Az FcRn transzgén állatok humorális immunválaszát befolyásoló T sejtek és antigén bemutató sejtek funkcionális vizsgálata

doktori értekezés

Farkas Anita

Témavezető: Dr. Kacskovics Imre, egyetemi docens

Dr. Matkó János, egyetemi tanár

ELTE TTK Biológiai Doktori Iskola

Immunológiai Program

Programvezető: Dr. Erdei Anna, egyetemi tanár

2013.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4

1. BEVEZETÉS 6

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 7

2.1. Az adaptív immunválasz 7

2.1.1. A makrofágok és dendritikus sejtek, mint hivatásos antigén prezentáló sejtek 8

2.1.2. Az Fc receptorok és a kostimulátor molekulák szerepe az adaptív immunválaszban 10

2.1.3. Az exogén antigének fagocitózisa és MHC II komplexen történő bemutatásának folyamata 12

2.2.. A neonatalis Fc receptor általános jellemzése 14

2.2.1. Az FcRn rövid története 14

2.2.2. Az FcRn szerkezete 15

2.2.3. Az FcRn IgG-t és albumint védő mechanizmusa 16

2.2.4. A maternális immuntranszport 18

2.2.5. Az FcRn szerepe az IgG homeosztázisban 19

2.2.6. Az FcRn szerepe az adaptív immunválaszban 20

2.2.7. Az FcRn immunfunkciójának tanulmányozása FcRn KO egerekben. 23

2.2.8. A bFcRn-t overexpresszáló transzgén egér 23

3. CÉLKITŰZÉS 26

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 28

4.1. A nyúl FcRn α-lánc expresszió kimutatás peritoneális makrofágból és vérből izolált neutrofil granulocitából 28

4.1.1. Makrofág tisztaság ellenőrzése áramlási citofluorimetriával 28

4.1.2. A nyúl FcRn α-lánc kimutatása RT-PCR módszerrel 29

4.2. A bovin (b) FcRn expresszió kimutatás bFcRn transzgén egér immunsejtjeiben 29

4.2.1. Sejt szortírozás 29

4.2.2. A bFcRn detekció egér immunsejtekben RT-PCR módszerrel 30

4.3. A fagocitózis vizsgálathoz felhasznált anyagok és módszerek 31

4.3.1. Egér peritoneális makrofág izolálása 31

4.3.2. Egér csontvelői eredetű dendritikus sejtek differenciáltatása 31

4.3.3. Áramlási citofluorimetria és konfokális lézerpásztázó mikroszkóp technika 31

4.4. Fagocitózis vizsgálat 32

4.4.1. Az antigén-IgG immunkomplex létrehozása 33

4.4.2. A fagocitózishoz használt sejtek előkészítése 33

4.4.3. Fagocitózist teszt....34

4.5. T-sejt proliferációs teszt....34

4.5.1. A bFcRn tg peritoneális makrofágok és csontvelő eredetű dendritikus sejtek által aktivált T sejt proliferáció....35

4.5.2. A DO11.10 egérből származó T sejtek izolálása....35

4.6. Az Fcγ receptor, MHCII és a kostimulátor molekulák expressziójának összehasonlítása vt és bFcRn tg egerekben....36

4.7. Oldatok, sejttenyésztő médiumok....36

5. EREDMÉNYEK....38

5.1. A nyúl FcRn (rFcRn) α-lánc expressziója nyúl eredetű peritoneális makrofágokban és neutrofil granulocitákban....38

5.1.1. Nyúl peritoneális makrofág izolálása és tisztaságának ellenőrzése....38

5.1.2. A nyúl FcRn detektálása RT-PCR módszerrel....39

5.2. A bFcRn expresszió kimutatása egér immunsejtekben....40

5.2.1. Egér immunsejtek izolálása PCR analízis céljára....40

5.2.2. A bFcRn detektálása immunsejtekből RT-PCR-el....41

5.3. A bFcRn transzgén egerekből származó peritoneális makrofágok és csontvelői dendritikus sejtek fagocitózisa fokozott mértékű a kontroll egerekből származó sejtekhez viszonyítva....42

5.3.1. A peritoneális makrofágok ovalbumint és OVA-specifikus IgG-t tartalmazó immunkomplexek fagocitózisa....42

5.3.1.1. Fagocitózis teszt ovalbumint és OVA-specifikus IgG-t tartalmazó szérummal létrehozott immunkomplexszel....42

5.3.1.2. Fagocitózis teszt szérumból tisztított OVA-specifikus IgG-t tartalmazó immunkomplexszel....49

5.3.2. A dendritikus sejtek ovalbumint és OVA-specifikus IgG-t tartalmazó immunkomplexek fagocitózisa....51

5.4. A T-sejt proliferáció elemzése bFcRn transzgén egerekből származó professzionális antigén prezentáló sejtek hatására....55

5.4.1. A T-sejt proliferáció indukciója makrofággal....55

5.4.2. A T-sejt proliferáció indukciója dendritikus sejtekkel....57

5.5. A bFcRn tg dendritikus sejtek fokozott antigénprezentációja nem a megváltozott MHC-II, kostimulátor és FcγR expressziónak köszönhető....58

5.5.1. A kostimulátor molekulák és az MHC II expressziója....58

5.5.2. Az FcγR expressziós vizsgálatok....59

6. MEGBESZÉLÉS....61

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK....68

8. ÖSSZEFOGLALÁS....69

9. SUMMARY 71
10. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS 72
11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 73
12. IRODALOMJEGYZÉK 76

Rövidítések jegyzéke

A647	Alexa fluor 647
ADCC	sejtközvetítette citotoxikus reakció
APC	antigénprezentáló sejt (antigen presenting cell)
BAC	mesterséges bakteriális kromoszóma
bFcRn	szarvasmarha neonatalis Fc receptor
BM DC	csontvelői sejtből differenciáltatott dendritikus sejt
BSA	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
CD	cluster of differentiation
cDC	konvencionális DC
CLP	közös limfoid prekurzor (common lymphoid precursor)
CMP	közös mieloid prekurzor (common myeloid precursor)
ConA	Concanavalin A
DC	dendritikus sejt (dendritic cell)
dNTP	dezoxi nukleotid trifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FACS	áramlási citometria (fluorescence activated cell sorting)
FcRn	neonatális Fc receptor (neonatal Fc receptor)
FcRα	Fc receptor alfa
FcRγ	Fc receptor gamma
FcRε	Fc receptor epszilon
FCS	fetális borjúsavó (fetal calf serum)
FI	fluoreszcencia intenzitás
FITC-	fluoreszcein-5-izotiocianát
GKN	glükóz-kálium-nátrium puffer
hFcRn	emberi FcRn (human FcRn)
hIgG	emberi (humán) immunglobulin G
HSC	hemopoetikus őssejt (hemopotic stem cell)
IgA	immunglobulin A
IgE	immunglobulin E
IgG	immunglobulin G
IgM	immunglobulin M

ip	intraperitoneális
LPS	lipopoliszacharid
MΦ	makrofág
mAb	monoklonális ellenanyag (monoclonal antibody)
MeOH	2-merkaptoetanol
MEP	megakariocita-eritrocita prekurzor
mFcRn	egér FcRn (mouse FcRn)
MHC	fő hisztokompatibilitási antigén (main histocompatibility complex)
MHCII	major hisztokompatibilitási komplex II
mIgG	egér immunglobulin G
MPP	multipotens progenitorok
MR	mannóz receptor
NO	nitrogén monoxid
OVA	ovalbumin
PBS	fiziológiás foszfát puffer (phosphate buffered saline)
PCR	polimeráz láncreakció
pDC	plazmocitoid DC
PE-	fikoeritrin
PE	fikoeritrin
PEG	polietilén-glikol
rFcRn	nyúl neonatalis Fc receptor
rmGMCSF	rekombináns egér granulocita-monocita kolóniastimuláló faktor
rmIL4	rekombináns egér interleukin 4
RPMI	Roswell Park Memorial Insitute tápfolyadék
RT-PCR	reverz transzkripciós PCR
SPF	meghatározott kórokozóktól mentes (specified pathogen free)
TBS	Tris pufferelt sóoldat (Tris buffered saline)
TCR	sejt receptor
TD	T-dependens
Tg	transzgenikus (transgenic)
TLR	Toll-like –Receptor
vt	vad típusú (wild type)

1. Bevezetés

Az immunrendszer a szervezetbe kerülő kórokozókkal szemben hatásos védelmet nyújt. Ez a védettség - vagy más néven immunitás- lehet velünk született - vagyis természetes- és lehet szerzett vagy adaptív. A két védekező rendszer sejtes és molekuláris elemei -és a segítségükkel lejátszódó folyamatok- együttesen biztosítják szervezetünk védelmét komplex, bonyolult folyamatok összehangolásával. Bármely részfolyamat kisiklása a hatásos immunvédekezésben zavart okozhat és akár krónikus fertőzéshez/ betegséghez is vezethet.

A természetes immunitás az élőlények védelmét szolgáló immunfolyamat. A kórokozó a szervezetbe való bejutását követően a természetes immunitás sejtes elemeivel és humorális faktoraival találkozik először. A magasabb rendű állatfajokban ezek a sejtek a makrofágok, dendritikus sejtek, természetes ölősejtek, granulociták és hízósejtek. A természetes immunitáshoz tartozik számos nem sejtes elemből álló komponens is, mint például a komplement rendszer és számos citokin. A természetes immunitásnak köszönhetően a patogének nagy része hatásosan eliminálódik a szervezetből. Emellett a természetes immunitás elemei hatékonyan kapcsolódnak az adaptív immunitás elemeihez. A makrofágok és dendritikus sejtek által felvételre került behatolók apró részletekre való lebontása majd az antigén hatékony, többnyire MHC-korlátozott bemutatása a limfocitáknak, a védekezést még specifikusabbá teszi. Ez nagymértékű fajlagosságot és a későbbiekben pedig immunológiai memóriát is biztosíthat.

Az értekezés témáját képező FcRn, vagyis neonatalis Fc receptor, az utóbbi években számos érdekes kutatási területet szolgáltatott a kutatóknak. Az FcRn-t elsősorban az IgG és albumin homeosztázisban betöltött szabályzó szerepe tette ismertté (Andersen and Bjorneboe, 1964; Brambell et. al. 1964) azonban számos olyan cikk látott napvilágot, amelyekben az FcRn immunfolyamatokban betöltött szerepére világítottak rá. Többek között feltételezték, hogy szerepet játszik az antigének fagocitózissal történő hatékony eliminálásában és az antigén bemutatásában, antigén-IgG immunkomplex esetén (Zhu et. al. 2001, Yoshida et. al. 2004, Vidarsson et. al. 2006).

Kacskovics és mtsai. klónozták és karakterizálták a szarvasmarha, juh, sertés és teve FcRn molekuláját (Kacskovics et. al. 2006b; Kacskovics et. al. 2000; Mayer et. al. 2002; Zhao et. al. 2003). Majd az FcRn immunfolyamatokban betöltött szerepének *in vivo* tanulmányozásához Kacskovics Imre, Bősze Zsuzsanna munkacsoportjával (Mezőgazdasági és Biotechnológiai Kutató Központ, Gödöllő) együttműködve létrehozták a bFcRn transzgenikus egeret, mely a szarvasmarha FcRn α-láncát több kópiaszámban hordozza és fejezi ki (Bender et. al. 2007). Ezek a bFcRn transzgén (tg) egerek hatékonyan védik meg az IgG-t a lebomlástól (Bender et. al. 2007), fokozott humorális immunválaszt mutatnak (Cervenak et al. 2011) és hatékonyan reagálnak még gyengén immunogén antigénekkel szemben is (Vegh et. al. 2011), valamint hatékonyan lehet őket felhasználni hibridóma előállításra (Schneider et. al. 2011).

A fokozott ellenanyagtermelés okait vizsgálva, jelen dolgozat elsődleges témájaként tanulmányozni kívántuk a bFcRn fokozott kifejeződésének hatását a celluláris és humorális immunfolyamatokban részt vevő sejtekre. Ezen belül is a makrofágok és dendritikus sejtek -mint a természetes immunitás fontos sejtes elemei- antigén felvételi mechanizmusa és az ezt követő MHC-korlátozott antigénbemutatása került figyelmünk középpontjába. A továbbiakban pedig a bFcRn kifejeződés fokozásának hatását, a T helper sejtek aktivációjának következtében fellépő, fiziológiásan klonális expanzióhoz vezető, sejtosztódásra gyakorolt hatását tanulmányoztuk.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az adaptív immunválasz

Az immunrendszer feladata, hogy különbséget tegyen saját és nem-saját anyagok között. Minden nem-sajátként felismert struktúra immunválaszt vált ki, míg a saját struktúra általában toleranciát okoz. Az idegen struktúra először a szervezet számos pontján megtalálható antigén prezentáló sejtek (APC) fagocitózisának esik áldozatul. Ezt követően az APC-k antigén bemutató mechanizmusuk révén aktiválják a CD4+ helper T (Th1, Th2, Th17, Tfh) sejteket, vagy kereszt-prezentáció esetén a CD8+ citotoxikus T

limfocitákat (Tc). A CD4+ limfociták citokinek és egyéb humorális faktorok termelésével képesek aktiválni a B sejteket és ezzel beindítani a humorális immunválaszt is.

Az, hogy a természetes immunválaszban részt vevő sejtek a celluláris, vagy humorális immunválaszt indítják-e be az nagymértékben függ az antigén természetétől, ill. az antigént feldolgozó sejttől is. Ha az antigén bemutatása a Th1 szubpopulációt aktiválja, akkor a celluláris immunválasz felé, míg ha Th2 szubpopulációt, akkor a humorális immunválasz felé tolja el a védekezést (Erdei A, Medicina, 2012.)

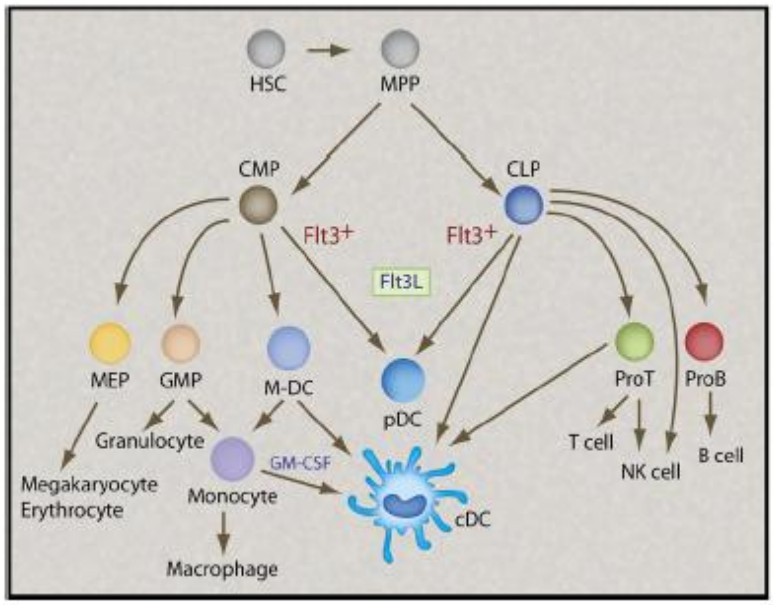
2.1.1. A makrofágok és dendritikus sejtek, mint hivatásos antigén prezentáló sejtek

A hivatásos antigén prezentáló sejtek (APC) közé tartoznak a makrofágok (MΦ), dendritikus sejtek (DC) és esetenként a B limfociták. Közösen az jellemzi őket, hogy sejtfelszínükön az antigéneket MHC-II típusú molekulák mutatják be és olyan receptorok fejeződnek ki, melyek a patogénekre jellemző mintázatot képesek felismerni. Ilyenek pl. a mintázatfelismerő receptorok (pattern recognition receptor – PRR), vagy scavenger receptorok családjába tartozó fehérjék. Az APC-k az MHC II molekulákba integrálva mutatják be az általuk peptidekre bontott exogén eredetű antigént. Ezen keresztül képesek az APC-k a CD4+ T limfociták aktiválására.

Makrofágok: a csontvelőben keletkező és a vérbe jutó monocita a szövetek közé kilépve makrofággá érik. Elsődleges funkciója az idegen anyagok bekebelezése aktív fagocitózissal majd a bekebelezett részecskék prezentációja. Ehhez megfelelő receptor repertoárral rendelkezik a sejtfelszínen: mannóz-kötő receptor, LPS-receptor, scavenger – receptor, FcγR I, II, III, LFA1 adhéziós molekula, CR1 és CR3 komplement receptorok. Ezen receptorok mindegyike az antigén felismerés/felvétel mechanizmusában játszik szerepet. Az Fc receptorok az IgG-vel opszonizált antigének felvételében játszanak szerepet, míg a CR1 és CR3 a komplement komponensekkel opszonizált antigén felvételét segíti. Az antigén bemutatásában az MHC II molekulának van esszenciális szerepe (ld. antigén prezentáció).

A makrofágok számos enzimet, NO-ot és citotoxikus peptidet termelnek, melyek mind a kórokozó elpusztításában és továbbterjedés megakadályozásában játszik szerepet. A gyulladásos citokinek pedig a fertőzés helyszínére vonzzák az immunvédekezésben fontos sejteket. Szerepük tehát nemcsak a celluláris immunválaszban jelentős, hanem a humorális szakaszban is, hiszen az ellenanyaggal opszonizált kórokozók felvételét és elpusztítását is hatékonyan elvégzik.

Dendritikus sejtek: fejlődésük nem olyan egységes, mint a makrofágoké. Két fő csoportot különíthetünk el, az egyik a cDC-k vagyis a konvencionális DC-k a másik pedig a pDC-k vagyis a plazmocitoid DC-k. Mindkét DC típus ki tud alakulni mieloid és limfoid progenitorból. Fejlődésükhöz az Flt3 ligand elengedhetetlen (1. ábra) (Traver et. al. 2000; Wu et. al. 2001; Manz et. al. 2001, Wu et. al. 2001; Izon et. al. 2001).

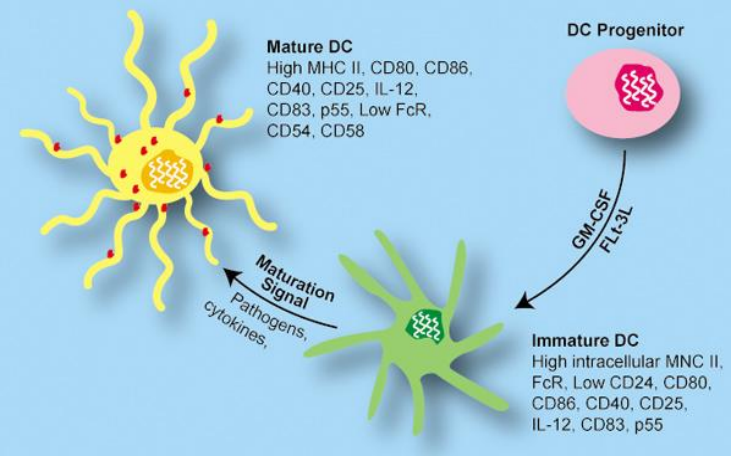


1. ábra: A dendritikus sejtek fejlődési vonalai (HSC- hemopoietic stem cell, MPP-multipotent progenitors; CMP-common myeloid precursors; CLP- common lymphoid precursors; GMP-granulocyte and macrophage precursors; MEP- megakaryocyte and erythrocyte precursors; M-DC- macrophage and DC precursors) (Li Wu et. al. 2007).

Fejlődéstanilag különbséget kell még tennünk az érett és éretlen DC-k között. Ez a különbségtétel azért fontos, mert a két DC stádium eltérő sejtfelszíni receptorokkal rendelkezik és ezáltal más funkciókat lát el. Az éretlen DC nem képes a T sejtek hatékony aktivációjára, elsődleges funkciója az antigének bekebelezése (fagocitózisa). Ezek a DC-k a legtöbb szerv kötőszöveti állományában megtalálhatóak (pl. bőrben található Langerhans sejtek). Sejtfelszínükön jellemzően az antigén fagocitózisához

szükséges receptorok találhatóak: mannóz-kötő receptor, Fcγ receptor, DEC-205. Az antigén prezentációhoz szükséges kostimulátor molekulákat ezek a sejtek viszont alacsony szinten fejezik ki.

Aktiváció hatására (antigén fagocitózisa) a közeli nyirokcsomóba vándorolnak és hivatásos antigén prezentáló sejtté fejlődnek (érett DC). Az érett DC-k már nem képesek hatékonyan fagocitózisra, azonban nagy mennyiségben jelennek meg a felszínükön az MHC II-vel asszociált idegen eredetű peptidek, melyeket a CD4+ T limfociták számára prezentálják. A T sejt aktiválódáshoz szükséges „segélyszignál-t" biztosító kostimulátor molekulák (CD80, CD86) expressziója is megnövekszik ezeken a sejteken (2. ábra) (Steinman et. al 2012, Dudziak et. al. 2007)



2. ábra: A dendritikus sejtek érése (http://dendritic-cells-research.com/index.php?request=maturation_process)

2.1.2 Az Fc receptorok és a kostimulátor molekulák szerepe az adaptív immunválaszban

Az Fc receptorok funkciója az Ig-vel opszonizált részecskék hatékony felvételének elősegítése. Ezek a receptorok az immunglobulinok nehéz láncának Fc részét képesek felismerni és megkötni. Attól függően, hogy mely Ig megkötésére képes, a receptorokat FcαR (IgA), FcγR (IgG), FcεR (IgE) elnevezéssel illették (Mellman et. al 1988, Peter Sondermann et. al. 1999, Jenny M. Woof 2012).

Az Fc γ receptorok:

FcγRIa és b (CD64): nagy affinitású, IgG-t kötő receptor. Az FcγRIa a natív IgG molekulát is képes megkötni. Monocitán, makrofágokon és DC-ken expresszálódik.

