of the Fc receptor from the fetal yolk sac of the rat. *J. Cell Biol.* 111, 1867-1876.
- Rodewald, R., Kraehenbuhl, J.P., 1984, Receptor-mediated transport of IgG. *J. Cell Biol.* 99, S159-S164.
- Roopenian, D.C., Akilesh, S., 2007, FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology* 7, 715-725.
- Roopenian, D.C., Christianson, G.J., Sproule, T.J., 2010, Human FcRn transgenic mice for pharmacokinetic evaluation of therapeutic antibodies. *Methods in Molecular Biology* 602, 93-104.
- Roopenian, D.C., Christianson, G.J., Sproule, T.J., Brown, A.C., Akilesh, S., Jung, N., Petkova, S., Avanesian, L., Choi, E.Y., Shaffer, D.J., Eden, P.A., Anderson, C.L., 2003, The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J. Immunol.* 170, 3528-3533.
- Schultze, H.E., Heremans, J.F., 1966, Nature and Metabolism of Extracellular Proteins. In: *Molecular Biology of Human Proteins: with Special Reference to Plasma Proteins.* Elsevier.
- Sell, S., Fahey, J.L., 1964, Relationship between gamma-globulin metabolism and low serum gamma-globulin in germ-free mice. *J. Immunol.* 93, 81-87.
- Silver, L.M., 1995, *Mouse genetics: concepts and applications.* Oxford University Press, Oxford.
- Simister, N.E., Mostov, K.E., 1989, An Fc receptor structurally related to MHC class-I antigens. *Nature* 337, 184-187.
- Smith, E.L., 1946, The immune proteins of bovine colostrum and plasma. *J. Biol. Chem.* 164, 345-358.
- Soehnlein, O., 2009, An elegant defense: how neutrophils shape the immune response. *Trends in Immunology* 30, 511-512.
- Spriggs, M.K., Koller, B.H., Sato, T., Morrissey, P.J., Fanslow, W.C., Smithies, O., Voice, R.F., Widmer, M.B., Maliszewski, C.R., 1992, Beta 2-microglobulin-, CD8+ T-cell-deficient mice survive inoculation with high doses of vaccinia virus and exhibit altered IgG responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6070-6074.
- Staudt, L.M., Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., 1999, Regulation of lymphocyte cell fate decisions and lymphomagenesis by BCL-6. *International Reviews of Immunology* 18, 381-403.
- Stein, C., Kling, L., Proetzel, G., Roopenian, D.C., de Angelis, M.H., Wolf, E., Rathkolb, B., 2012, Clinical chemistry of human FcRn transgenic mice. *Mammalian Genome* 23, 259-269.
- Steiniger, B., Barth, P., Hellinger, A., 2001, The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *American Journal of Pathology* 159, 501-512.

- Strasser, A., Harris, A.W., Vaux, D.L., Webb, E., Bath, M.L., Adams, J.M., Cory, S., 1990, Abnormalities of the immune system induced by dysregulated Bcl-2 expression in transgenic mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 166, 175-181.
- Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D.L., Bath, M.L., Adams, J.M., Cory, S., Harris, A.W., 1991, Enforced Bcl-2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8661-8665.
- Szakai, A., Homes, K., Tew, J., 1983, Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. *J. Immunol.* 131, 1714-1727.
- Szarka, E., Neer, Z., Balogh, P., Adori, M., Angyal, A., Prechl, J., Kiss, E., Kövesdi, D., Sarmay, G., 2012, Exacerbation of collagen induced arthritis by Fc γ receptor targeted collagen peptide due to enhanced inflammatory chemokine and cytokine production. *Biologics: targets and therapy* 6, 101-115.
- Takahashi, N., Kakinuma, H., Hamada, K., Shimazaki, K., Yamasaki, Y., Matsushita, H., Nishi, Y., 2000, Improved generation of catalytic antibodies by MRL/MPJ-lpr/lpr autoimmune mice. *J. Immunol. Methods* 235, 113-120.
- Takai, T., Ono, M., Hikida, M., Ohmori, H., Ravetch, J.V., 1996, Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379, 346-349.
- Takimori, S., Shimaoka, H., Furukawa, J.I., Yamashita, T., Amano, M., Fujitani, N., Takegawa, Y., Hammarstrom, L., Kacs Kovics, I., Shinohara, Y., Nishimura, S.I., 2011, Alteration of the N-glycome of bovine milk glycoproteins during early lactation. *Febs J.* 278, 3769-3781.
- Tange, S.G., Tarlinton, D.M., 2009, Memory B cells: effectors of long-lived immune response. *Eur. J. Immunol.* 39, 2065-2075.
- Tarlinton, D., Radbruch, A., Hiepe, F., Dorner, T., 2008, Plasma cell differentiation and survival. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 162-169.