FcγRII (CD32): FcγRIIa és c hatékony antigén felvételt és prezentációt biztosító Fc receptor, míg FcγRIIb gátló funkciókat közvetít. Kifejeződik monocitán, makrofágon, granulocitán és B sejteken. Kis affinitású receptor, amely IgG immunkomplexeket köt, elsősorban B sejtek aktivációjában/annak gátlásában van szerepe.

FcγRIII (CD16): kis affinitású Fc receptor. Kifejeződik neutrofil granulocitákon, makrofágon, NK sejten és hízósejteken. Szerepe az IC fagocitózisa és az ADCC beindítása.

Az *FcεRII receptor (CD23):* az IgE molekulákat köti kis affinitással, és főleg a bazofil granulocitákon valamint a hízósejteken expresszálódik. Szerepe van a paraziták elpusztításában, ill. az allergiás reakciók kialakításában.

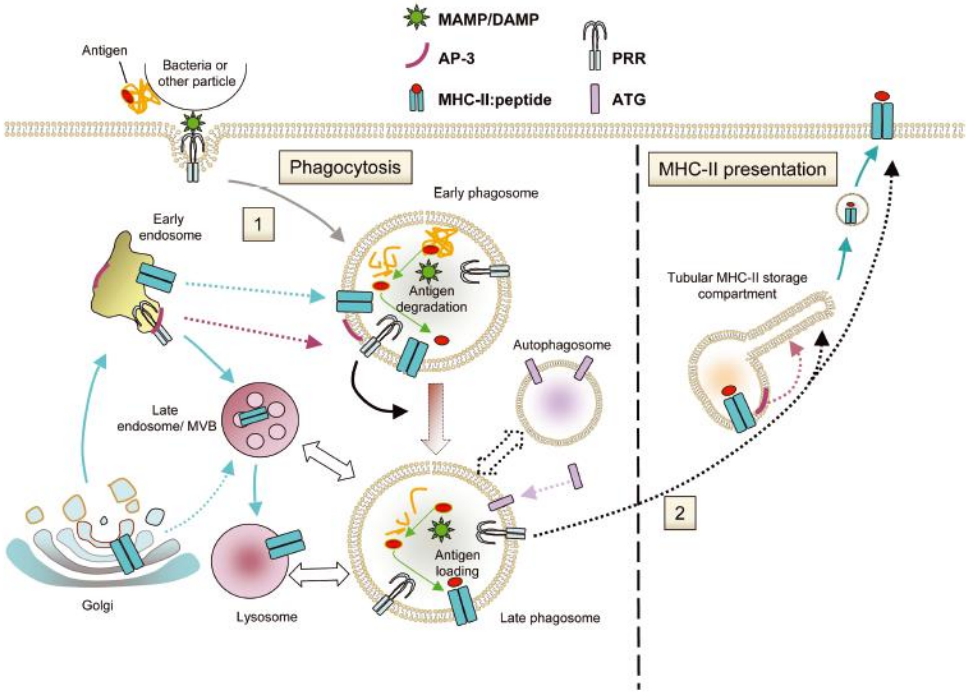
Az *Fcα receptor* (CD89) funkciója az IgA-val opszonizált antigének eliminációja. Kifejeződik monocitán, makrofágon, granulocitán, T és B sejteken.

Kostimulátor molekulák: fő funkciójuk a „veszélyszignál" továbbítása az adaptív immunitást képviselő T sejtek számára. Ugyanis az MHC II-n történő antigén bemutatás csak akkor vált ki hatékony T sejt aktivációt, ha TCR komplexen történő elsődleges aktiváció után bekövetkezik a kostimulátor molekulák által közvetített második aktivációs szignál is. Az antigén bemutató sejteken viszont a kostimulátor fehérjék expressziós szintje a fertőzéskor fellépő veszélyszignálok erősségének és tartósságának függvénye. A ko-stimulációs szignálokat főként a B7.1 (CD80) és B7.2 (CD86) sejtfelszíni fehérjék közvetítik, melyek a T sejtek CD28 és CTLA4 (CD152) sejtfelszíni kostimulátor-receptoraival kapcsolódnak össze. A CTLA4 nagy affinitással kötődik a B7 molekulával és elsősorban gátló jeleket közvetít a T sejtek számára. A CD28 sejtfelszíni receptor ezzel szemben kisebb affinitást mutat a kostimulátorokhoz, aktiváló jeleket szolgáltat és elengedhetetlen az antigénspecifikus T sejt proliferáció létrejöttéhez. A B7-CD28 kapcsolat és az azt követő jelátvitel kritikusan hozzájárul a T sejtek IL2 termeléséhez és az IL-2R sejtfelszíni megjelenéséhez. A B7.1 expresszálódik DC-ken, T és B sejteken, Langerhans sejteken, míg a B7.2 monocitákon is és NK sejteken is kifejeződik az előbb említett sejtek mellett.

2.1.3. Az exogén antigének fagocitózisa és MHC II komplexen történő bemutatásának folyamata

Az APC-k az antigéneket patogénmintázat felismerő receptoraik vagy Fc receptoraik segítségével veszik fel. A folyamat lehet pinocitózis/makropinocitózis, fagocitózis vagy receptor mediálta endocitózis (Rittirsch et. al 2009, Ahrens S. et. al. 2012, Hastings et. al. 2011). A sejt belsejébe kerülve ezek az antigének lebontásra kerülnek a korai fagoszómákban. Ezzel egy időben az MHC II molekulák a képződésük helyéről (az ER-ből) vezikuláris transzporttal a fagoszómákba vándorolnak (Smith MH. et. al. 2011). Az MHC II-t egy invariáns lánc védi meg attól, hogy endogén peptidek tudjanak hozzákötődni. A korai fagoszómák MHC II tartalmú késői fagoszómákká érnek és megtörténik az MHC II molekulák antigén peptiddel való feltöltése. Ehhez szükség van a fagoszómák által biztosított enyhén savas környezetre, endopeptidázokra és katepszinekre melyek hasítják az MHC II-n kötött invariáns láncot, ezáltal felszabadítják a peptidkötő zsebeit (Warmerdam et. al. 1996, Blander et. al. 2012). Az utolsó hasítás eredményeképpen létrejön, az ún. CLIP, mely mindaddig az MHC II-n kötve marad, míg egy exogén peptid le nem szorítja. A CLIP/exogén peptid helycserében szerepet játszanak a CIIV/MIIC vezikulumok membránjában megjelenő HLA-DM fehérjék (3. ábra). Az így létrejövő peptid-MHC II komplex a sejt felszínére vándorol vezikuláris transzport segítségével és megjelenik az APC sejtmembránjában. „Üres" MHC II nem jelenik meg a sejt felszínén. A Th sejtek folyamatos őrjáratban pásztázzák az APC-k által kínált antigén repertoárt és TCR/CD4 receptoraik segítségével összekapcsolódnak az MHC II/peptid komplexszel amennyiben az adott T sejt klón receptora specificitásánál fogva képes kötődni az MHC II által prezentált ligandummal. A TCR által végzett felismerés fajlagos, egyidejűleg ismeri fel a saját MHC II-t valamint az általa bemutatott nem saját peptidet. Ha a TCR megfelelő antigén specifitással rendelkezik, akkor képes kapcsolódni az MHC II-peptid komplexszel (Matsuo et. al. 2004, Serre et. al. 2006). A kapcsolatot adhéziós molekulák is segítik (DC-SIGN, T-ICAM3), azonban az így létrejövő kapcsolat önmagában nem elég a T sejt aktivációhoz. Ez akkor következik be, ha egyéb kostimulációs hatások is érik a sejtet, pl. létrejön a B7-CD28 kostimulátor kapcsolat is. Ez a folyamat bonyolult jelátviteli mechanizmust indít el a T sejtekben melynek hatására nő az adhéziós (ICAM) és integrin (pl. LFA-1) molekulák mennyisége a sejtfelszínen, ezzel erősítve a DC-T sejt kapcsolatot. Ca^{2+} szint gyors emelkedésével számos gén expressziója megnövekszik, közöttük az IL2 és IL2R géneké is. A TCR-MHC II

kapcsolat (immunológiai szinapszis) általában nem túl hosszú élettartamú, a leváló aktiválódott T sejtek lehetővé teszik más TCR számára is az antigén felismerését, ezzel is elősegítve a klonális expanziót. Az aktiválódott Th sejtek az antigéntől és az aktiválás körülményeitől (pl. citokin miliő) függően Th1/Th2/Th17 irányban elköteleződnek. A Th1 irányba differenciálódó Th sejtek képesek a CD8+ citotoxikus T sejtek, makrofágok (sejtölő mechanizmus) aktiválására, ill. a T-dependens humorális immunválasz (B sejtek) támogatására. Fokozzák az IgG1 és IgG3 termelést. A Th2 sejtek viszont főleg eozinofil granulociták és hízósejtek aktivációjában játszanak szerepet, ill. fokozzák a B sejt proliferációt és az IgE, IgA ellenanyagok termelését. A Th17 sejtek proinflammatorikus hatásuk miatt kiemelkedő jelentőségűek, azonban számos autoimmun folyamat kialakulásában is közrejátszanak (Santner-Nanan et. al. 2009, Tsuda et. al. 2001, Michimata et. al. 2002, Miyazaki et. al. 2003, Crome et. al. 2010).



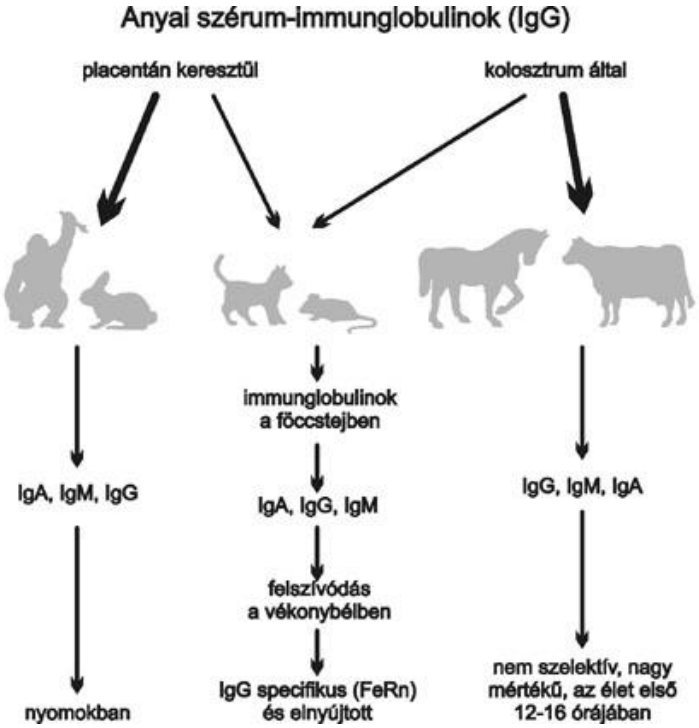
3. ábra: A fagocitózis és az exogén antigén prezentációjának folyamata az MHC II molekulán (MAMP/DAMP-veszély-szignált kiváltó molekula a kórokozó felszínén, PPR-patogén mintázatot felismerő receptor az APC sejtfelszínén, AP3- adaptor protein komplex –fehérje szortírozás, ATG-autofagoszóma képződést elősegítő protein) (Mantegazza et. al. 2013)

2.2. A neonatalis Fc receptor általános jellemzése

2.2.1. Az FcRn rövid története

A méhen belüli fejlődés során a magzat szinte sterilen fejlődik. Minden antigén, amivel az intrauterin fejlődés idején találkozik, test azonos anyagként tolerálni fogja. A főemlősökben az immunrendszer a magzati élet során még nem termel immunglobulinokat, a szervezetében csak a placentán átjutó anyai IgG található. A folyamat receptor mediált. Ez az IgG a születést követő 4. hónaptól teljesen eltűnik a csecsemő véréből, helyét átveszi a csecsemő immunrendszere által termelt immunglobulin.

A páros és páratlan ujjú patásokban magzati élet során nem kerül át védelmet nyújtó immunglobulin, így a születést követően a kolosztrummal vagy más néven föcstejjel történő táplálással jut hozzá az újszülött állat. Az újszülött, mely föcstejet nem fogyaszt védtelen lesz a kórokozókkal szemben. Az anyai immunglobulinok azonban védelmet nyújtanak, hiszen az anya és az újszülött élettere megegyezik, ezáltal a környezetben lévő patogénekkel szemben az anyai immunglobulinok a csecsemő számára is védelmet nyújtanak. A folyamat nem receptor mediált (Butler et. al 1999).



4. ábra: A maternális immuntranszport az emlősökben (Butler et. al. 1999) (1-es csoport: főemlősök, nyúl, 3-as csoport: páros és páratlan ujjú patásokban, 2-es csoport: rágcsálók, ragadozók) Az 1-es és 2-es csoportba tartozó állatok IgG transzportja receptor mediált folyamat.

A ragadozók és rágcsálók mind a kétféle módon hozzájutnak az anyai immunglobulinhoz, mind placentán keresztül, mind pedig a kolosztrummal (Butler et. al. 1999).

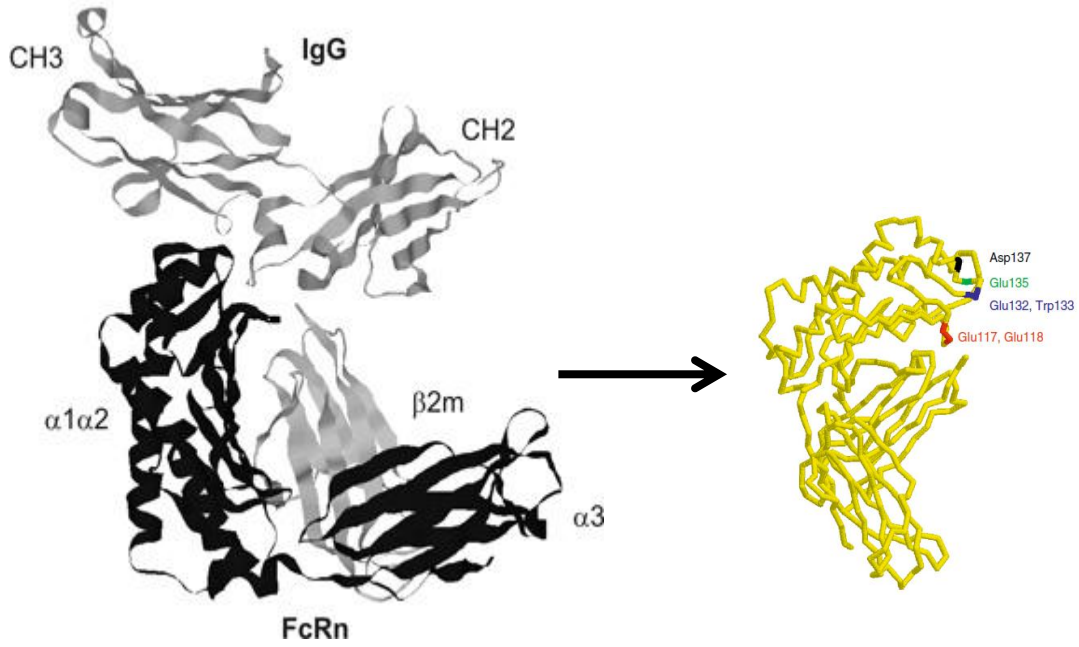
Maternális immuntranszportnak nevezzük azt a folyamatot, mikor az anya szervezetében keringő immunglobulinok átadásával segíti utódja életben maradását, amíg az utód saját immunrendszere képes nem lesz a hatásos védekezésre (4. ábra).

Az immunglobulin felfedezése Paul Erlich nevéhez fűződik (1892) aki megfigyelte, ha az újszülött állat nem kap föcstejet, nagy eséllyel elpusztul. Erre a megfigyelésre alapozva Emil Smith 1946-ban leírta, hogy a tejben az újszülött védelmét szolgáló fehérjék találhatók (Smith, 1946). Majd 1958-ban Brambell bebizonyította, hogy az anyai IgG utódba kerülését egy telíthető receptor biztosítja (Brambell et. al. 1958), amely nemcsak a maternális immuntranszportért felelős, hanem ennek a receptornak köszönhető az IgG hosszú felezési ideje a vérben (Brambell et. al. 1958). Ezt a receptort nagyon sokáig, mint Brambell receptor emlegették (FcRB) majd kiderült, hogy ez a receptor azonos a Jones és Waldman által 1972-ben újszülött rágcsálók vékonybeléből izolált receptorral, melyet neonatalis Fc receptornak neveztek el. Később számos kutató bizonyította, hogy ez a receptor hatékonyan védi az IgG-t a lebomlástól és számos immunfolyamatban vesz részt (Rath et al. 2013).

2.2.2. Az FcRn szerkezete

Az FcRn két polipeptid láncból álló heterodimer fehérje, melynek szerkezete nagyon hasonló az MHC I molekuláéhoz. A fehérje lánc egyik tagja 50 kDa, míg a másik 15 kDa tömegű (Rodewald and Kraehenbuhl, 1984). Simister és mtsa a patkány FcRn szerkezeti analízise során megállapították, hogy a nehéz lánc (α-lánc) szerkezetileg teljesen hasonló felépítésű, mint az MHC I molekula, amit később röntgenkrisztallográfiás analízissel is megerősítettek (Burmeister et. al. 1994).

Az FcRn α-lánca 3 részből áll: extracelluláris domén, transzmembrán régió és citoplazmatikus farok. A funkcióképes molekula létrejöttéhez (akárcsak az MHC I esetében) szükség van a másodlagos kötőerőkkel az α-lánchoz kapcsolódó β2-mikroglobulinra (β2m) (Simister and Mostov, 1989) (5. ábra). Ha a kapcsolat nem jön létre, az α-lánc funkcióképtelen lesz és lebontódik.



5. ábra: Az bFcRn és a hozzá kapcsolódott IgG számítógépes modellje és az FcRn-IgG interakcióért felelős aminosavak az FcRn-en (West et. al. 2000, Ward et. al. 2009)

Habár az FcRn szerkezet hasonlít az MHC I molekulához, funkciójában különbözik tőle. Míg az MHC I molekula rendelkezik ún. peptid kötő doménekkel, melyek az endogén peptidek kapcsolódásához/T sejtek felé való bemutatásához elengedhetetlenek (ld. 2.1.3) addig ezek a peptidkötő zsebek az FcRn esetében sztérikusan nem hozzáférhetőek, ezért az FcRn, az MHC I molekulával ellentétben, nem képes peptid fragmentumok megkötésére. Azonban nagy affinitással, pH-függő módon köti két ligandumát az IgG-t és az albumint.

2.2.3. Az FcRn IgG-t és albumint védő mechanizmusa

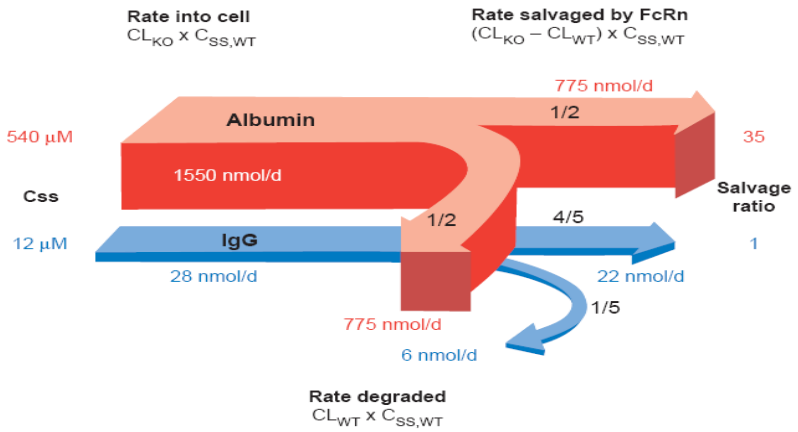
Az FcRn IgG-t védő pontos mechanizmusa már régebb óra ismeretes (Kim et. al. 1994, Medesan et. al. 1997), azonban az albumin homeosztázis és az FcRn kapcsolatáról csak az utóbbi években számoltak be a kutatók. Az ismeretes volt, hogy az albumin nagy felezési idejéért is egy receptor a felelős (Schultze and Heremans, 1966) de az, hogy ez a receptor ugyanaz, mint ami az IgG-t is megvédő FcRn, azt 2003-ban Chaudhury és mtsi írták le (Chaudhury et. al. 2003).

Az FcRn molekula az IgG-t és az albumint két egymástól független kötőhelyen köti meg, azonban mindkét esetben kémhatástól függ az interakció (Chaudhury et. al. 2006). Az IgG, akárcsak az albumin, az FcRn-hez pH dependens módon kötődik, közöttük erős ionos kölcsönhatás alakul ki. Enyhén savas közegben (pH 6-6.5) létrejön a kapcsolat, míg semleges-enyhén bázikus pH-n (7.0-7.5) az IgG disszociál az FcRn molekuláról (Rodewald 1976, Rodewald and Kraehenbuhl 1984.

Az FcRn és IgG interakciójáért meghatározott aminosavak felelősek. Az FcRn esetében az α2 alegységben található Glu117, Glu132, Trp133, Glu135, Asp137 és a β2m-ban található Ile1, míg az IgG esetében az Fc részen található His310, Ile253, His435 aminosav-maradékok játszanak szerepet (Kim et. al. 1999) (5. ábra). Ezek az aminosav maradékok nagyfokú konzerváltságot mutatnak. A pH dependens kötés az aminosavak deprotonálódásával van összefüggésben, ugyanis enyhén savas közegben az IgG Fc részében lévő aminosav-maradékok pozitív töltésűek lesznek, míg az FcRn α2 alegységben lévők negatív töltésűek, ezáltal jön létre az erős ionos kölcsönhatás. Semleges, vagy enyhén bázikus kémhatáson a hisztidinek deprotonálódnak, ezáltal megszűnik a kölcsönhatás (Martin et. al. 2001). Az FcRn szerkezeténél fogva két IgG molekula megkötésére alkalmas, azonban a második IgG-hez való affinitása csökken az első IgG molekula bekötődése után (Popov et. al 1996, Ghetie and Ward, 2000).

Az albumin kötőhely teljesen független az IgG kötőhelytől. Az FcRn α-láncban található His166 aminosavmaradék játszik szerepet az albumin megkötésében, hasonlóan az IgG-hez pH dependens módon (Chaudhury et. al. 2006, Andersen et. al. 2006, Andersen et. al. 2010). Később kimutatták, hogy az FcRn az albumint hasonlóan az IgG-hez megvédi a gyors lebomlástól, és ezáltal hosszú felezési időt biztosít (Andersen et. al. 2012).

A 6. ábrán piros nyíllal látható a termelődő albumin mennyisége, majd a jobbra elhajló nyíl mutatja a lebontásra kerülő albumin arányt. Látható, hogy mintegy felét megvédi az FcRn. Az IgG esetében a sejtek által termelt immunglobulin mintegy 1/5-öde kerül csak lebontásra, míg 4/5-ödét az FcRn megmenti. Ezek az adatok fiziológiás albumin és IgG koncentráció mellett érvényesek. Az FcRn tehát nagyfokú védelmet biztosít az IgG számára a lebomlás ellen (Anderson et. al. 2006).



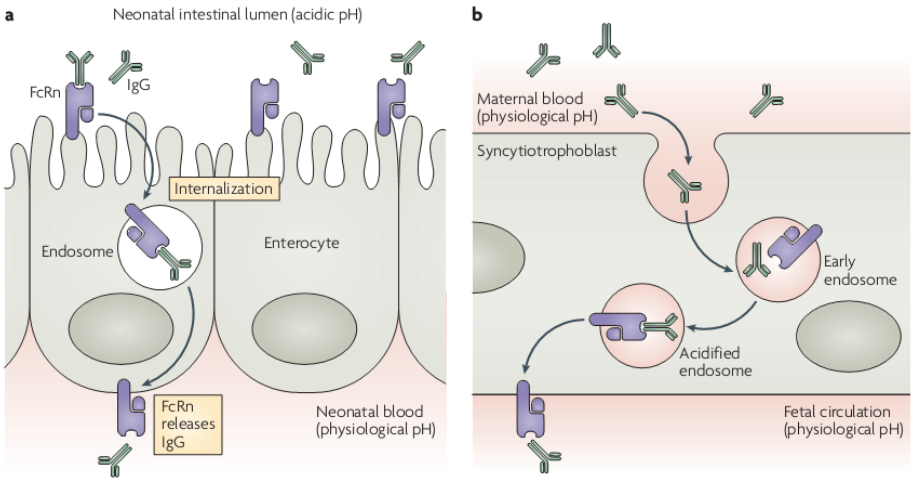
6. ábra Az IgG és albumin megmentésének aránya (Anderson et. al. 2006)

2.2.4. A maternális immuntranszport

A nyulakban és az emberben az FcRn felelős az anyából a magzatba történő IgG transzportért. Ezt a folyamatot a placenta syncytiotrophoblast sejtjeiben lokalizálódó FcRn közvetíti (Story et. al 1994) (7.b ábra).

Syncytiotrophoblastot körülvevő anyai vérben lévő IgG molekulák pinocitózissal internalizálódnak az FcRn tartalmú endoszómákba, ahol pH csökkenés hatására létrejön savas endoszómában az FcRn-IgG komplex, majd transzcitózis révén a magzati oldalra transzportálódik. Ahol a magzati keringésben lévő semleges, enyhén savas kémhatáson disszociál az IgG az FcRn molekuláról (Simister et. al. 2003).

A rágcsálók és ragadozók esetében nem csak a placentán keresztül jut IgG az utódba, hanem nagy mennyiségben kerül felszívódásra anyatejből is. A vékonybélből a keringésbe történő IgG transzportot az FcRn közvetíti (7.a ábra). Az FcRn expresszálódik a duodénumban lévő enterocyták sejfelszínén. Az IgG kötődéséhez szükséges savas környezetet a duodénum savas kémhatása biztosítja. A béltraktusba kerülő IgG az FcRn-hez kötődik, majd transzcitózissal átkerül a sejt bazolaterális oldalára, ahol semleges pH-n felszabadul az IgG az FcRn molekuláról és a keringésbe kerül (Simister and Rees, 1985).

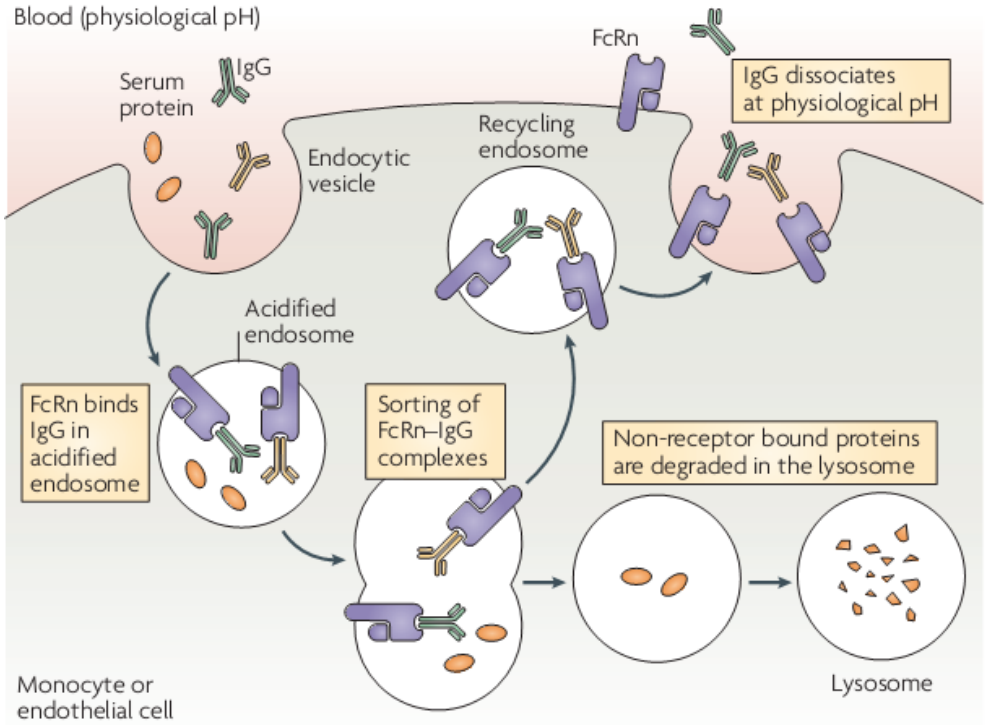


7. ábra: A maternális immuntranszport: 7.a – duodenumból történő FcRn mediálta IgG felszívódás rágcsálók és ragadozóknál, 7.b- placentán át történő IgG transzport a főemlősökben és nyulakban (Roopenian and Akilesh, 2007).

2.2.5. Az FcRn szerepe az IgG homeosztázisban

Az FcRn lényeges funkciója -a maternális immuntranszport mellett- az IgG védelme. Az IgG homeosztázisban betöltött szerepét vizsgálva több munkacsoport leírta az FcRn expresszióját az érfalakat alkotó endotél sejtekben, izomban és bőrben (Junghans et. al 1997, Ward et. al. 2003, Borvak et. al. 1998). Ezek a helyszínek nagy felületet biztosítanak a vérben lévő IgG megkötésére/megvédésére. Ezt bizonyítja az az eredmény is, hogy az FcRn expressziót szelektíven csak az endotélsejtekben gátolva lecsökkenthető a szérum IgG szint (Montoyo et. al. 2009).

Az endotélsejtek, valamint számos hemopoetikus eredetű sejt internalizálja a vérben keringő fehérjéket, közöttük az IgG-t is. Az IgG kötődik a savas endoszómában található FcRn-hez. A savas kémhatásnak köszönhetően létrejön az IgG-FcRn kölcsönhatás, majd az FcRn-IgG komplex újra a sejt felszínére transzportálódik, ahol a semleges pH-n disszociál az FcRn-ről, ezzel növelve szérumbeli fél-életidejét. A sejt lumenébe kerülő egyéb, az FcRn-hez kötődni nem tudó fehérje lebomlik a lizoszómában (Antohe et. al. 2001) (8. ábra). Magas IgG koncentráció esetén a receptor telítődik, így magas IgG szint esetén több IgG kerül lizoszómális lebontásra, rövidebb lesz felezési ideje (Roopenian és Akilesh, 2007).



8. ábra: Az IgG védelem FcRn közvetítette folyamata az érfalakban található endotélsejtekben és monocitákban zajlik (Roopenian és Akilesh, 2007)

Ezen kívül FcRn expressziót írtak le patkány és szarvasmarha hepatocitákban, ahol feltehetőleg az IgG recirkulációja zajlik (Blumberg et. al. 1995; Borvak et. al. 1998, Kacskovics et. al. 2000), valamint a humán és szarvasmarha vese sejtekben is, ahol feltételezhető, hogy az FcRn a szérumból kis mennyiségben a primer szűrletbe kerülő IgG visszatartásáért felelős, illetve feltételezhető, hogy az immunkomplexek eliminálásában is szerepet játszik (Haymann et. al. 2000, Kacskovics et. al. 2006).

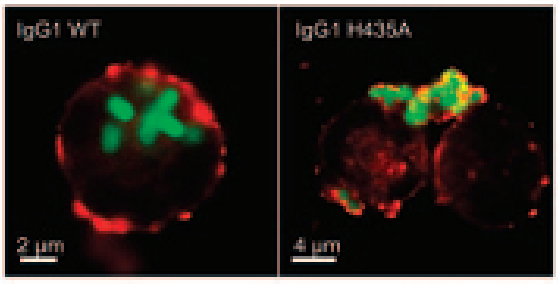
2.2.6. Az FcRn szerepe az adaptív immunválaszban

A hivatásos antigén prezentáló sejtek (APC-k) folyamatos őrjáratot végezve biztosítják szervezetünk folyamatos immunvédelmét. Ezek a sejtek a környezetükben lévő közeget folyamatosan „letapogatva” idegen mintázatot ismernek fel (antigén). Az antigén fagocitózissal való felvétele után lizoszómális úton lebomlik majd az MHCII molekulán keresztül bemutatásra kerül a Th sejteknek.

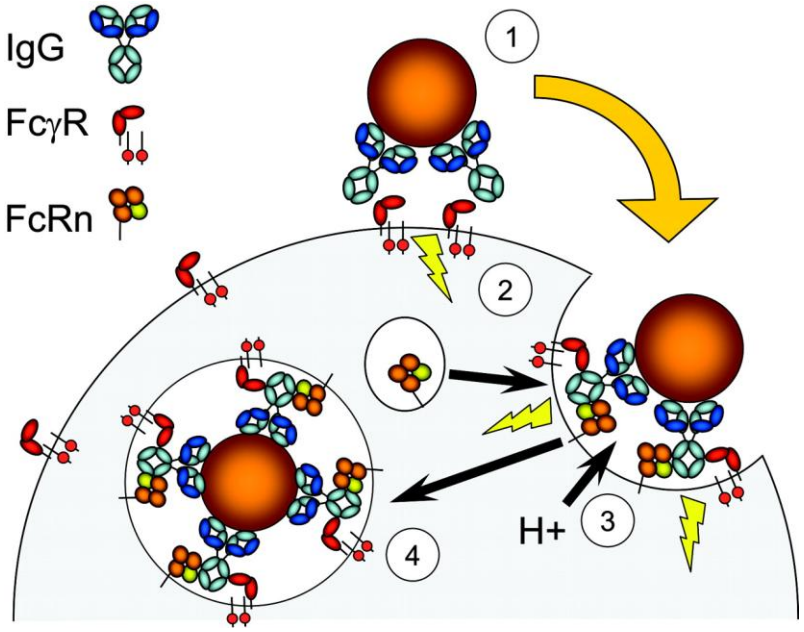
A hivatásos APC-k kifejezik az FcRn-t (Zhu et. al. 2001) és részt vesznek az IgG homeosztázisában. Azonban a 2000-es években egyre több tudományos cikk jelent meg, melyben az FcRn-nek egyéb immunfolyamatokban betöltött szerepét is vizsgálták pl. Yoshida és mtsai által végzett kísérletei, miszerint a bélben található epitélsejtekben kifejeződő FcRn, IgG molekulákat juttat a béltraktusba, ahol az antigénekkel kapcsolódó IgG immunkomplexet az FcRn újra felveszi és a lumenből az interstitiumba továbbítja a bélhámsejteken keresztül és így az itt lévő dendritikus sejtek számára hozzáférhetővé teszi. A DC-k lizoszómális úton bontják az antigént majd prezentálják a T sejtek számára (Yoshida et. al. 2004).

Qiao és mtsai egér FcRn KO és vad típusú egerek lépéből izolált dendritikus sejtekkel végzett kísérleteik szerint csökkent antigén specifikus T sejt proliferáció volt kimutatható az FcRn KO egerekből származó DC-k esetében a vad típusú kontrollhoz képest- ha a mindkét állatból származó DC-ket ovalbumin tartalmú immunkomplexszel töltötték fel (OVA-IgG IC). A kísérletet végrehajtották olyan OVA-IgG IC-vel is, melyben az IgG Fc részén kimutálták az FcRn kötő helyet. Ez esetben az IC nem tudott kötődni az FcRn-hez, így csökkent T sejt proliferáció volt mérhető akár a KO akár a vad típusú állatokból származó DC-t töltötték fel a mutált-IC-vel (Qiao et. al. 2008).

2011-ben egy másik munkacsoport *in vitro* és *in vivo* végzett T sejt proliferációs kísérletei is bizonyították, hogy az FcRn fokozza az MHC II-n történő endoszómális antigének bemutatását (Xindong Liu. et. al. 2011). Egy másik munkacsoport kimutatta, hogy a neutofil granulocitában igen erős kolokalizáció figyelhető meg a fagolizoszómába kerülő IgG-vel opszonizált baktérium és az FcRn között. Kísérleteiket olyan IgG-vel is elvégezték, amelyek az FcRn-hez való kötődésért felelős aminosavai mutáltak, ami azonban nem zavarja az antigén-IgG immunkomplex Fcγ receptor kötődését. Az íly módon létrehozott IC-t kisebb mértékben vették fel a neutrofilek, ami alapján arra következtettek, hogy a hatékony fagocitózis folyamatához elengedhetetlen az FcRn (9. ábra) (Vidarsson et. al. 2006).



9. ábra: Az FcRn szerepet játszik az IC fagocitózisában (jobb oldalon nem mutált IgG-vel opszonizált baktériumok hatékony fagocitózisa látható, míg a bal oldali képen az FcRn kötőhely mutált IgG-vel opszonizált baktériumok a sejt felszínén találhatóak: gátolt fagocitózis) (Vidarsson, 2006)



10. ábra: AzFcRn szerepe a fagocitózis folyamatában (Vidarsson, 2006)

Az FcRn fagocitózisban betöltött szerepének leírására Vidarsson és mtsi az alábbi hipotézist állították fel (10. ábra): 1. Opszonizált antigén kötődése a fagocitáló sejt FcγR receptorához. A folyamatot az FcRn segíti. 2. Bonyolult szignalizációs útvonal elindítása (FcR-ITAM). 3. Az FcRn-t tartalmazó granulumok fúziója a fagoszómába. Ezzel egy időben proton-pumpát tartalmazó granulumok olvadnak a fagoszómába melyek elősegíti a lizoszóma savanyodását és létrejön az IgG-FcRn kapcsolat. 4. Fagolizoszóma képződés: melynek eredménye az opszonizált antigén fagocitózisa majd lebontása és antigén bemutatása.

2.2.7. Az FcRn immunfunkciójának tanulmányozása FcRn KO egerekben

Egy gén és funkciójának tanulmányozására a leghatékonyabb módszer, ha gátoljuk az expresszióját. Az FcRn funkcionális tanulmányozása során is ezt az elvet követve gátolták a β2m expressziót, melynek köszönhetően funkcióképes FcRn nem tudott képződni. A probléma ezzel a megközelítéssel abban mutatkozott, hogy β2m hiányában funkcióképes MHC I molekula sem jött létre, ezáltal a CD8+ T limfociták felé történő Ag prezentációban zavar keletkezik, számuk drasztikusan csökken (Koller et. al. 1990; Zijlstra et. al. 1990). Mindezzel együtt azonban kimutatható volt a sérült maternális immuntranszport és az IgG szint csökkenése is (Israel et. al. 1995, Ghetie et. al. 1996; Junghans és Anderson, 1996).

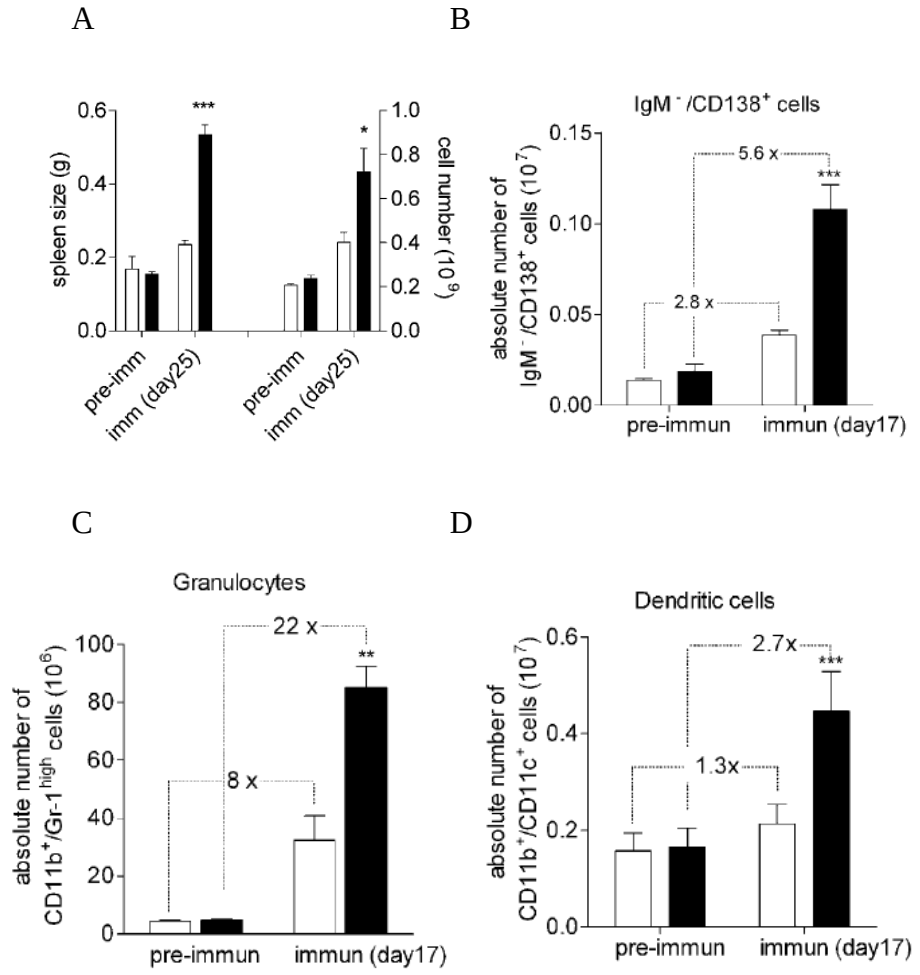
Ezt követte egy újabb megközelítés, miszerint az FcRn α-láncának expresszióját akadályozták meg FcRn génkiütött (Knock Out – KO) egerekben. Ezek a vizsgálatok újabb bizonyítékot szolgáltattak az FcRn IgG védő mechanizumára és az immuntranszportban betöltött szerepére (Chaudhury et. al. 2003; Qiao et. al. 2008; Roopenian et. al. 2003). Ez a megközelítés azonban azt a problémát is felveti, hogy a receptor génkiütése nem befolyásolja-e egyéb gének aktivációját/átírását.

2.2.8. A bFcRn-t overexpresszáló transzgén egér

Egy újszerű megközelítést jelentett Kacskovics és mtsi által előállított szarvasmarha FcRn-t (bovine FcRn- bFcRn) overexpresszáló FVB/N, majd később BALB/c háttéren lévő egértörzsek létrehozása. A mesterséges bakteriális kromoszómát (bacterial artificial chromosome -BAC) mikroinjetálással jutatták az egér megtermékenyített petesejtjébe. Ez a mesterséges kromoszóma a bFcRn α-lánc teljes genomi szekvenciáját tartalmazta. Ezzel az eljárással sikerült két transzgenikus (tg) egérvonalat előállítani, melyek kópiaszámtól függően, különböző mértékben fejezik ki a bFcRn-t (emelett az egerek saját mFcRn-t is kifejezik). Ez a két vonal a #14 és #19 melyek 2 és 4, illetve 5 és 10 kópiában hordozzák a bFcRn-t hemi-, ill homozigóta formában. A bFcRn szövet- és sejtpecifikus megjelenését gén- és fehérje szinten is igazolták (Bender et. al. 2007).