- Tew, J., Phipps, R., Mandel, T., 1980, The maintenance and regulation of the humoral immune response: persisting antigen and the role of follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 53, 175-201.
- Tiller, T., Kofer, J., Kreschel, C., Busse, C.E., Riebel, S., Wickert, S., Oden, F., Mertes, M.M.M., Ehlers, M., Wardemann, H., 2010, Development of self-reactive germinal center B cells and plasma cells in autoimmune Fc gamma RIIB-deficient mice. *J. Exp. Med.* 207, 2767-2778.
- Tysoe-Calnon, V.A., Grundy, J.E., Perkins, S.J., 1991, Molecular comparisons of the beta 2-microglobulin-binding site in class I major-histocompatibility-complex alpha-chains and proteins of related sequences. *Biochemical Journal* 277, 359-369.
- van Ewijk, W., Brekelmans, P., Jacobs, R., Wisse, E., 1988, Lymphoid microenvironments in the thymus and lymph node. *Scanning Microscopy* 2.
- Vegh, A., Cervenak, J., Jankovics, I., Kacs Kovics, I., 2011, FcRn overexpression in mice results in potent humoral response against weakly immunogenic antigen. *MAbs* 3, 173-180.
- Vegh, A., Farkas, A., Kovesdi, D., Papp, K., Cervenak, J., Schneider, Z., Bender, B., Hiripi, L., Laszlo, G., Prechl, J., Matko, J., Kacs Kovics, I., 2012, FcRn overexpression in transgenic mice results in augmented APC activity and robust immune response with increased diversity of induced antibodies. *Plos One* 7, e36286. doi:36210.31371/journal.pone.0036286.
- Vidarsson, G., Stemerding, A.M., Stapleton, N.M., Spliethoff, S.E., Janssen, H., Rebers, F.E., de Haas, M., van de Winkel, J.G., 2006, FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* 108, 3573-3579.

- Vinuesa, C.G., Sanz, I., Cook, M.C., 2009, Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 845-857.
- Voynova, E.N., Tchorbantov, A.I., Todorov, T.A., Vassilev, T.L., 2005, Breaking of tolerance to native DNA in nonautoimmune mice by immunization with natural protein/DNA complexes. *Lupus* 14, 543-550.
- Waldmann, T.A., Strober, W., 1969, Metabolism of immunoglobulins. *Progress in Allergy*, 1-110.
- Ward, E.S., Ober, R.J., 2009, Multitasking by Exploitation of Intracellular Transport Functions: The Many Faces of FcRn, In: *Advances in Immunology*, Vol 103. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp. 77-115.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Nagata, S., 1992, Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- William, J., Euler, C., Christensen, S., Shlomchik, M.J., 2002, Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297, 2066-2070.
- Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C., MacPherson, G., 1998, Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J. Immunol.* 161, 1313-1319.
- Ye, L.L., Liu, X.D., Rout, S.N., Li, Z.L., Yan, Y.Q., Lu, L., Kamala, T., Nanda, N.K., Song, W.X., Samal, S.K., Zhu, X.P., 2008, The MHC class II-associated invariant chain interacts with the neonatal Fc gamma receptor and modulates its trafficking to endosomal/lysosomal compartments. *J. Immunol.* 181, 2572-2585.
- Yoshida, K., van den Berg, T., Dijkstra, C., 1993, Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcγRII-mediated immune-complex trapping. *Immunology* 80, 34-39.
- Yoshida, M., Claypool, S.M., Wagner, J.S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., Blumberg, R.S., 2004, Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 20, 769-783.
- You, Y., Myers, R.C., Freeberg, L., Foote, J., Kearney, J.F., Justement, L.B., Carter, R.H., 2011, Marginal Zone B Cells Regulate Antigen Capture by Marginal Zone Macrophages. *J. Immunol.* 186, 2172-2181.
- Zalevsky, J., Chamberlain, A.K., Horton, H.M., Karki, S., Leung, I.W.L., Sproule, T.J., Lazar, G.A., Roopenian, D.C., Desjarlais, J.R., 2010, Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat. Biotechnol.* 28, 157-159.
- Zhao, Y., Kaeskovics, I., Zhao, Z., Hammarstrom, L., 2003, Presence of di-leucine motif in the cytoplasmic tail of the pig FcRn alpha chain. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96, 229-233.
- Zhu, X.P., Meng, G., Dickinson, B.L., Li, X.T., Mizoguchi, E., Miao, L.L., Wang, Y.S., Robert, C., Wu, B.Y., Smith, P.D., Lencer, W.I., Blumberg, R.S., 2001, MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 3266-3276.
- Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N.E., Loring, J.M., Raulet, D.H., Jaenisch, R., 1990, Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 344, 742-746.