Az utóbbi években Kacskovics és mtsai számos kísérlettel bizonyították, hogy a bFcRn nemcsak expresszálódik, hanem funkcióképes fehérjét alkot az egér β2m-al. Emellett leírták, hogy a bFcRn tg állatok hatékonyan védik meg nemcsak az egér IgG-t,

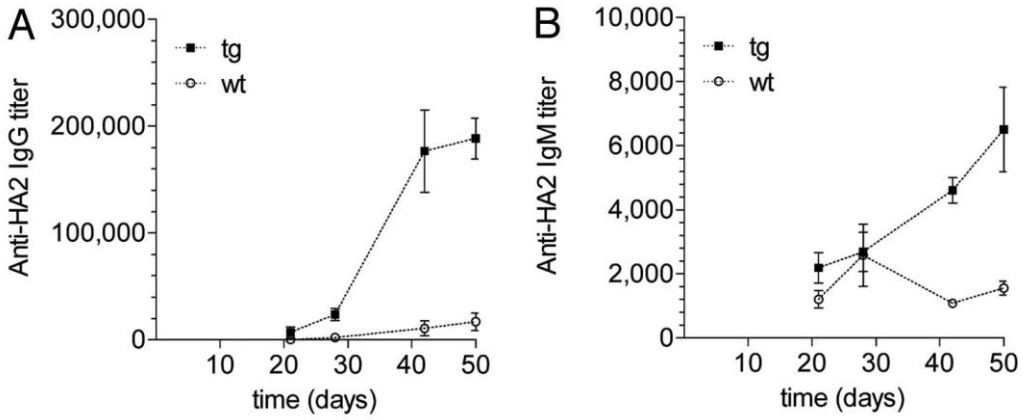
hanem a humán IgG-t is a lebomlástól, a két fehérje felezési ideje hosszabb a vad típusú kontrollhoz képest. Ugyancsak kimutatták, hogy T-dependens immunválasz (ovalbuminnal történő oltás) során a bFcRn tg állatok nagyobb lépmérettel, lépsejtszámmal és magasabb specifikus IgG, IgM és totál IgG titerrel rendelkeznek a kontroll állatokhoz képest. A megnövekedett lépsejtszámban a különböző sejtpopulációk arányai jelentősen eltértek a vad-típusú állatokhoz képest. Jelentősen megnövekedett a granulociták, DC-k és antitestet termelő plazmasejtek száma a teljes lépsejtszámhoz viszonyítva (11. ábra) (Cervenak et. al. 2011).



11. ábra: bFcRn tg egér lépsejtjeinek elemzése vt kontrollhoz viszonyítva (fehér oszlop jelöli a vt kontrollt, míg a fekete a bFcRn tg állatot): A, lép méret és lépsejtszám. B, izotípus váltáson átesett IgM- plazmasejtek száma. C, granulocita szám, D, dendritikus sejtszám az immunizálás előtt is után

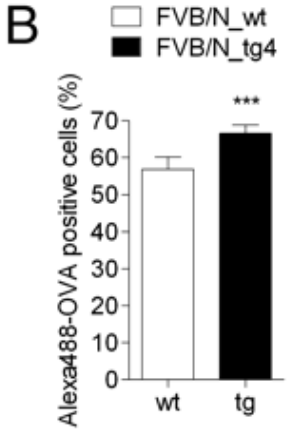
Ezek az állatok hatékony IgG produkciót mutatnak gyengén immunogén peptidekkel szemben. A H1N1 influenza vírus hemaglutinin 2-es alegységéről (HA2) leírták, hogy gyenge immunogenitással rendelkezik (Ekiert et. al. 2009). A HA2 peptidet egy

hordozóhoz konjugálva sikerült magas titerű antigén specifikus IgG és IgM titert mérni (12. ábra) (Vegh et. al. 2011).



12. ábra: A bFcRn tg egerek immunizálása gyengén immunogén influenza peptiddel: robosztus különbség mutatkozik az antigén specifikus IgG éa IgM titerben a vad típusú kontrollhoz képest (A, B)

A bFcRn tg állatok véréből izolált neutrofil granulocitákból sikerült kimutatni a bFcRn expressziót, továbbá Vidarsson eredményeire támaszkodva hatékony fagocitózist sikerült detektálni, mikor IgG-vel opszonizált antigént fagocitáltattak a sejtekkel (13. ábra) (Cervenak et. al. 2011). Kimutatták továbbá, hogy immunizálást követően, a megnövekedett lépből izolált lépsejtekből hatékonyabban lehet hibridóma mikrokultúrát előállítania kontroll állatokhoz képest (Schneider et. al. 2011).



13. ábra: Vérből izolált bFcRn tg neutrofil granulociták hatékonyabban veszik fel az IgG-vel opszonizált antigént a vad típusú kontroll állatokhoz képest.

3. Célkitűzés

3.1. A nyúl FcRn (rFcRn) kimutatása szövetekben és immunsejtekben

Munkacsoportunk célul tűzte ki, hogy karakterizálja a nyúl FcRn-t. Mivel ezeket az állatokat igen elterjedten használják a poliklonális, sőt újabban a monoklonális ellenanyag előállításban, így egy olyan nyúl törzs létrehozása mely fokozott mértékben kifejezi az FcRn-t, és fokozott humorális immunválasszal rendelkezik, iparilag is kiemelkedő jelentőséggel bírhat.

A munkafolyamatot Dr. Bősze Zsuzsanna munkacsoportjával közösen, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban végeztem. Célkitűzésünk a nyúlból izolált peritoneális makrofágokban és a vérből kinyert neutrofil granulocitákban az rFcRn kimutatása volt RT-PCR módszerrel**.**

3.2. A bFcRn expresszió kimutatása immunsejtekben

Lépből fluoreszcens sejtszortírozással izolált immunsejtekből (T, B, MΦ, DC, Gr) és peritoneális makrofágokból a bFcRn mRNS szintű kimutatása RT-PCR módszerrel.

3.3. A bFcRn overexpresszáló egerek immunválaszának vizsgálata

3.3.1. A fagocitózis hatékonyságának vizsgálata peritoneális makrofágokon és csontvelői eredetű dendritikus sejteken

Konfokális mikroszkópia és FACS analízis segítségével funkcionálisan tesztelni kívántuk a bFcRn tg egerekből származó APC-k fagocita funkcióját ovalbumint tartalmazó IC (OVA-IgG) felhasználásával. Az FcRn mediálta folyamat kontrolljaként szolubilis ovalbumint alkalmaztunk, melyet az FcRn nem képes megkötni. Azt kívántuk megvizsgálni, hogy az FcRn overexpressziója befolyásolja-e az immunkomplexek felvételének hatékonyságát.

3.3.2. Befolyásolja-e a bFcRn a peritoneális makrofágok és csontvelői eredetű dendritikus sejtek sejtfelszíni molekuláit?

Kísérleteinket szérumból tisztított OVA-specifikus IgG-t tartalmazó IC-vel **(**OVA-IgG) feltöltött peritoneális makrofágokkal ill csontvelőből izolált dendritikus sejtekkel végeztük. Az antigén felvételében szerepet játszó Fcγ receptorok sejtfelszíni megjelenését és a hatékony antigénbemutatásban elengedhetetlen kostimulátor molekulák (CD80, CD86), valamint az MHC II sejtfelszíni expresszióját kívántuk tanulmányozni vad típusú és bFcRn tg egerekből származó makrofágokon és dendritikus sejteken, szolubilis ovalbumin és OVA-IgG immunkomplexszel történő kezelés hatására**.**

3.3.3. Befolyásolja-e a bFcRn overexpresszió a dendritikus sejtek antigén prezentációját (T sejt proliferációs assay)?

A T sejteket az OVA TCR transzgén egér lépsejtjeiből nyertük. A vad típusú és bFcRn tg egérből származó dendritikus sejtek antigén bemutató/ T sejt proliferációt kiváltó képességét a T sejtekbe beépülő radioaktív timidin beépülésével követtük nyomon.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A nyúl FcRn α-lánc expresszió kimutatása peritoneális makrofágból és vérből izolált neutrofil granulocitából

A kísérlethez felhasznált nyulak a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont konvencionális állatházából származtak és a kísérletek elvégzése is itt történt az állatvédelmi és etikai előírások betartásával.

A *peritoneális makrofágok* kinyeréséhez a nyulakat 3%-os Brewer- féle tioglikoláttal (Sigma Aldrich, Brewer thioglycollate medium, B2551) oltottuk intraperitoneálisan, majd a 4. napon, a nyulak túlaltatását követően PBS-vel kimostuk a hasüregi makrofágokat. A sejteket mostuk, majd ioncserélt vízzel lizáltuk a vörösvérsejteket. Ismételt mosás után a sejteket szétosztottuk FACS jelöléshez és RNS izoláláshoz.

A *granulocitákat* túlaltatott nyulak elvéreztetéséből származó vérből izoláltuk dextránoldatban történő ülepítéssel.

25 ml Na-EDTA-val (Invitrogen) 1:1 arányban alvadásgátolt vérhez 25 ml 3%-os dextrán oldatot adtunk és 30 percig szobahőmérsékleten ülepítettük. Ekkorra elvált a plazma és a vörösvérsejt és közöttük éles határvonal lett megfigyelhető. Óvatosan leszívtuk a plazmát, majd a sejteket 10 ml Ficoll-Hypaque (Sigma) oldatra rétegeztük. Ezt követően újra centrifugáltuk és összegyüjtöttük a Ficoll réteg alá kerülő neutrofil granulocitákat. A sejtszuszpenzióra 0,2 %-os NaCl oldatot mértünk a vörösvérsejtek líziséhez, majd mostuk a sejteket és RNS-t izoláltunk belőlük. A granulocita tisztaság ellenőrzésére nem volt módunk, mivel kereskedelmi forgalomban nem kapható anti-rabbit Gr1 és a rendelkezésünkre álló anti-mouse Gr1 nem volt alkalmas a detektáláshoz.

(Current Protocols in Immunology, Volume 4, Unit 14.1.2. Basic Protocol 1)

4.1.1. A makrofág tisztaságának ellenőrzése áramlási citofluorimetriával

A sejteket szétosztottuk $5x10^5$ db sejt/ FACS csőre. Ezt követően a sejteket mostuk, majd a sejt pelletet Alexa Fluor 647-vel konjugált anti-mouse CD11b-vel (eBioscience) jelöltük 4°C-on sötétben, 20 percen keresztül. Izotípus kontrollként a gyártó által ajánlott

reagenst használtuk. A sejteket FACS készüléken elemeztük és az adatokat FCS Express software-rel (De Novo Software, Los Angeles, CA) értékeltük ki.

4.1.2. A nyúl FcRn α-lánc kimutatás RT-PCR módszerrel

RNS izoláláshoz $2x10^7$ db sejtből indultunk ki és a Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével a gyártó útmutatása alapján RNS-t izoláltunk. A koncentrációt NanoDrop segítségével ellenőriztük, mely átlagosan 1200 ng/μl volt. Ezt követően összeállítottuk az RT-PCR mix-et és az RNS-t cDNS-sé írtuk át. Majd a cDNS-ből rFcRn α-lánc specifikus primer párok (GSP1:5'-AAG CCC AGG CGT AGA AGG-3' és R1B1: 5'-CTG AAC GGT GAG GAC TTC AT-3') segítségével felsokszoroztuk a 380bp hosszúságú génszakaszt. A PCR terméket DNS elektroforézissel futtattuk meg (1,5 % agaróz gél; Sigma-Aldrich) és etidium bromiddal detektáltuk. Az azonosításhoz pedig 100bp-os DNS létrát használtunk (Fermentas Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder).

4.2. A bovin (b) FcRn expresszió kimutatás bFcRn transzgén egér immunsejtjeiben

Az egér immunsejtek bFcRn expressziójának kimutatásához transzgén egér lépsejt szuszpenzióját használtunk, negatív kontrollként pedig vad típusú egér lépsejt szuszpenzióját.

4.2.1. Sejt szortírozás

A kísérlethez 10 hetes BALB/c hátterű, a bFcRn-t 5 kópiaszámban kifejező tg egereket használtunk. Az egér túlaltatását követően eltávolítottuk a lépét majd petri-csészében sejt szuszpenziót készítettünk. Mosás és a vörösvérsejtek eltávolítása után a sejteket a szortírozási tematikának megfelelően jelöltük.

Szortírozási tematika:

Makrofágok, dendritikus sejtek és neutrofil granulociták elkülönítése:

A sejteket A647-vel konjugált anti-CD11b-vel (eBioscience) és PE-vel konjugált CD11c-vel (BD Pharmingen) jelöltük majd FACSAria III Cell Sorter segítségével

szortíroztuk a kettősen pozitív dendritikus sejteket (CD11c+CD11b+) ill az egyszeresen pozitív sejteket (CD11c-CD11b+). Az egyszeresen pozitív sejteket PE-vel konjugált anti-Gr1-vel tovább jelölve választottuk szét makrofágokra (CD11b+Gr1-) ill neutrofil granulocitákra (CD11b+Gr1+). Minden sejttípusból legalább 10^6 db sejtet gyűjtöttünk ki. A sejtek a szortírozás közben Trizolba kerültek.

T és B limfociták elkülönítése:

A tg egér lépsejt szuszpenziót FITC-vel jelölt anti-CD19 (eBioscience) és PE-vel konjugált CD3-val (eBioscience) jelöltük, majd a sorter segítségével szétválogattuk a CD3+ T limfocitákat, ill. a CD19+ B limfocitákat. Mindegyik sejttípusból 10^6 db sejtet gyűjtöttünk. A sejtek szortírozás közben Trizolba kerültek.

4.2.2. A bFcRn detekció egér immunsejtekben RT-PCR módszerrel

RNS izoláláshoz $1x10^6$ db sejtből indultunk ki és Trizol segítségével RNS-t izoláltunk. A koncentrációt NanoDrop segítségével ellenőriztük.

Az RNS-t semi-nested PCR reakció segítségével cDNS-sé írtuk át, majd a cDNS-ből reverz primer (R2 5'–GACTCGAGTCGACATCGA–3') és bFcRn specifikus forward primer (B7: 5'-GGCGACGAGCACCACTAC-3') segítségével felsokszoroztuk a detektálni kívánt génszakaszt az első reakcióban. Expressziós kontrollként GAPDH-t (GAPDH forward primer: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3') és mFcRn-t (M1L forward primer: 5'-GGATGTGGGAAAATCAGGTG–3') használtunk. A kapott termékeket egy második reakcióban újra felsokszoroztuk az első reakcióban használt forward primerekkel. Reverz primerként a bFcRn specifikus B8-at (5'-GATTCCCGGAGGTCWCACA-3' ahol W vagy A vagy T) a GAPDH specifikus GAPDHrev-et (5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3') és a mFcRn specifikus M1R-et (5'-CGCTCCGGACAAGAGTTTAG-3') használtuk.

A termékeket DNS elektroforézissel detektáltuk és az azonosításhoz 100bp-os DNS létrát használtunk (a kísérletet Végh Attila végezte, ELTE-Immunológia Tanszék).

4.3. A fagocitózis vizsgálathoz felhasznált anyagok és módszerek

4.3.1. Egér peritoneális makrofág izolálása

A kísérlethez felhasznált kísérleti állatok 8-10 hetes BALB/c háttérű bFcRn tg egerek, melyek 5 kópiában hordozzák a transzgént (Bender et. al. 2007). Kontrollként vad típusú BALB/c egereket használtunk. A kísérleti állatokat az ELTE konvencionális állatházában tartottuk az állatvédelmi és etikai előírások betartásával.

Az egér peritoneális makrofágok izolálása megegyező módon történt a nyúl peritoneális makrofágokéhoz (ld. 4.1)

4.3.2. Egér csontvelői eredetű dendritikus sejtek differenciáltatása

A differenciáltatáshoz felhasznált állatok 4-6 hetes BALB/c háttéren lévő bFcRn tg egerek és kontrollként 4-6 hetes BALB/c egereket használtunk.

A túlaltatott egerekből eltávolítjuk a femurt és a tibiát majd GKN oldattal kimossuk a csontvelőt. A vörösvérsejtek lízise után a sejteket mossuk, majd $2x10^6$ db sejt/ml koncentrációban RPMI II+ 10% FCS –t és merkapto-etanolt tartalmazó médiumba felvesszük. A sejt szuszpenzióhoz 10 ng/ml végkoncentrációjú rmIL4 (eBioscience) és rmGMCSF-et (Millipore) adunk és 6 lyukú tenyésztőedénybe helyezzük differenciáltatni CO_2 termosztátba (5% CO_2, 37°C). Minden másnap leszívjuk a tápfolyadék 2/3-adát és mossuk az eltávolított sejteket. Majd friss médiumban vesszük fel a sejteket a teljes térfogatnak megfelelő citokin mennyiség hozzáadásával. A 7. nap éretlen dendritikus sejtekként kezelve ellenőrizzük a kultúra tisztaságát áramlási citofluorimetriával.

4.3.3. Áramlási citofluorimetria és konfokális lézerpásztázó mikroszkóp technika

Az áramlási citofluorimetriás méréseket Beckton Dickinson FACS Calibur citofluoriméteren CellQuest Pro software (BD Bioscience, San Jose, CA) alkalmazásával végeztük. Ehhez a sejt pelletet fluorokrómmal konjugált specifikus antitesttel jelöltük 4°C-on sötétben 20 percen keresztül. Majd FACS pufferrel mostuk. Ezt követően a méréshez FACS pufferben vettük fel a sejteket és analizáltuk FACS készüléken, majd az

adatokat FCS Express software-rel (De Novo Software, Los Angeles, CA) értékeltük ki. A kapott fluoreszcens intenzitásokat átlagos fluoreszcenia intezításban adtuk meg (RMF).

A konfokális mikroszkópos méréseket Olympus Fluoview 500 CLSM (Hamburg Germany) mikroszkóppal végeztük Fluowiev500 software alkalmazásával. A minták előkészítése megegyezik az áramlási citofluorimetria előkészítésével. A képeket 60x nagyítású immerziós objektívvel, esetenként további digitális nagyítással készítettük.

A dendritikus sejt karakterizálásához az alábbi monoklonális antitesteket használtuk:

- PE-vel konjugált anti-MHCII (I-A/I-E) (eBioscience),
- A647-vel konjugált anti-CD11b (eBioscience),
- PE-konjugált anti-CD11c (BD Pharmingen),
- FITC-konjugált anti-CD14 (BD Pharmingen).

Az egér peritoneális makrofág tisztaság ellenőrzésére az alábbi antitesteket használtuk:

- A647-vel konjugált anti-CD11b (eBioscience)
- PE-konjugált anti-Gr1 (Ly6-G) (BD Pharmingen)

Az FcγR expresszió vizsgálathoz A647-vel konjugált K.931 (Laszlo et. al. 1988) használtunk, mely mindhárom FcγR-hez képes kötődni. Kontrollként A647-vel konjugált IgG3-at használtunk, mely kis affinitással kötődik az FcγR-hoz.

A kostimulátor molekula expresszió viszgálathoz: allofikocianinnal konjugált anti-CD80 és anti-CD86 antitestet (eBioscience) és a T sejt tisztaság ellenőrzésére PE-vel konjugált anti-CD4 (eBioscience) antitestet használtunk.

A specifikus antitesteket és a hozzájuk tartozó izotípus kontrollokat a gyártó által ajánlott koncentrációban alkalmaztuk.

4.4. Fagocitózis vizsgálat

A fagocitózis teszthez vad típusú (vt) és bFcRn tg egerek peritoneális makrofágjait és csontvelőből differenciáltatott dendritikus sejtjeit használtuk. A sejtekhez adott A488-jelölt immunkomplex (IC) segítségével tudtuk követni a fagocita funkciót áramlási citofluorimetriával.

Az immunkomplex (IC) A488-jelölt ovalbuminból (OVA) (1mg/ml) és tisztított anti-OVA IgG-ból, vagy anti–OVA IgG-t tartalmazó teljes szérumból készítettük.

Az anti-OVA IgG-t, OVA-val immunizált vt BALB/c egerek szérumából (Cervenak et. al. 2011) tisztítottuk proteinG oszlopon (Qiagen) a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Majd steril PBS-ben bekoncentráltuk 1 mg/ml-es koncentrációra. Fontos megjegyezni, hogy az így tisztított steril IgG nem csak OVA specifikus IgG-t tartalmaz, hanem a kísérleti egér teljes IgG-je megtalálható benne.

4.4.1. Az antigén-IgG immunkomplex létrehozása

Az IC-t mindig frissen, a kísérlet végrehajtása előtt készítettük.

IC létrehozás anti-OVA IgG-t tartalmazó szérumból: 1µl (1 mg/ml) Alexa 488-val jelölt OVA-hoz 5 µl anti OVA IgG-t tartalmazó szérumot adtunk majd vortexelés után 30 percig inkubáltuk 37°C-on (sötétben), hogy kialakuljon az IC (Cervenak et. al. 2011). Ezt az IC-t $5x10^5$ db sejthez adtuk, majd az idő függvényében néztük a sejtek általi IC felvételt.

IC létrehozás anti-OVA IgG-t tartalmazó szérumból tisztított IgG-vel: 1 µl (1 mg/ml) A488-val jelölt OVA-hoz 9 µl (1 mg/ml) anti-OVA IgG-t adtunk. Ezt vortexeljük és 30 percre 37°C-ra helyezzük, hogy kialakuljon az IC. Ezt követően jégre és sötétre helyezzük, majd felhasználásig ott tároljuk. A korábban beállított kísérletek alapján FACS csövenként használt $5x10^5$ db sejthez 10 µg IC-t adunk. Kontrollként 1 µl (1 mg/ml) A488-val jelölt OVA-t és 9µl PBS-t használtunk és hasonlóan 10 µl/FACS cső mennyiségben adtuk a sejtekhez.

4.4.2. A fagocitózishoz használt sejtek előkészítése

A perifériás makrofágokat (MΦ) mindig frissen izoláljuk és a lehető leghamarabb elvégezzük a fagocitózis tesztet, ugyanis a MΦ fagocita funkciója gyorsan romlik. A makrofágok kinyerése és mosása után a sejteket $5x10^6$ /ml koncentrációban felvesszük RPMI II+10% FCS+MeOH tápfolyadékban és 100µl/ FACS cső szétosztjuk a sejteket a fagocitózis teszthez.

A csontvelői eredetű dendritikus sejteket (BMDC) a differenciáltatás 7. napján használjuk a fagocitózis teszthez. Ekkor éretlen dendritikus sejtként (DC) kezeljük őket, melyek fagocita funkciója jóval nagyobb, mint az érett DC-ké.

A 6 lyukú tenyésztő edényből óvatosan összegyűjtjük a sejteket majd mosás után tápfolyadékban felvéve $5x10^6$/ml sejt koncentrációt állítunk be. Majd 100µl/ FACS cső szétosztjuk.

4.4.3. Fagocitózis teszt

A FACS csövekbe szétosztott sejtekhez hozzáadtuk az előkészített IC-t és a szolubilis ovalbumint, majd 30-60-90-120 percre CO_2 termosztátba (37°C) helyeztük a mintákat. Kontrollként 30 percig jégen tartott sejteket használtunk, ahol a sejtfelszíni kötődést tudtuk vizsgálni, ugyanis 4°C-on fagocitózis nem történik.

A fagocitózis leállítása után a sejteket azonnal jégre raktuk és 4°C-ra hűtött PBS-vel mostuk. A fagocitózis teszt során a MΦ sejteket A647-vel konjugált anti-CD11b-vel és PE-konjugált anti-Gr1-vel jelöltük majd 3%-os paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk és FL1-es csatornában áramlási citofluorimetriával követtük a jelölt IC felvételének mértékét az idő előlre haladtával. Ezt követően, összehasonlítottuk a különböző időpontokban felvett IC mennyiségét a vt és tg állatokból származó sejtekben. Az IC intracelluláris lokalizációját konfokális mikroszkópiával ellenőriztük, ugyanis a tripánkékkel elterjedt „quenching" technika Alexa festékek esetén nem alkalmazható.

A BMDC-ket A647-vel konjugált anti-CD11b-vel és PE-vel konjugált anti-MHCII-vel jelöltük és hasonlóan jártunk el a mérés során a MΦ sejtekhez hasonlóan. A kísérletek három egymástól független mérésben ismételve lettek.

4.5. T-sejt proliferációs teszt

A T-sejt proliferációs teszthez MΦ-okat és BMDC-ket valamint DO11.10 OVA TCR tg (Jacksons Laboratory) egérből származó T sejteket használtunk. A DO11.10 olyan genetikailag módosított BALB/c háttéren lévő egértörzs, melynek minden T limfocitája

OVA specifikus, így az OVA-val feltöltött APC-k által bemutatott OVA peptidet felismerve T-sejt proliferációval válaszol. Az aktivált T-sejtek proliferációját radioaktív timidin beépülésével elemeztük.

4.5.1. A bFcRn tg peritoneális makrofágok és csontvelői eredetű dendritikus sejtek által aktivált T sejt proliferáció

A T-sejt proliferációhoz az APC-ket a 4.4.2-es fejezet szerint készítettük elő. Az IC elkészítés megegyezik a 4.4.1.-es fejezetben leírtakkal. A kísérlethez csak szérumból tisztított IgG-vel hozunk létre IC-t.

A MΦ-kat és a BMDC-ket 96 lyukú plate-be helyeztük $2x10^5$/lyuk sejtszámban és 10 μg/lyuk mennyiségben IC-t, ill szolubilis OVA-t fagocitáltattunk a sejtekkel 1 órán át CO_2 termosztátban, 37°C-on. Ezt követően kimostuk a fel nem vett IC-t és OVA-t, majd a sejtekehez 100 μl/lyuk tápfolyadékot adtunk és további felhasználásig CO_2 termosztátba helyeztük.

4.5.2. A DO11.10 egérből származó T sejtek izolálása

A kísérlethez legalább 10 hetes DO11.10 egerek lépsejtjeit használtuk melyekből negatív szelekcióval mágneses mikrogyöngyök (Miltényi) segítségével nyertük a CD4+ T-sejteket.

A kísérleti állatokat túlaltattuk, majd eltávolítottuk az egerek lépét és lépsejtszuszpenziót készítettünk. A mosási lépések és a vörösvérsejtek lízise után anti-CD8 és anti-CD19 mikrogyöngyök segítségével a gyártó által előírt protokoll szerint tisztíttottuk a CD4+ T limfocitákat.

A tisztított CD4+ T sejteket $4x10^6$/ml sejtszámra állítottuk be tápfolyadék segítségével, majd 100 μl/lyukanként hozzámértük a kezeletlen, IC-t ill. OVA-t fagocitált APC-kre. A proliferáció negatív kontrolljaként kezeletlen, míg pozitív kontrolljaként ConA-val (Concanavalin A, Sigma-Aldrich) (10 μg/ml) kezelt T-sejteket használtunk.

Ezt a kultúrát CO_2 termosztátba helyeztük és folyamatosan figyelemmel kísértük a proliferáció megjelenését. Kb 24-32 óra elteltével már erőteljes proliferációs csomók alakultak ki. Ezért 24 óra múlva hozzáadtuk a kultúrához triciál-timidint, amelynek

beépülés mértéke egyenes arányban van a proliferáció hatékonyságával. A radioaktív timidint 12 órán keresztül hagytuk a kultúrán, majd -70^{o}C-ra helyeztük a sejteket és mérésig ott tároltuk. A triciál-timidin beépülését beütészám (CPM) alapján határoztuk meg. A kísérlet három független mérésben ismételve lett.

4.6. Az Fcγ receptor, MHC II és a kostimulátor molekulák expressziójának összehasonlítása vt és bFcRn tg egerekből származó sejteken

A kísérlethez vt és tg BMDC-ket használtunk a proliferációs tesztnél leírtak szerint (4.5.1.-es fejezet). Mivel a proliferációs teszt 36 órán keresztül zajlott, így a BMDC kostimulátor molekula és MHC II expresszió változását is 36 óra elteltével követtük nyomon.

A BMDC-k kostimulátor molekula expresszióját allofikocianinnal konjugált anti-mouse CD80 és CD86 (eBioscience) antitestekkel ellenőriztük, míg az MHC II expressziót PE-konjugált anti-MHCII (I-A/I-E) (eBioscience) antitesttel.

Az Fcγ receptor vizsgálatot 1 óra IC, ill szolubilis OVA fagocitózist követően áramlási citofluorimetriával vizsgáltuk. Az expressziós változást A647-konjugált K.931-vel detektáltuk, mely mindhárom Fcγ receptorhoz képes kapcsolódni. Kontrollként A647-vel konjugált IgG3-at használtunk. A kísérletek három egymástól független mérésben ismételve lettek.

4.7. Oldatok, sejttenyésztő médiumok

PBS:

A fiziológiás foszfát puffer (PBS) 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,4 g/l $Na_2HPO_4.H_2O$ és 0,2 g/l KH_2PO_4 pH 7,4 kémhatású vizes oldat.

FACS PUFFER

1 % FCS és 0,1 % Na-azid tartalmú PBS

GKN

A glükóz-kálium-nátrium puffer (GKN) 0,4 g/l KCl, 8 g/l NaCl, 1,77 g/l$Na_2HPO4.2H_2O$, 0,69 g/l $NaH_2PO4.H_2O$, 2 g/l glükóz és 10 mg/l fenolvörös vizesoldata.

RPMI-1640 + 10 % FCS + MeOH

Az RPMI tápfolyadék a RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich Company) a gyártó útmutatásai alapján kiegészítve 10 % FCS-sel és 50 μM 2-merkaptoetanollal, 2 g/l $NaHCO_3$, 110 mg/l nátrium-piruvát, 292 mg/lL-glutamin, aminosavak, 0,1 g sztreptomicin, 60 mg/l penicillin és vitaminok és esszenciális aminosavak hozzáadásával.

TBE puffer

Tris-borát-EDTA puffer: 54g/l Tris, 27,5g/l borsav 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0) vizes oldata

5. Eredmények

5.1. A nyúl FcRn (rFcRn) α-lánc expressziója nyúl eredetű peritoneális makrofágokban és neutrofil granulocitákban

A nyulak kiemelkedő jelentőséggel bírnak a monoklonális, illetve a poliklonális antitestgyártásban. Mivel a bFcRn transzgén egér nagy hatékonysággal védi meg az IgG-t a lebomlástól (Bender et al. 2007), ill. nagyobb számú antigén-specifikus B-sejtet termel (Cervenak et al. 2011), valamint nagyobb mértékű humorális immun diverzitással rendelkezik (Vegh et. al. 2012) ezért a bFcRn transzgén egér kísérletek mellett, munkacsoportunkban egyre nagyobb figyelmet kapott a nyúl FcRn karakterizálása, valamint egy FcRn-t nagyobb mértékben kifejező nyúlvonal létrehozása. A nyúl FcRn (rFcRn) karakterizálása során kiderült, hogy nemcsak hasonló a szerkezete az eddig megismert FcRn molekulákhoz, de hasonló szövetekben is expresszálódik (vese, máj, tüdő, placenta, nyirokcsomó, lép, agy, uterus. ovárium, placenta szikzacskó). Funkcionális analízise kapcsán kiderült, hogy hasonlóan a többi FcRn-hez pH dependens módon köti az IgG-t. A létrehozott bFcRn transzgén nyulak, hasonlóan a tg egerekhez, fokozott immunválasszal rendelkeznek, fokozott az antigén specifikus IgG ellenanyagok mennyisége és az antigénspecifikus ellenanyagot termelő B-sejtek száma immunizálásukat követően (Catunda Lemos et. al. 2012).

A sejtes elemek közül a peritoneális makrofág és vérből izolált neutrofil granulociták képezték elsősorban vizsgálataim tárgyát. Az alábbiakban ezeknek az eredményeit tárgyalom.

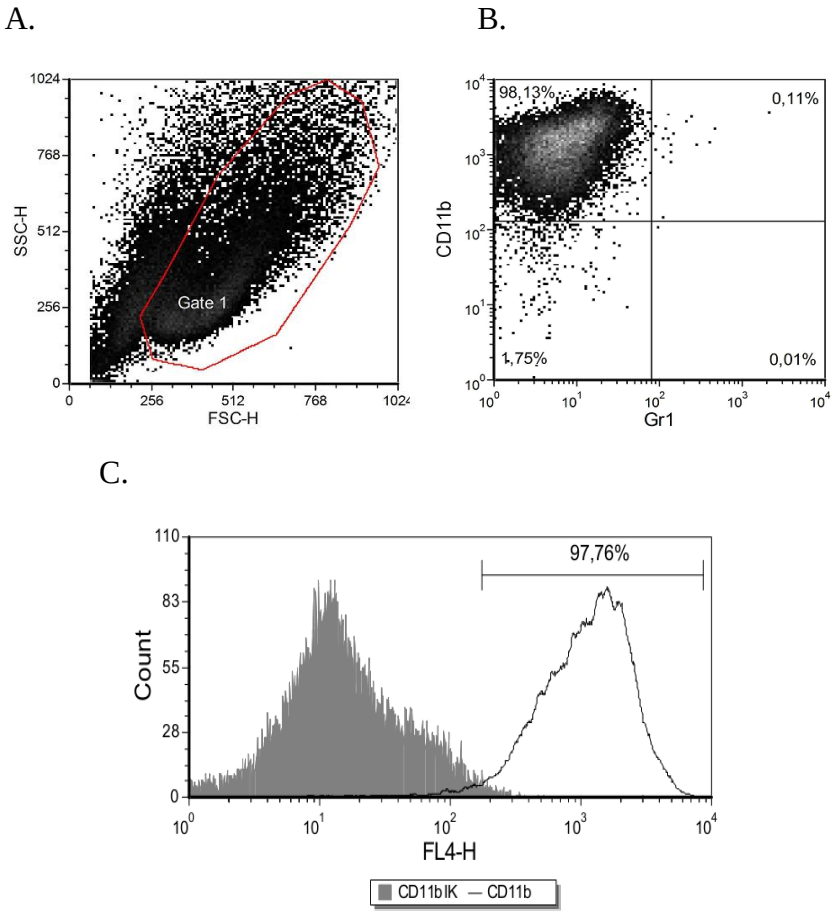
5.1.1. Nyúl peritoneális makrofág izolálása és tisztaságának ellenőrzése

A nyúlból kinyert peritoneális makrofágok tisztaságát FACS elemzéssel ellenőriztük, Alexa-647 anti mouse CD11b antitest felhasználásával. A kiértékelés során előbb az élő sejtpopulációra kapuztunk, majd meghatároztuk a CD11b+ sejtek arányát (14. ábra).

A hasüregből kimosott sejtek több mit 95%-a CD11b+ -nak bizonyult. CD11b-re nézve pozitívak a neutrofil granulociták is, azonban az anti-mouse Gr1 antitestünk nem

mutatott keresztreakciót a nyúl Gr1-vel és a forgalomban sem található olyan antitest, mely a nyúl Gr1-et felismerné. Viszont a tioglikoláttal történő oltás elsősorban a makrofágokat vonzza a hasüregbe, így az egér eredményeinkkel összehasonlítva (ld. később) kijelenthető, hogy a 95% feletti CD11b pozitív sejtek elsősorban peritoneális makrofágnak tekinthetők.

Hasonló okok miatt a vérből izolált neutrofil granulociták tisztaságát sem tudtuk elemezni.

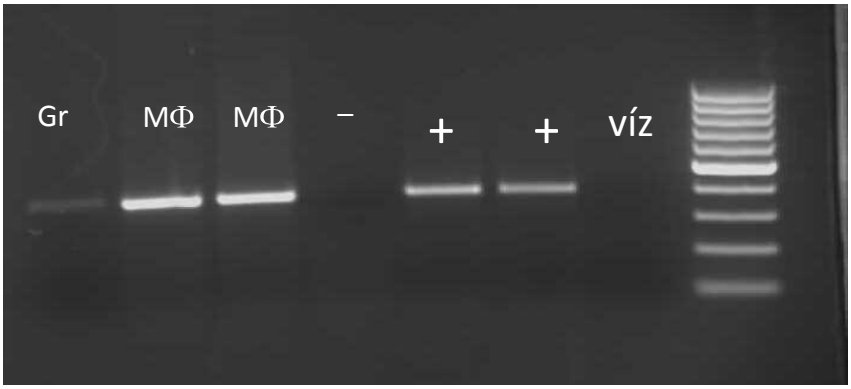


14. ábra: A nyúl peritoneális makrofág preparátum tisztaságának ellenőrzése:
A: kapuzás az élő sejtekre, B: CD11b/Gr1 dot plot az élő sejtekből, C: CD11b hisztogram: szürkével az izotípus kontroll látható, míg feketével a specifikus jel.

5.1.2. A nyúl FcRn detektálása RT-PCR módszerrel

A hasüregből kimosott peritoneális makrofágokból és a vérből izolált neutrofil granulocitákból RNS-t izoláltunk, majd RT-PCR segítségével cDNS-sé írtuk át. Ezt

követően rFcRn specifikus primerek segítségével detektáltuk a 380 bp hosszúságú amplikont (15. ábra). Pozitív kontrollként nyúl lépsejt szuszpenzióból, míg negatív kontrollként egér lépsejt szuszpenzióból izolált RNS-t, majd az ebből átírt cDNS-t használtuk. Markerként 100 bp-os DNS létrát használtunk. Látható, hogy mind a peritoneális makrofágból mind a vérből izolált neutrofil granulocitából sikerült kimutatni a rFcRn expressziót.



15. ábra: Nyúl FcRn α láncának detektálása nyúl peritoneális makrofágokból és vérből izolált neutrofil granulocitákból: (az átírt amplikon mérete 380 bp hosszúságú) (Gr-neutrofil granulocita, MΦ-peritoneális makrofág)

5.2. A bFcRn kimutatása egér immunsejtekben

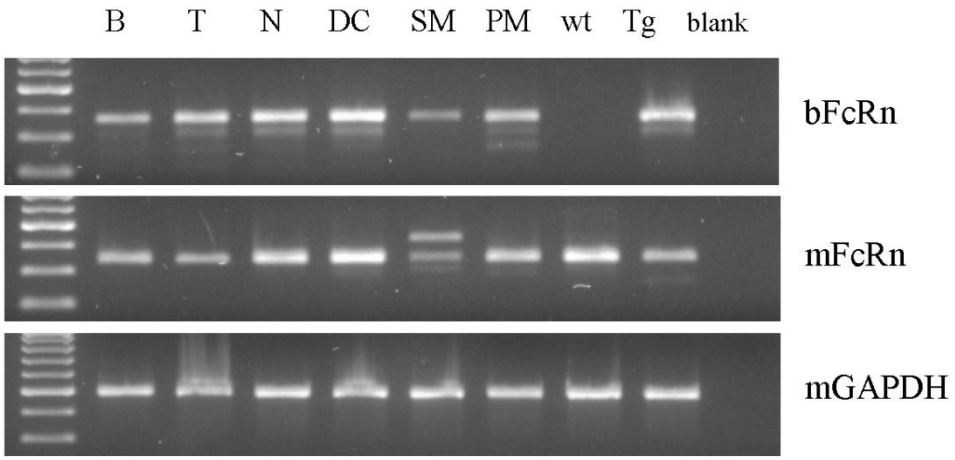
5.2.1. Egér immunsejtek izolálása PCR analízis céljára

A vizsgálni kívánt celluláris immunrendszer folyamataiban résztvevő sejtek funkcionális analízise előtt szerettünk volna meggyőződni arról, hogy az extra kópiában bFcRn-t hordozó egerek kifejezik-e sejtspecifikusan is a bFcRn-t. Ehhez FACSAriaIII Cell Sorter berendezés segítségével lépsejt szuszpenzióból immunsejteket válogattunk szét: T sejtet, B sejtet, dendritikus sejtet, makrofágot és granulocitát. Majd a sejtekből RNS-t izoláltunk. Hasonlóan jártunk el a peritoneális makrofágok esetében is. Szortírozásra ez esetben azért volt szükség, hogy a tioglikolát oltás után a peritoneumból kimosott minimális mennyiségű neutrofil granulocita ne zavarhassa a makrofágokból történő bFcRn detektálást.

5.2.2. A bFCRn detektálása immunsejtekből RT-PCR-el

A sejtekből kinyert RNS-t cDNS-é írtuk át, majd kétlépéses PCR-t alkalmazva specifikus bFcRn primerek segítségével detektálni tudtuk a 366 bp hosszúságú amplikont. A reakció pozitív kontrolljaként bFcRn tg egér lépsejt szuszpenziót, míg negatív kontrollként wt egér lépsejt szuszpenziót használtunk.

Expressziós kontrollként egér FcRn-t (mFcRn) (339 bp hosszúságú amplikon) és egér GAPDH-t (mGAPDH) (495 bp hosszúságú amplikon) használtunk. Az egyes amplikonok méretét 100 bp-os DNS létra párhuzamos futtatásával ellenőriztük (16. ábra).



16. ábra: bFcRn kimutatás egér lépsejtekből és peritoneumból izolált makrofágokból
(az áttírt amplikon mérete: bFcRn 366bp, mFcRn 339bp, mGAPDH 495bp)
(B: B limfocita, T: T limfocita, N: neutrofil granulocita, DC: dendritikus sejt, SM-lép makrofág, PM-peritoneális makrofág, wt- vad típusú egér lépsejtszuszpenzió, Tg: tg egér lépsejtszuszpenzió, blank: víz)

5.3. A bFcRn transzgén egerekből származó peritoneális makrofágok és csontvelői dendritikus sejtek fagocitózisa fokozott mértékű a kontroll egerekből származó sejtekhez viszonyítva

5.3.1. A peritoneális makrofágok ovalbumint és OVA-specifikus IgG-t tartalmazó immunkomplex fagocitózisa

Első körben a bFcRn tg egerekből származó MΦ-k fagocitáló képességét vizsgáltuk OVA-OVA-specifikus IgG-t tartalmazó szérummal létrehozott IC-vel, majd szérumból tisztított OVA-specifikus IgG-t tartalmazó OVA-IgG IC-vel.

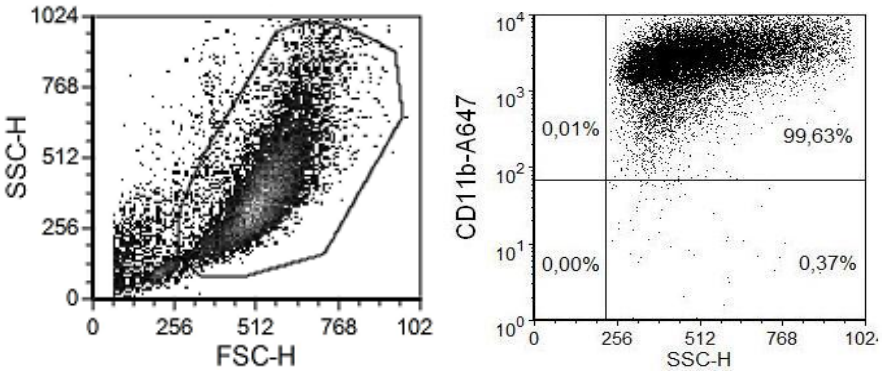
5.3.1.1. Fagocitózis teszt ovalbumint és OVA-specifikus IgG-t tartalmazó szérummal létrehozott immunkomplexszel

Első lépésként egy, a munkacsoportban már korábban használt protokollal szerettük volna megvizsgálni, hogy a bFcRn transzgén egerek hasüregéből nyert peritoneális makrofágok, a neutrofil granulocitákhoz hasonlóan (Cervenak et. al. 2011) rendelkeznek-e fokozott fagocita funkcióval. Ehhez A488-val jelölt ovalbumin és OVA-specifikus IgG-t tartalmazó szérum segítségével immunkomplexet hoztunk létre, majd a peritoneális MΦ-hoz adva 30-60-90-120 perc inkubációt követően, áramlási citométer segítségével ellenőriztük a felvett IC mennyiségét.

Az egerekből kinyert peritoneális MΦ-ok tisztaságát FACS analízissel ellenőriztük A647 konjugált anti-mouse CD11b antitest és PE konjugált anti mouse Gr1 segítségével. A kiértékelés során előbb kapuztunk az élő sejtpopulációra, majd ezen belül megnéztük a CD11b pozitív sejtek %-os arányát. A hasüregből kimosott sejtek 95% feletti pozitivitást mutattak CD11b-re és elhanyagolható mennyiségű granulocitát tartalmaztak (17. ábra).

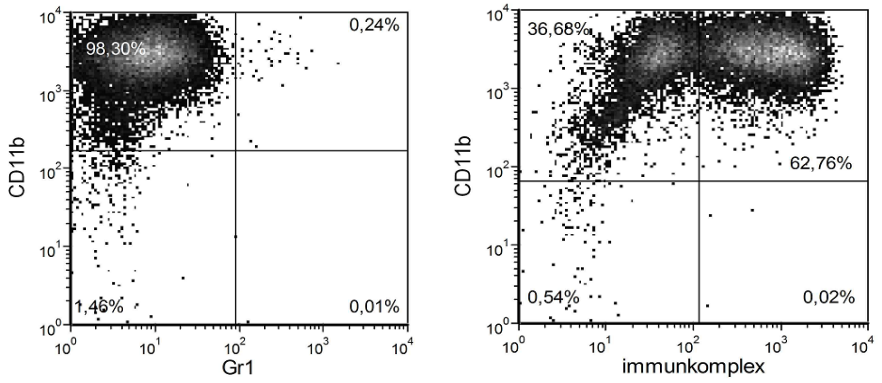
A FACS elemzés során elkülönítettük a sejtfelszíni marker alapján a makrofágokat. Mivel elhanyagolható mennyiségű granulocita volt mérhető (18.A ábra) ezért a B. ábrán látható CD11b/IC dot plot is értelmezhető, amivel jól tudtuk követni a makrofágok immunkomplex (IC) felvételét. A 18.C ábrán a CD11b+Gr1- sejtek IC felvétele látható.

A. B.

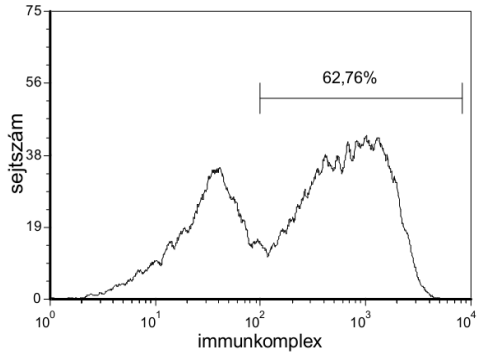


17. ábra: Peritoneális makrofágok tisztaságának ellenőrzése:
A: élő sejtpopulációra kapuzás; sejttörmelék negatív kapuzása; B: élő sejtek CD11b pozitív arányának ellenőrzése

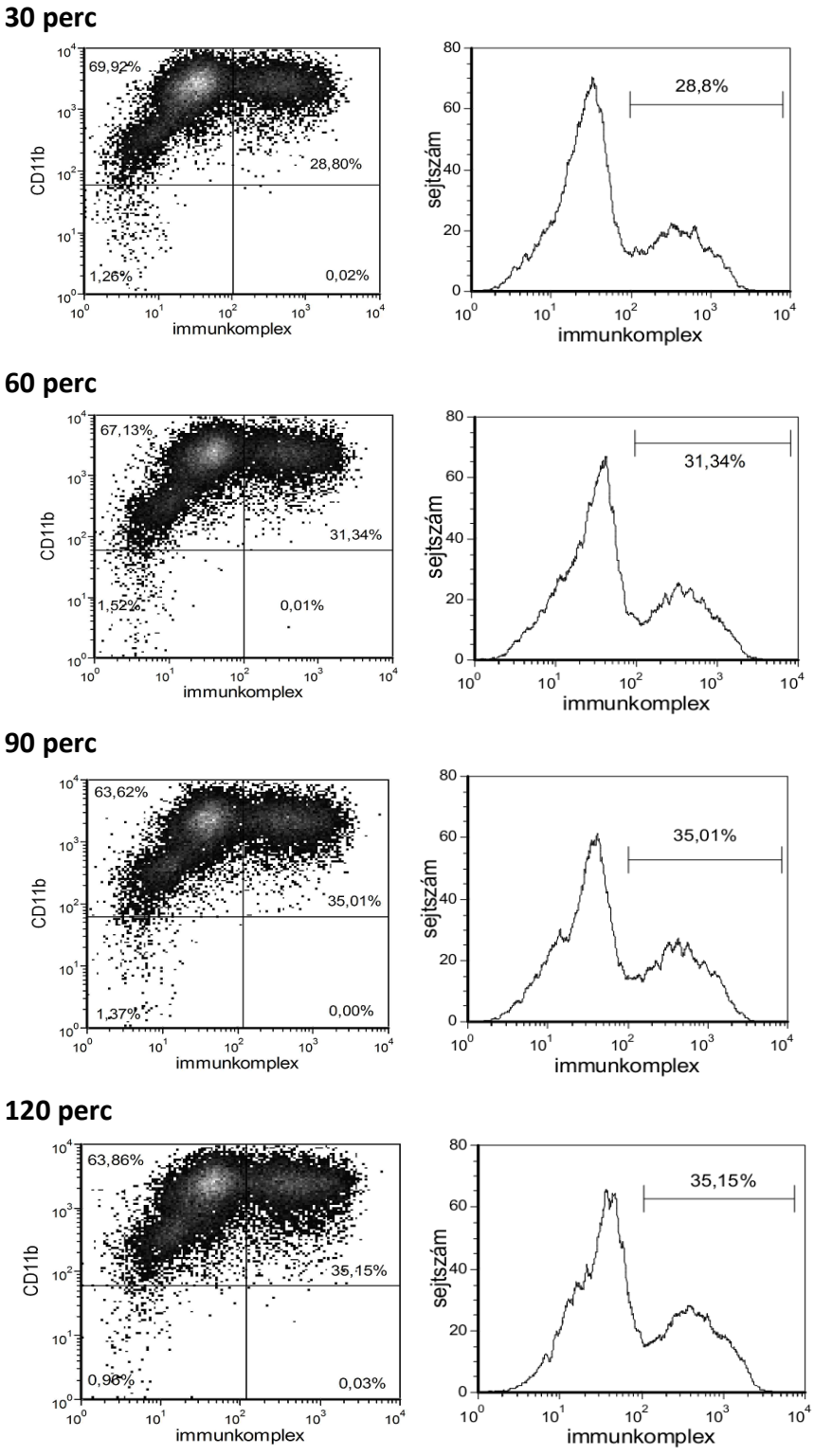
A. B.



C.



18. ábra: A peritoneális sejtek tisztasága és IC felvételének ábrázolása:
A: makrofág tisztaság ellenőrzése CD11b és Gr1 antitestekkel. B: CD11b+ sejtek IC felvétele dot ploton ábrázolva. C: CD11b+/Gr1- sejtek immunkomplex felvétele hisztogrammon ábrázolva



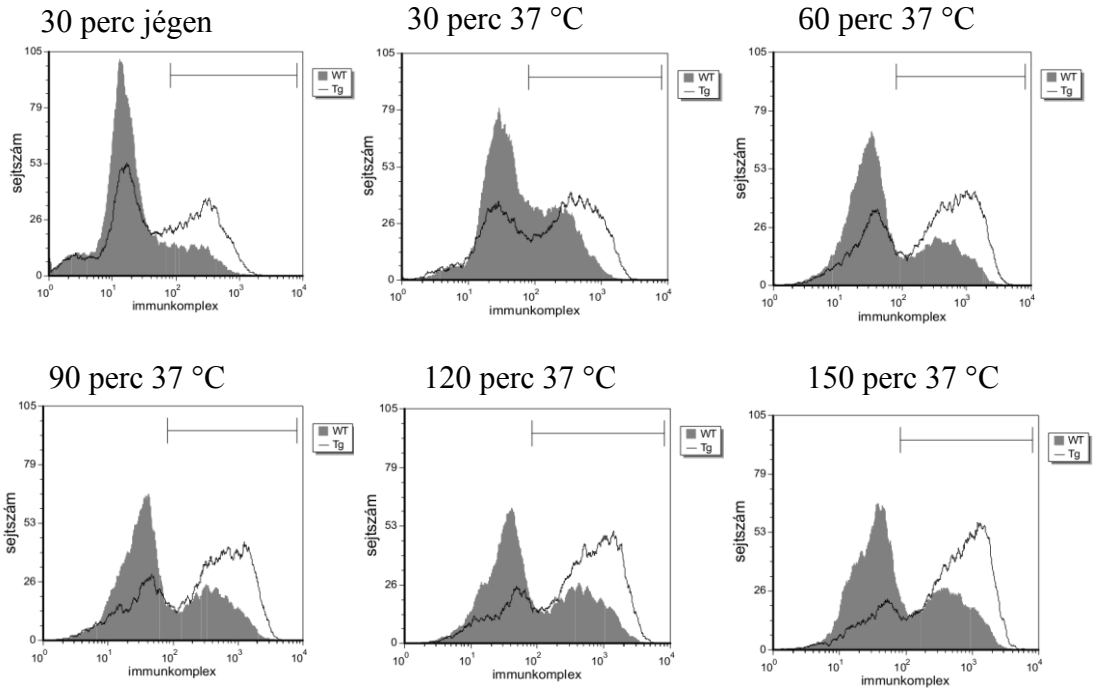
19. ábra: A peritoneális MΦ-ok IC felvételének időkinetikája

Az alkalmazott ábrázolásmódnak köszönhetően látványosan megmutatkozott a peritoneális MΦ-k hatékony IC felvétele az idő előrehaladtával. A 19. ábrán ezt

demonstrálván mutatunk be négy időpontot, ahol 30-60-90-120 perc inkubálási idő elteltével vizsgáltuk egy vad típusú egérből származó peritoneális MΦ IC-t fagocitáló képességét.

A 19. ábra demonstratív jellegű, minden esetben hasonló módon vizsgáltuk a felvett IC mennyiségét és hasonló eredményt kaptunk.

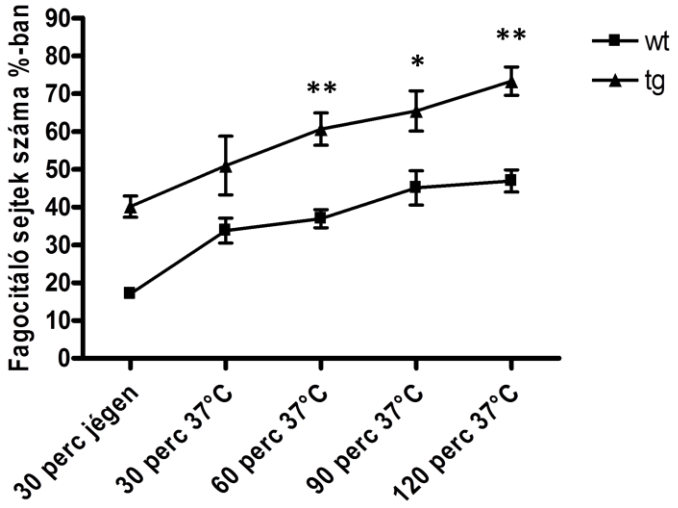
Mind a vad mind pedig a bFcRn tg egerekből nyert adatokat ennek megfelelően értékeltük, majd a két egérből származó értékeket összevetettük és megállapítottuk a bFcRn tg egérből származó periMΦ-ok fagocita funkciójának hatékonyságát (20. ábra).



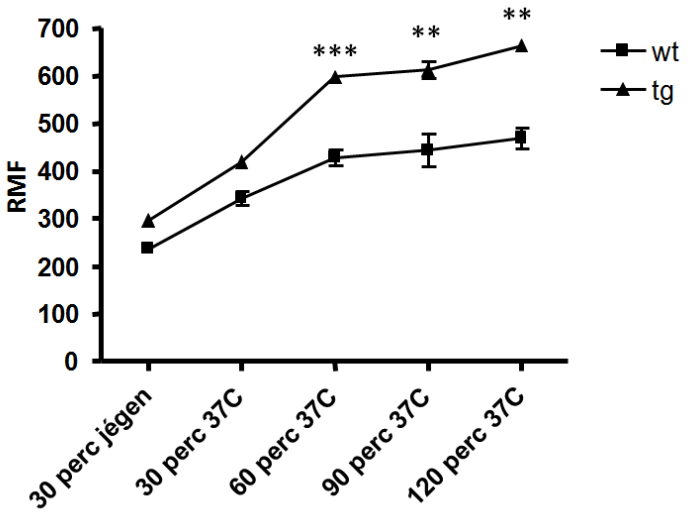
20. ábra: A tg és vt makrofágok IC felvételének összehasonlítása
Mind a hat ábrán jól elkülöníthető két csúcs. Az első csúcs a negatív fluoreszcencia intenzitású sejteket, vagyis a nem fagocitáló makrofágokat mutatja, míg a második csúcs a fagocitáló sejteket. Az idő elteltével egyre több tg makrofág fagocitál (nő a második csúcs) és ezek nagyobb mennyiségben vesznek fel immunkomplexet (második csúcs jobbra tolódása) a vt makrofágokhoz képest.

Az 20. ábra alapján megállapítható, hogy bFcRn tg egerekből származó peritoneális MΦ-ok az idő előrehaladtával egyre nagyobb mértékben képesek az IC felvételére.

Nemcsak több sejt vesz fel IC-t (nő a görbe alatti terület) hanem az egy sejtben lévő IC mennyisége is több (nő a fluoreszencia intenzitása) a vad típusú kontrollhoz képet. Ezeket az adatokat számszerűsítve a 21 és 22. ábra szemlélteti.



21. ábra: A tg és vt egérből származó fagocitáló makrofágok számának %-os ábrázolása az idő függvényében: a fagocitózis kinetikája hasonló, azonban nagyobb számú tg makrofág fagocitál. A diagramm három párhuzamos minta átlagát mutatja ± SD (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001)



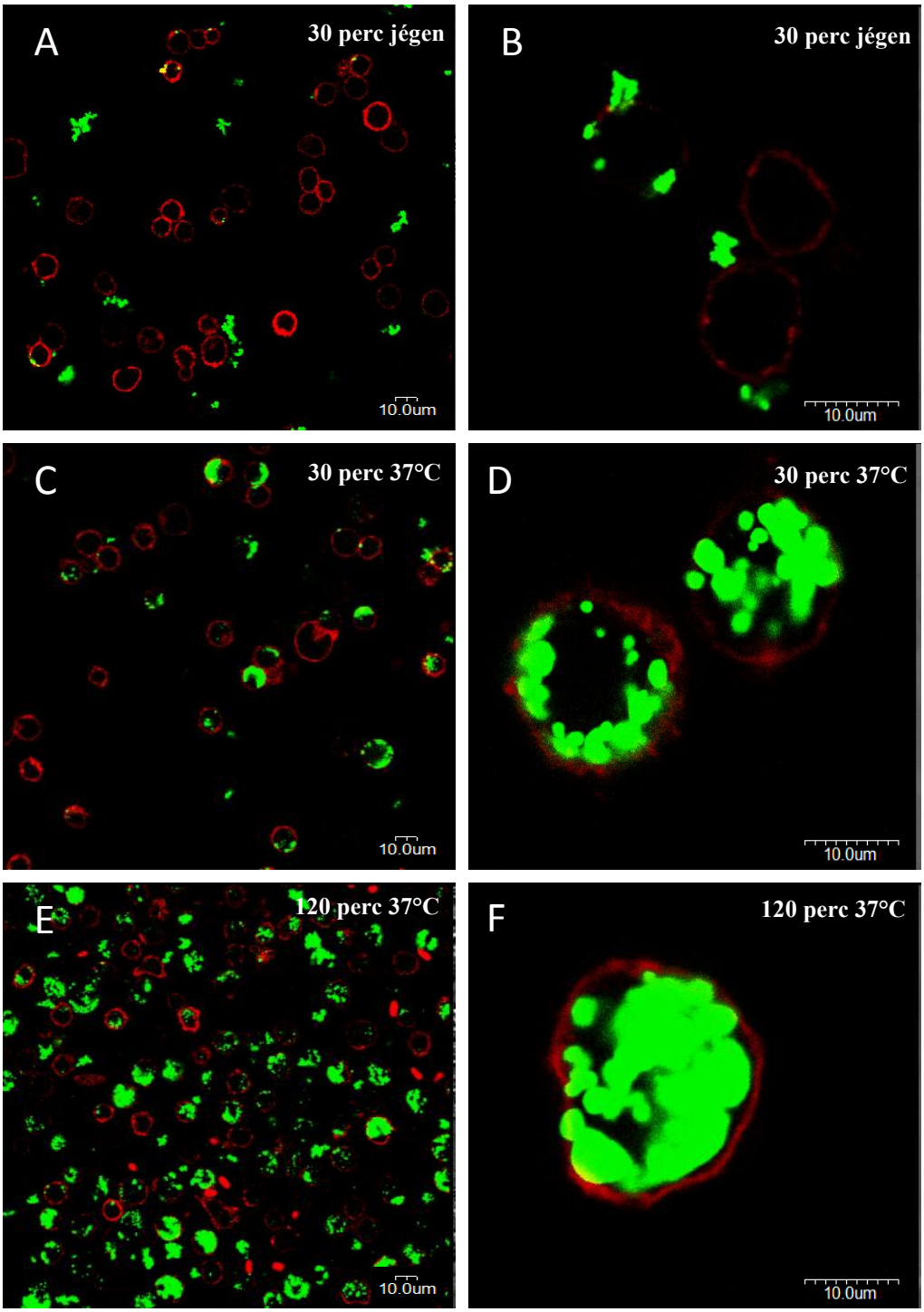
22. ábra: A tg és vt egérből származó makrofágok immunkomplex felvétele
A tg állatokból származó makrofágok hatékonyabb fagocitózisa állapítható meg. A legnagyobb változás a 30. és 60. perc között tapasztalható. A diagramm három párhuzamos minta átlagát mutatja ± SD (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001)

A 20. ábrán bemutatott eredményeket táblázatban összefoglalva (3-3 állat alapján) elmondható, hogy a tg és vt egérből származó makrofágok hasonló sebességgel fagocitálnak (21. ábra), azonban tg állatok esetén több makrofág vesz részt a folyamatban.

Az átlagos fluoreszencia intenzitás (RMF) megadja számunkra, hogy átlagosan mennyi IC-t vett fel egy sejt (22. ábra). A tg egerekből származó makrofágok az idő elteltével több IC-t fagocitálnak. A legnagyobb fagocitózisbeli különbség 30, ill. 60 perc 37°C-on következik be. A folyamat elején nincs jelentős különség a fagocitált IC mennyiségében a tg és vt állatokból származó sejtek esetén.

A FACS analízis során mért fluoreszcens jel önmagában nem informatív arra nézve, hogy a mért jel a sejt belsejéből, vagy a felszínéről származik-e. Erre dolgozták ki az ún. „quenching" technikát, melynek során tripánkék segítségével teljesen ki lehet oltania sejt felszínéről származó jeleket, így a mért fluoreszcens jel csak a sejt belsejéből származhat. Ez a módszer azonban nem alkalmazható Alexa festékek esetén, ezért minden időpontban a sejtekről konfokális lézerpásztázó mikroszkópiával felvételt készítettünk, hogy el tudjuk dönteni, hogy a FACS analízissel mért fluoreszencia értékek a sejt külső felszínéről vagy belsejéből származnak-e (23. ábra). Jól látható a 23.C és D ábrán, hogy az IC a sejt belsejében helyezkedik el 30 percnél, ill. 120 percnél is (23. E és F ábra) és ez általánosan elmondható a többi mérési időpontban mért eredményre. A 30 percet jégen töltő kontroll mintánál azonban csak sejtfelszíni kötődést látunk (23.A ábra). Ez a fagocitózis kontrollja, hiszen a jégen csak az Fcγ receptorokon át történő sejtfelszíni kötődést lehet detektálni. Ez a sejtfelszíni kötődés minden időpillanatban megtalálható, így a kontroll mintához képest mért jelintenzitás növekedés fogadható csak el fagocitózisnak. Az ábrák tg típusú egér peritoneális MΦ-ról készült, de hasonlót tapasztaltunk vt peritoneális MΦ-ok esetén is

A 23. B.D.F ábrán nyomon követhető, ahogy a peritoneális MΦ-ok egyre több IC-t fagocitálnak, mígnem elérnek egy pontot, ami után már nem képesek több IC fagocitálásra.



23. ábra: A peritoneális MΦ**-ok IC fagocitózia konfokális mikroszkóppal:**
Az A és B ábra: 30 perc jégen, C és D ábra 30 perc 37°C-on, E és F ábra 120 perc 37°C-on. Az A, C és E ábrák 512x512-es nagyításban, míg a B, D és F ábrák digitális zoom-val készültek. Pirossal a CD11b sejtfelszíni jelölés látható, míg zölddel az immunkomplex.

Összefoglalva elmondható, hogy a bFcRn tg állatokból származó peritoneális MΦ-ok fokozott fagocita funkcióval rendelkeznek a kontroll állatokhoz képest. Azonban a

vizsgálataink során feltételeztük, hogy a fagocitózis az FcγR-okon történő sejtfelszíni kötődés után kapcsolódik az FcRn-hez. Viszont nem szabad megfeledkezni arról, hogy a vizsgálathoz használt IC teljes szérumból készült, ami a komplement komponensek miatt, ill. egyéb szérumban lévő fehérjék miatt zavarhatják a méréseinket. Ennek kiküszöbölése feltétlen szükséges volt. Ahhoz, hogy ki lehessen jelenteni, hogy az előbbiekben bemutatott különbség a bFcRn overexpressziójának köszönhető, vizsgálatainkat hőinaktivált szérumból tisztított IgG-vel létrehozott immunkomplexszel is szükséges volt megismételni.

5.3.1.2. Fagocitózis teszt szérumból tisztított OVA specifikus IgG-t tartalmazó immunkomplexszel

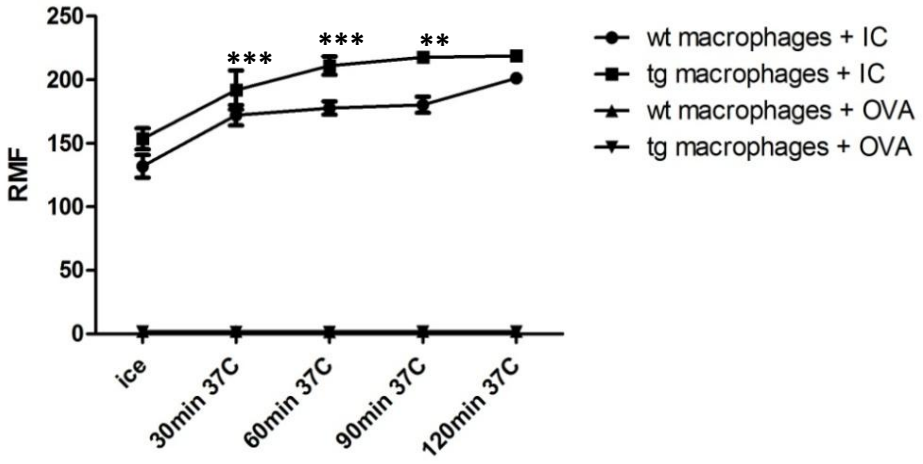
Az IgG tartalmú IC-hez a szérumban lévő C3 komplementkomponens kötődni képes. Az antigén-antitestet és C3 fragmentumot tartalmazó IC-t a makrofágok és dendritikus sejtek CR3 és CR1 receptoraik segítségével hatékonyan fagocitálják. Ahhoz, hogy a komplement komponensek indukálta fagocitózist elkerüljük, hőinaktivált szérumból tisztított IgG-t tartalmazó IC-t használtunk. A hőinaktiválást az indokolta, hogy a komplement komponensek már a szérumban hozzá tudnak kötődni a számunkra fontos IgG molekulákhoz, viszont a hőinaktiválás inaktiválja ezeket a fehérjéket. További bizonyítékként, hogy valóban az IgG –vel kapcsolódni tudó FcRn játszik szerepet a folyamatban, kontrollként szolubilis OVA-t fagocitáltattunk a sejtekkel.

A vad típusú és bFcRn tg egereket a fent leírtakkal megegyezően, tioglikoláttal történő oltást követően, a 4. nap dolgoztuk fel. A hasüregből nyert sejtekkel fluoreszceinnel jelölt ovalbumint és hőinaktivált OVA-specifikus IgG-t tartalmazó szérumból nyert IgG-ből létrehozott OVA-IgG IC-t, ill szolubilis jelölt ovalbumint fagocitáltattunk 30, 60, 90 ill 120 percen keresztül. A felvett IC mennyiségét citofluoriméterrel követtük nyomon a fluoreszceinnel jelölt IC sejtben történő intenzitás növekedés alapján. A peritoneális MΦ-ok tisztaságának meghatározása és az IC felvétel nyomon követése megegyezik az előző fejezetben bemutatottakkal.

Az előző kísérlethez hasonlóan, a peritoneumból származó sejtek túlnyomó többsége (95-99%-a) CD11b+/Gr1- sejtnek bizonyult. Konfokális mikroszkópia segítségével megállapítottuk, hogy a kapott IC jelintenzitás a sejt belsejéből származik. Így a

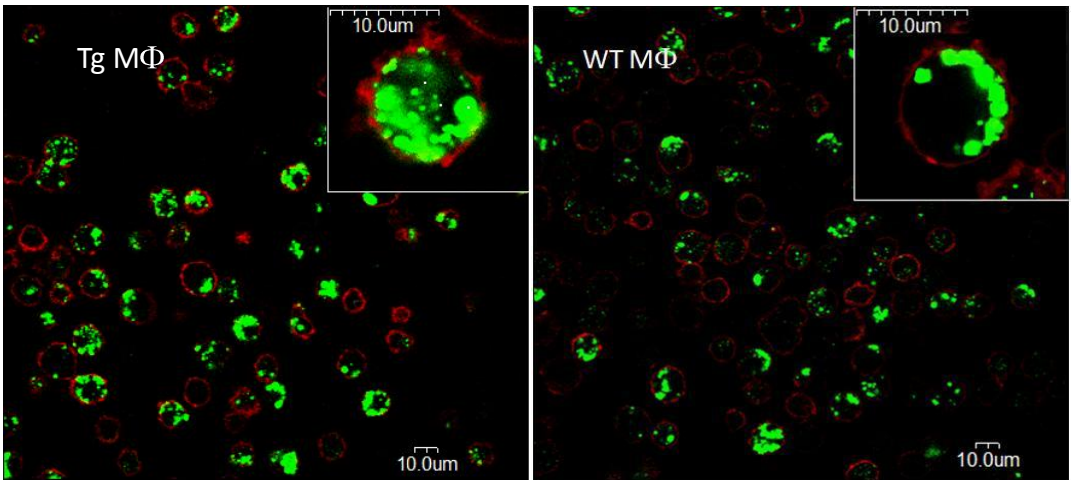
továbbiakban bemutatott eredmények peritoneális MΦ-ok IC fagocitáló képességét mutatják.

Eredményeink szerint a bFcRn tg egerek makrofágjai (24. ábra) hatékonyabb fagocitótikus tulajdonsággal rendelkeznek a vt állatokból származó sejtekhez képest, ha az antigént immunkomplex formájában adtuk a sejtekhez. Megállapítottuk azt is, hogy a szolubilis antigén felvétele a tg és a vt állatokból származó sejtek esetében is elhanyagolható, ill. a két állatból származó sejtek között, ebből a szempontból, számottevő különbséget nem tapasztaltunk. Kijelenthető tehát, hogy a bFcRn tg sejtekben mért megnövekedett fagocitózis az FcRn overexpressziójának köszönhető.



24. ábra: A bFcRn tg és vt egerekből származó peritoneális makrofágok fagocitáló képességének vizsgálata szérumból tisztított IgG-ből létrehozott IC-vel
Az ábra három párhuzamos mérési eredmény átlagát mutatja ± SD (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$),

Az IC sejten belüli elhelyezkedését, a korábbi méréseinkhez hasonlóan konfokális mikroszkópiával ellenőriztük. A 25. ábra a 30 perces időpillanatot mutatja be. Látható, hogy az IC a sejtek belsejében helyezkedik el és minden időpillanatban hasonlót tapasztaltunk.



25. ábra: Az IC intracelluláris elhelyezkedésének ellenőrzése konfokális mikroszkópiával 30. percnél tg és vt állatokból származó peritoneális MΦ-on (pirossal a CD11b míg zölddel az IC látható)

5.3.2. A dendritikus sejtek ovalbumint és OVA-specifikus IgG-t tartalmazó immunkomplex fagocitózisa

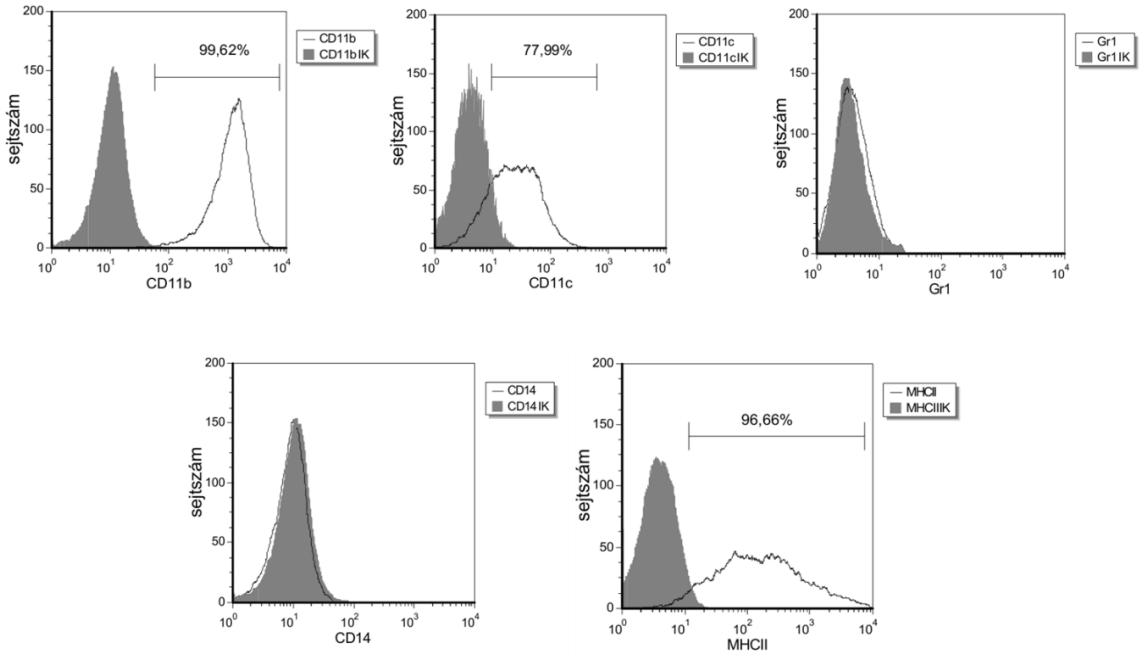
A bFcRn-t overexpresszáló makrofágok fokozott fagocita funkciója arra enged következtetni, hogy ezek a sejtek a felvett antigént gyorsabban/hatékonyabban mutatják be az adaptív immunválasz következő lépcsőjében szereplő T helper sejteknek. Az immunrendszer leghatékonyabb APC-i a dendritikus sejtek, így elengedhetetlen, hogy hogy az antigén prezentációs vizsgálatok előtt ellenőrizzük, hogy a bFcRn tg állatok csonvelejéből differenciáltatott DC-k is rendelkeznek-e hasonlóan fokozott fagocitótikus tulajdonsággal, mint a bFcRn-t overexpresszáló peritoneális MΦ -ok.

A kísérlethez vt és bFcRn tg állatok csontvelői őssejtjeit 7 nap alatt éretlen dendritikus sejtekké differenciáltattuk. A kultúra tisztságát CD11c, CD11b, Gr1, CD14, MHCII markerek segítségével citofluoriméter segítségével ellenőriztük (25. ábra). Mintáinkban a legtipikusabb DC marker, a CD11c, mutatta a legnagyobb szórást ezért az IC követéséhez a kapuzást a CD11b+/MHCII+ sejtekre végeztük el.

Az 26. ábra egy reprezentatív vad típusú egérből differenciáltatott DC kultúra citofluoriméter analízisét mutatja. Hasonló értékeket kaptunk az egy időben végzett tg egér csontvelői őssejtjeiből végzett differenciáltatás során is. A különböző időpontokban felhasznált DC kultúrák értékei eltértek egymástól, azonban granulocita (Gr1+ sejtek) és monocita (CD14+ sejtek) nem-vagy csak minimális mennyiségben volt mérhető a

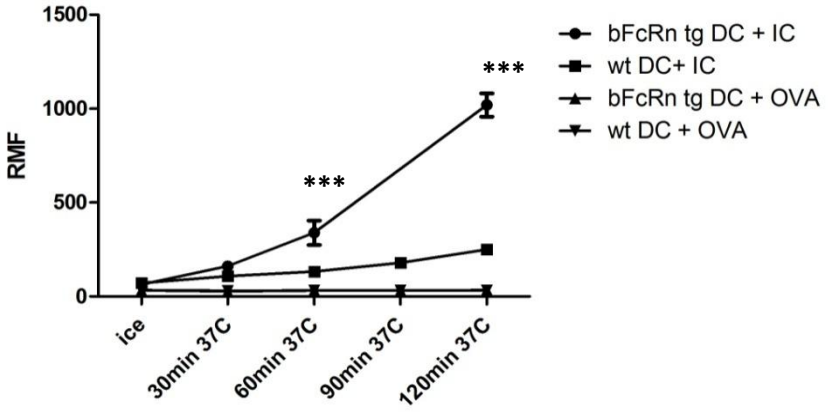
kultúrában. Átlagosan az alábbi eloszlást tapasztaltuk: 96-99%- CD11b+, 50-80% CD11c +, 80-95% MHCII +, 5-6% CD14+, 5-10% Gr1+.

A differenciáltatás során nyert éretlen DC-ket a már a peritoneális MΦ-nál ismertetett módon tisztított IgG-t és jelzett OVA-t tartalmazó IC-el fagocitáltattuk, majd a felvett IC-t a korábbiakban leírtakhoz hasonlóan, különböző időpontokban elemeztük; kontrollként szolubilis OVA-t használtunk.



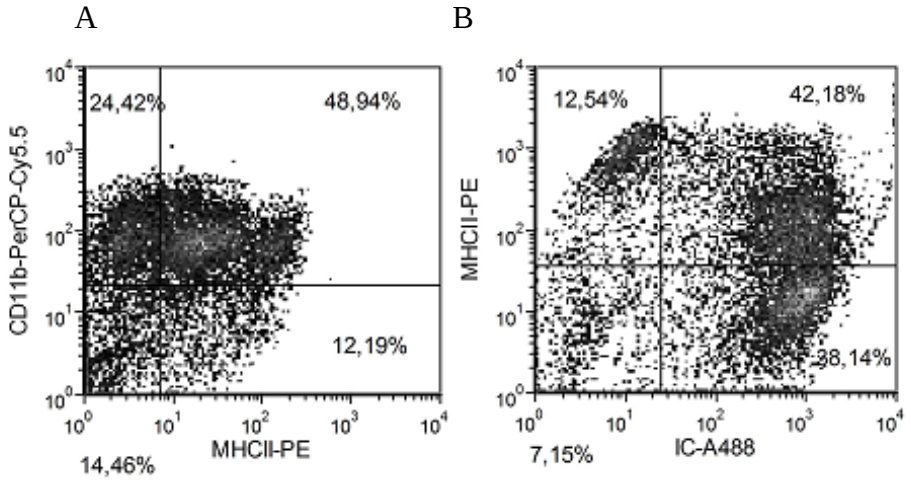
26. ábra: Csontvelőből differenciáltatott vt DC kultúra tisztaságának ellenőrzése: DC marker: CD11b, CD11c, MHCII, Granulocita marker: CD11b, Gr1, Makrofág marker: CD14, CD11b

Eredményeinket a 27. ábra foglalja össze. Megfigyelhető a bFcRn-t overexpresszáló DC-k nagymértékű fagocita funkciója, sőt a 60. és 120. perc között kiugróan megnövekszik a vad típusú kontrollhoz képest. A szolubilis OVA-t sem a vt, sem a bFcRn tg egérből származó sejtek nem vették fel számottevő mennyiségben, ill. a felvett OVA mennyiségében nem volt mérhető különbség a vt és tg állatokból származó DC-k között. A peritoneális MΦ-okhoz hasonlóan, konfokális mikroszkópiával történő elemzésünk az IC-k intracelluláris elhelyezkedését mutatta.



27. ábra: A tg és wt egerekből származó dendritikus sejtek fagocita képességének vizsgálata. Az ábra három párhuzamos minta átlagát mutatja ± SD (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

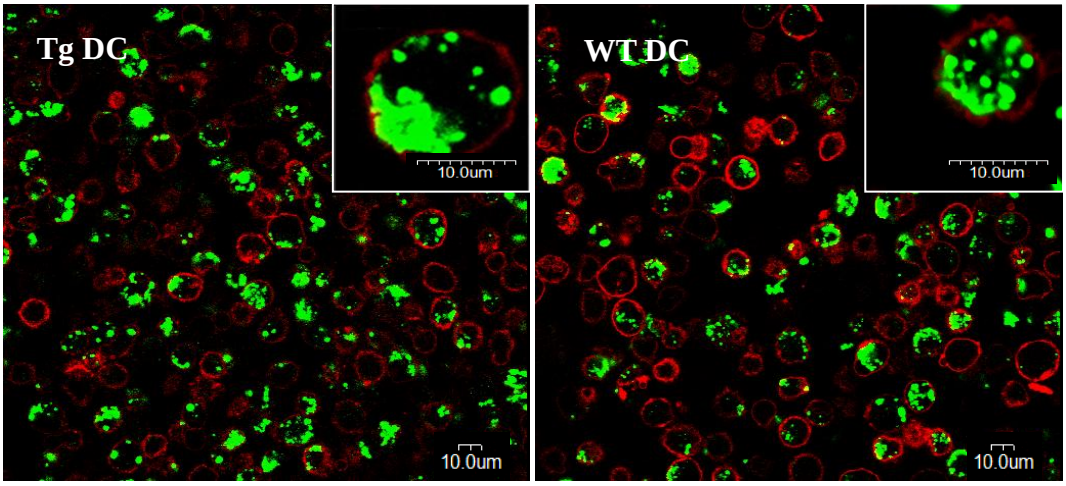
A kiértékelés során megfigyelhető volt az a jelenség, hogy a CD11b+MHCII+ sejtek magas, ill. közepes MHCII expressziót mutatnak (28.A ábra). Az MHCII-t magasan expresszáló, vagyis MHCII^{high} DC sejtpolulációt érett DC-nek nevezzük, és ezek alig, vagy csak csekély mértékben tudtak fagocitálni (28.B ábra). Ennek a sejtpopulációnak a feladata a hatékony antigén bemutatás, azonban fagocita funkcióját az érés során elvesztette (Dudziak et. al. 2007).



,

28. ábra: **Az MHC II^{high} (érett) és MHC II^{medium} (éretlen) DC-k IC fagocitózisa:** A: MHC II+CD11b+ sejtek megoszlása, B: az éretlen DC-k hatékonyan veszik fel a fluoreszcensen jelölt IC-t, míg az érett DC-k nem képesek az IC fagocitálására

Míg az éretlen DC-k, melyek az MHC II-t közepesen expresszálják (MHC II^{medium}) hatékony IC felvételt mutattak. Ezeknek a sejteknek a feladata a folyamatos őrjárat, és a fagocitálás, miközben érett DC-vé válnak - fenotípus változáson mennek át- és hatékony antigen prezentáló sejtekké érnek (Steinman et. al 2012) .



29. ábra: Az IC fagocitózis ellenőrzése konfokális mikroszkópiával 60. percnél bFcRn tg és vt állatokból származó BMDC-ken (pirossal MHC II, míg zölddel az IC látható)

Az intracelluláris lokalizációt konfokális mikroszkópia segítségével ellenőriztük. A 29. ábra a 60 perces inkubálást követően mutatja be a sejtek által fagocitált IC mennyiségét. Látható, hogy az IC a sejtek belsejében helyezkedik el; ehhez hasonló lokalizációt tudtunk megfigyelni a többi időpontban is.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a bFcRn tg egerek BMDC-i és peritoneális MΦ-jai nagyobb mértékű IC felvételére képesek, azaz fokozott fagocitózis hatékonyságú, mint a kontroll állatokból származó sejtek. Ez azt is jelentheti, hogy amennyiben ezek az immunkomplexek a lizoszómába kerülnek, nagyobb mértékű lesz az antigénből származó peptidek MHC II-n keresztül történő prezentációja, ill. ez maga után vonhatja a T helper sejtek proliferációjának fokozódását is. Ennek vizsgálatára végeztük el a T sejt proliferációs tesztet, peritoneális MΦ és BMDC, ill. antigen specifikus T helper sejtek felhasználásával.

5.4. A T sejt proliferáció elemzése bFcRn transzgén egerekből származó professzionális antigén prezentáló sejtek hatására

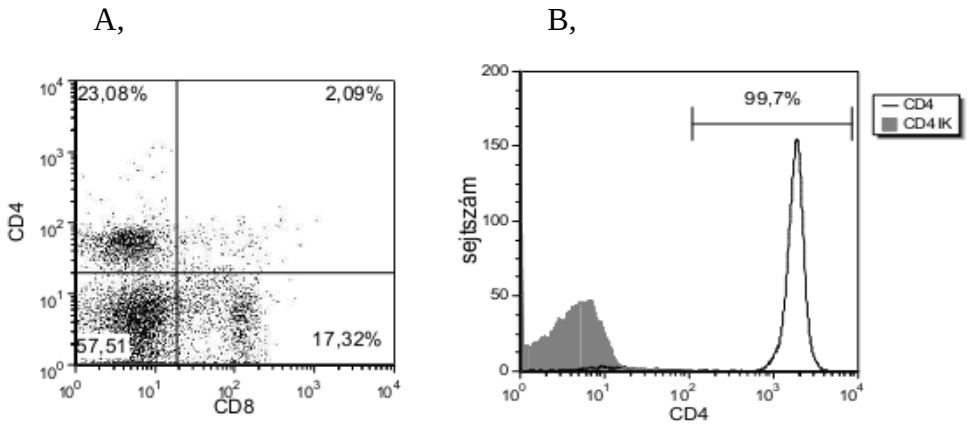
A közelmúltban igazolták, hogy az FcRn képes az IC-ket a lizoszómákba irányítani a dendritikus sejtekben, és ezáltal fokozza az antigén prezentációt (Mi et al., 2008, Qiao et al., 2008; Baker et al. 2011). Kísérleteik során FcRn KO egerekből származó DC-vel dolgoztak, ahol a DC-k csökkent antigénbemutató képességét állapították meg a kontroll állatokhoz viszonyítva. Vizsgálataink során kérdésként vetettük fel, hogy a fokozott fagocitózis mellett a bFcRn overexpresszió fokozza-e a bFcRn tg egerekben az antigén specifikus T helper sejt proliferációt. Ennek vizsgálatára vt és tg egerek hasüregéből kimosott peritoneális makrofágokat és csontvelőből differenciáltatott dendritikus sejteket használtunk. A sejtekkel szérumból tisztított IgG-vel létrehozott IC-t fagocitáltattunk, majd antigénspecifikus T helper sejtek proliferációján keresztül (DO11.10 OVA TCR TG egér) vizsgáltuk az APC-k antigénbemutató tulajdonságát.

5.4.1. A T-sejt proliferáció indukciója makrofággal

A kísérleti rendszer alapjai a fagocitózisban elért eredmények, így célszerű volt a már meglévő beállításokra építkezni.

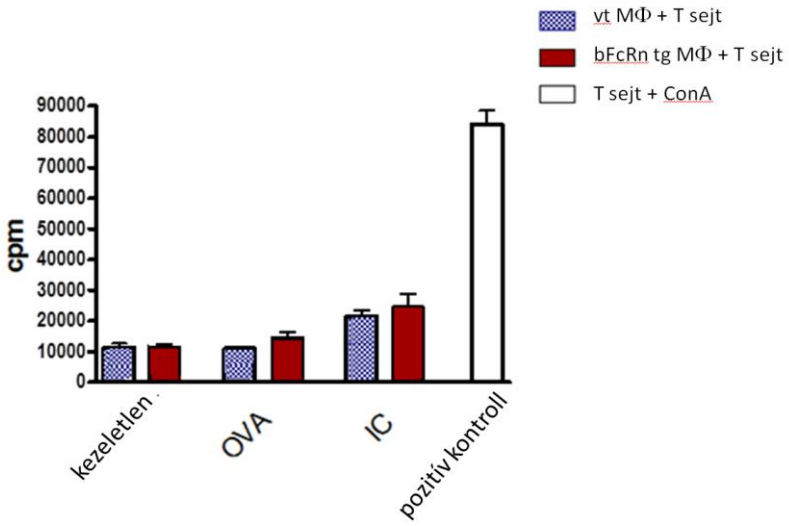
A peritoneális MΦ-okat az egerek hasüregéből tioglikolát oltást követő 4. nap után nyertük ki. Ezt követően végrehajtottuk a fagocitózist a fent leírt módon, azzal a különbséggel, hogy a sejtek fagocitózisa ebben az esetben egy 96 lyukú plate-ben zajlott. Már egy óra elteltével különbség mutatkozik a bFcRn tg és vt makrofágok fagocitózisában, ezért egy óra elteltével a nem fagocitált OVA-IgG IC-t kimostuk a rendszerből, hogy a sejtek túltelítését elkerüljük.

Egy óra elteltével OVA specifikus T helper sejteket adtunk az IC-vel „feltöltött” makrofágokhoz, melyeknek tisztasága 97 % felettinek bizonyult (30. ábra):



30. ábra: Az OVA TCR tg egér lépéből tisztított T helper sejtek tisztaságának ellenőrzése FACS-analízissel: Az „A" ábrán látható a teljes lépszuszpenzió CD4+ és CD8+ sejtjeinek eloszlása, míg a „B" ábrán a T helper sejtek tisztaságának ellenőrzése az elválasztás után. Szürkével izotípus kontroll látható, míg a feketével a specifikus jel**.**

A T helper sejtek proliferációját ^{3}H-timidin beépülésével, radiometriás módszerrel követtük nyomon 48 óra elteltével. A T helper sejtek proliferációjának mértéke jól korrellál az APC-k antigén bemutatásával, mivel a T helper sejtek osztódásuk során egyre több ^{3}H-timidint építenek be, ami a sejtek radiaktivitásából meghatározható.



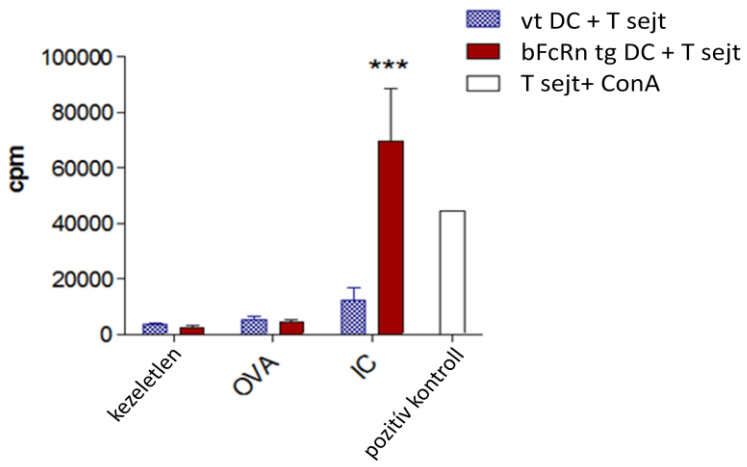
31. ábra: T sejt proliferáció mérése ^{3}H-timidin beépüléssel
(APC: peritoneális MΦ, T sejt: OVA TCR tg egérből származó OVA specifikus T sejt, ConA: pozitív kontroll). A diagramm három párhuzamos minta átlagát mutatja ± SD

Az 31. ábrán látható, hogy mind a vt mind tg egérből származó peritoneális MΦ-ok képesek voltak T helper sejtproliferáció indukálására. A proliferáció hatékonyabb, ha az antigént IC formájában vették fel. Azonban nem tudtunk különbséget detektálni a vt és

tg állatokból származó peritoneális MΦ-ok antigén bemutató képességében. Ez a kísérleti eredmény ellentmond egy, a saját kísérletünkkel egyidőben publikált tanulmánynak, amelyben kimutatták az FcRn szerepét a makrofágok antigénprezentációjában (Liu, et. al. 2011). Feltételezzük, hogy az eltérést a kísérleti beállítások különbsége okozhatja, amelyet további vizsgálatokkal indokolt tisztázni.

5.4.2. A T-sejt proliferáció indukciója dendritikus sejtekkel

Vizsgálataink során bFcRn tg, ill. vt egerek csontvelőből, GMCSF és IL4 citokinekkel differenciáltatott, és az érlelés 7. napján citofluoriméterrel karakterizált, dendritikus sejtjeit használtuk. A kísérlet során OVA-IgG IC-t fagocitáltattunk (kontrollként szolubilis ovalbumint), majd DO11.10 OVA TCR TG egérből izolált, OVA specifikus T helper sejtek proliferációján keresztül vizsgáltuk az BMDC sejtek antigénbemutató tulajdonságát. A T helper sejtek proliferációját ^{3}H-timidin beépülésével, radiometriás módszerrel követtük nyomon.



32. ábra: A DC-k T helper sejt proliferációs képességének vizsgálata
Az ábra három párhuzamos mérés eredményeinek átlagát mutatja ± SD (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001)

Eredményeink (32. ábra) szerint a bFcRn-t fokozott mértékben kifejező DC-k szignifikánsan nagyobb mértékben stimulálják az antigén-specifikus T-sejteket a vt DC-khez képest, ha az ovalbumint immunkomplex formájában adtuk a sejtekehez, míg a szolubilis antigén bemutatásában nem mutattunk ki különbséget. Pozitív kontrollként

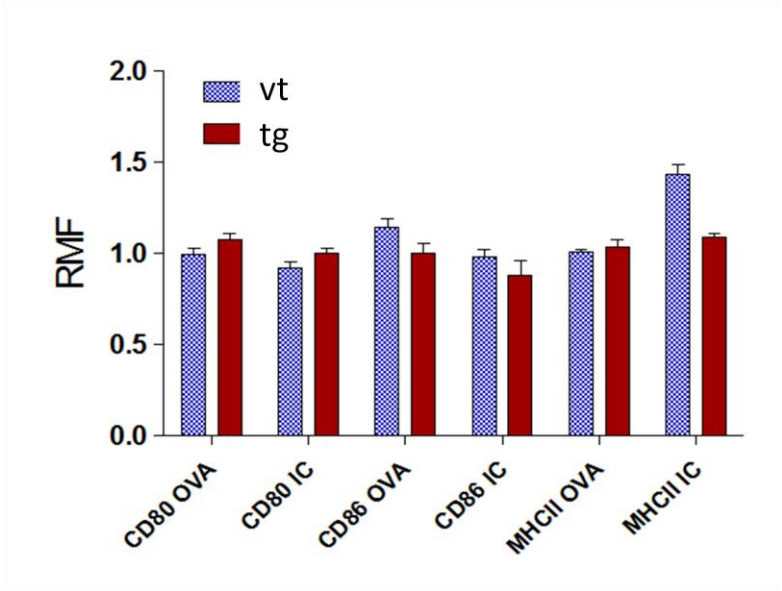
ConA-val stimulált T helper sejteket, míg negatív kontrollként kezeletlen T helper sejteket használtunk. A proliferáció hatékonyságát a T helper sejtekbe beépülő ^{3}H-timidin mennyisége alapján elemeztük.

5.5. A bFcRn tg DC-k fokozott antigénprezentációja nem a megváltozott MHC-II, kostimulátor és FcγR expressziónak köszönhető

Előzőekben bemutatott eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a bFcRn tg BMDC fokozott antigén bemutató képeséggel rendelkezik, amennyiben az antigén IgG tartalmú immunkomplex formájában van jelen. Tekintettel arra, hogy az IC esetén az antigén prezentációt igen sok tényező befolyásolhatja, nem zárhattuk ki annak a lehetőségét, hogy a megfigyelt, fokozott antigén prezentációt nem, vagy nem pusztán az FcRn kifejeződés fokozódása magyarázza, hanem esetleg a tg sejtek egyéb kostimulátorainak megváltozott kifejeződése. A következő kísérletünkben azt ellenőriztük tehát, hogy a bFcRn tg DC MHCII, CD80, CD86, ill. az FcγR sejtfelszíni expressziója eltér-e a vt DC-hez képest.

5.5.1. A kostimulátor molekulák és az MHC II expressziója

A kísérletet a T sejt proliferációs teszthez hasonlóan érlelt, vt és tg BMDC-vel végeztük, IC és szolubilis OVA hozzáadásával, majd 36 óra elteltével áramlási citofluorimetriával ellenőriztük az MHCII, CD80, CD86 sejtfelszíni megjelenését (33. ábra). A kísérlet eredményeként kijelenthetjük, hogy a bFcRn tg DC sejtek MHCII, CD80, CD86 expressziója nem különbözik szignifikánsan a vt sejtekhez képest.

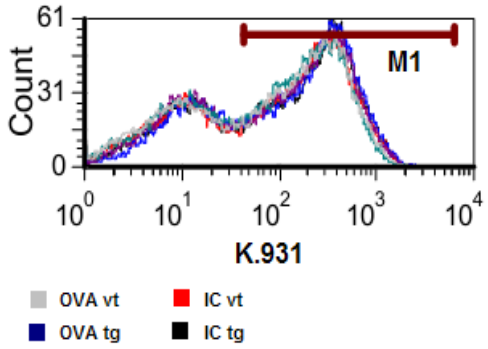


33. ábra: Az MHC II és a kostimulátor molekulák (CD80, CD86) sejtfeszíni megjelenésének vizsgálata DC-n áramlási citofluoriméterrel OVA-IgG IC, ill. OVA kezelés után: az ábra három párhuzamos mérés eredményeinek átlagát (+SD) mutatja

5.5.2. Az FcγR expressziós vizsgálatok

A sejtfelszíni FcγR expresszió ellenőrzése elengedhetetlen, ugyanis fontos tisztázni, hogy a fagocitózis során mért különbség valóban csak az FcRn-nek köszönhető. A komplement rendszer esetlegesen befolyásoló hatását sikeresen kizártuk a hőinaktivált szérumból tisztított IgG-vel létrehozott IC alkalmazásával, azonban a bFcRn egyéb génekkel együtt került integrálásra a bFcRn tg egerek genomjába és ezért nem zárható ki, hogy más receptorok - közöttük az FcγR - kifejeződését is befolyásolja.

A vizsgálathoz csontvelőből differenciáltatott éretlen DC-ket használtunk mind a vt, mind pedig a tg állatokból. A kísérlet megegyezik a szérumból tisztított IgG-vel végzett fagocitózis teszttel. A receptor expresszió változást 1 óra IC, ill. szolubilis OVA fagocitózist követően áramlási citofluorimetriával vizsgáltuk. A 34. ábrán látható, hogy sem IC, sem szolubilis OVA fagocitózisa közben nem mértünk FcγR expresszió különbséget a vt és tg állatokból származó sejteken, ill. a receptor expressziója IC hozzáadását követően sem emelekedett meg az OVA kontrollhoz képest.



34. ábra: Az FcγR expresszió tg és vt BM DC-n OVA és IC fagocitózis után

Ezekkel a kísérletekkel megerősítettük korábbi feltételezésünket, azaz a tg BMDC-k hatékonyabb antigén prezentációja a fokozott mértékű FcRn kifejeződés következtében valósul meg, amelynek révén fokozott mértékű lesz lizoszomába juttatott antigének mennyisége, majd azt követően azok degradációja és integrációja az MHCII-antigén komplexbe. Így ugyanakkora MHCII pull-val dolgozva nagyobb valószínűséggel kerül ki a sejt felszínére a T helper sejtek számára megfelelő antigén peptid.

6. Megbeszélés

Az FcRn komplex folyamatok szabályozásában vesz részt. Azon túl, hogy szerepet játszik az IgG/albumin homeosztázisban és a maternális immuntranszportban, az FcRn aktívan részt vesz az immunválasz kialakításában (Vidarsson et. al 2006; Qiao et al, 2008; Mi et. al, 2008; Baker et al. 2011; Li et Al. 2011; Liu et. al. 2011).

Az FcRn IgG-t védő mechanizmusa már régóta ismert volt (Ghetie et. al. 1996; Israel et al. 1996; Junghans et al. 1996), azonban az albumin homeosztázisban játszott szerepét csak később írták le (Chaudhury et al., 2003). A termelődött IgG mintegy kétharmadát, míg az albuminnak mindegy felét menti meg, hasonló módon, a degradációtól, ezáltal növelve félélet idejüket (Chaudhury et al., 2006). A receptor telíthetőségét bizonyítja, hogy megnövekedett IgG és albumin koncentrációban növekszik a két fehérjének a lebontási üteme, míg alacsony koncentrációban a termelődött fehérje nagy részét megmenti (Brambell et al., 1958). A két fehérje kötése pH dependens módon zajlik, enyhén savas közegben létre jön a kapcsolat, míg semleges-enyhén bázikus pH-n disszociál az IgG és az FcRn (Rodewald and Kraehenbuhl 1984; West et al. 2000). Az FcRn az IgG-t és az albumint egymástól függetlenül köti meg (Chaudhury et al., 2006, Andersen et al., 2006). Az FcRn IgG és albumin protektív hatása többek között az erek falában található endothél sejtekben, a vese podocytáiban, a tejmirigyben, valamint a hemopoetikus eredetű sejtekben (monocita, makrofág, dendritikus sejtek) zajlik (Kuo et al. 2011).

Az FcRn szerepét igazolták neutrofil granulociták antigén-IgG IC fagocitózisa kapcsán (Vidarsson et. al 2006). Ennek során az IC először a sejtek felszínén lévő Fcγ receptorokhoz kötődik, az ezt követő fagocitózis azonban FcRn által jelentős mértékben befolyásolt. Elektronmikroszkópos felvétellel követve az internalizálódott IC sorsát erős kolokalizációt állapítottak meg a lizoszómában helyet foglaló FcRn és az IC között. Vidarsson és mtsai hipotézise szerint az FcγR-hez kapcsolódó IC internalizációját követően savas pH-t kialakító proton pumpák vándorolnak az FcRn tartalmú fagoszómába, ahol létrejön az FcRn és IC kapcsolat. Ennek a kapcsolatnak az eredménye a hatékony fagocitózis és az IC degradáció (Vidarsson et. al 2006).

Az FcRn a monocitákban, makrofágokban és dendritikus sejtekben is kifejeződik (Zhu et al. 2001), amelyben kettős szereppel bír. Abban az esetben, ha monomer IgG-t fagocitál a sejt, akkor azt reciklizációval visszajuttatja az extracelluláris térbe. Ha azonban antigén-IgG immunkomplexet fagocitál a sejt, akkor ez az IC az FcRn által közvetített módon a lizoszómába kerül, ahol lebomlik, ill. az MHC II-vel bemutatásra kerül, miszerint a T sejtek antigén specifikus proliferációja drasztikusan csökkent, ha az IC olyan IgG-t tartalmazott, amelynek az FcRn-hez való kötődése gátolt. Hasonló kísérleteket végeztek FcRn KO egerek lépéből származó dendritikus sejteken, ahol szintén csökkent antigén specifikus T sejt proliferácót írtak le (Qiao et. al, 2008; Mi et al. 2008; Ye et al. 2008). 2011-ben egy másik munkacsoport *in vitro* és *in vivo* végzett T sejt proliferációs kísérletei bizonyítják, hogy az FcRn fokozza az MHC II-n át történő endoszómális antigénbemutatást. Kísérleteiket csontvelőből differenciáltatott DC-ken végezték, melyek FcRn KO és vad típusú állatból származtak, majd IC-vel feltöltve vizsgálták az antigén specifikus T helper sejtek proliferációját. Az FcRn KO egérből származó IC-vel feltöltött sejtek kevésbé voltak képesek kiváltani az antigén specifikus T sejt proliferációt (Liu. et. al. 2011).

Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy ellentétben a monomer IgG reciklizációjával, a sejtbe fagocitózissal bekerült multimer IC-t az FcRn a lizoszómába juttatja, mely elősegíti az antigénekből keletkező oligopeptidek MHC II –be integrálódását és az antigén bemutatását. Ezek a megfigyelések igen jó egyezést mutatnak saját kísérleti eredményeinkkel is, amelyekben az FcRn-t fokozott mértékben kifejező antigén prezentációban fontos szerepet betöltő dendritikus sejteket vizsgáltam (32. ábra).

Kacskovics és mtsai. klónozták és karakterizálták a bFcRn-t (Kacskovics et al. 2000), majd az FcRn hatásmechanizmusának tanulmányozására létrehozták a bFcRn tg egértörzseket, melyek kópiaszámfüggően fejezik ki a bFcRn (Bender és mtsai, 2007). Ezekben az állatokban a fehérje, ez egér FcRn-hez hasonló sejt- és szövetspecifikusságot mutat. IgG kiürülési vizsgálatokkal igazolták, hogy ezekben az állatokban az egér és a humán IgG molekulák felezési ideje is fokozott, ami a bFcRn funkcionális intaktságára utal. Ez a kísérlet igazolta, hogy ezekben az állatokban a bFcRn α-lánc az egér béta 2-mikroglobulinnal (β2m) funkcionális egységet képez, másfelől azt is, hogy a bFcRn α-lánc citoplazmikus doménje megfelelő módon vesz részt az egér sejtekben zajló szignalizációs folyamatokban (Bender et. al. 2007).

A bFcRn tg egereket T-dependens antigénnel immunizálva a primer immunválaszban alig, azonban a szekunder immunválaszban szignifikánsabban magasabb antigén specifikus IgG, sőt IgM titert lehetett tapasztalni, mint a kontroll állatokban. Az antigén specifikus ellenanyagok átlagos affinitása legalább olyan értékűnek mutatkozott, mint a kontroll állatokban. Emellett az immunizált állatok lépe és lépsejtszáma drasztikus mértékben emelkedett. A lépben található immunsejtek arányának vizsgálata során kiderült, hogy megnövekedett a dendritikus sejtek és neutrofil granulociták száma, ill. az IgG-t termelő plazmasejtek száma is. Sikerült kimutatni azt is, hogy a bFcRn tg állatból nyert granulociták antigént-IgG IC fagocitózisa szignifikáns mértékben volt magasabb, mint a kontroll állatoból származó sejtek esetén (Cervenak et. al, 2011). A lépsejtekből történő hibridóma mikrokultúra előállítás során megfigyelhető volt, hogy több mikrokultúra jött létre a kontroll állatokhoz képest, ill. ezek a sejtek magasabb arányban termeltek antigén-specifikus ellenanyagot. Ezeknek az állatoknak a későbbiekben monoklonális, ill. poliklonális ellenanyaggyártásban való felhasználhatóságát erősíti, hogy még idős korukra sem lehetett autoantitestek jelenlétét kimutatni (Schneider et al, 2011). Egy másik vizsgálat alapján kiderült, hogy a fokozott immunválasz hatására gyengén immunogén peptidekkel szemben is hatékony immunválasz alakul ki (Vegh et. al 2011). Munkacsoportunknak azt is sikerült kimutatni, hogy a bFcRn tg egerek humorális immunválasz diverzitása fokozott mértékű (Vegh et. al. 2012).

Saját vizsgálataim során célul tűztük ki, hogy az FcRn-t nagyobb mértékben kifejező egerek immunológiailag fontos sejtjeiben kimutassam a bFcRn kifejeződését, majd antigén prezentáló sejtekben (makrofág, dendritikus sejt) a fokozott FcRn kifejeződésének hatását vizsgáljam a fagocitózisra és antigén prezentációra.

Eredményeink szerint a bFcRn tg egérből származó peritoneális makrofágok hatékonyabb antigén-IgG IC fagocitózisra képesek a kontroll állatokhoz képest. Ez a különbség már 30 perc után megmutatkozott, ezt követően azonban nem láttunk további növekedést a vt állatból származó makrofágokhoz képest, feltételezhetően a receptor telítődése következtében (23. ábra).

Kísérleteinket a tisztított ellenanyaggal előállított IC-vel megismételtük tg és vt egérből származó csontvelői őssejtből differenciáltatott dendritikus sejteken. A bFcRn tg egerekből származó dendritikus sejtek, a makrofágokhoz képest, sokkal nagyobb mértékű különbséget mutatott a fagocitózis szempontjából, mint a kontroll állatokból származó

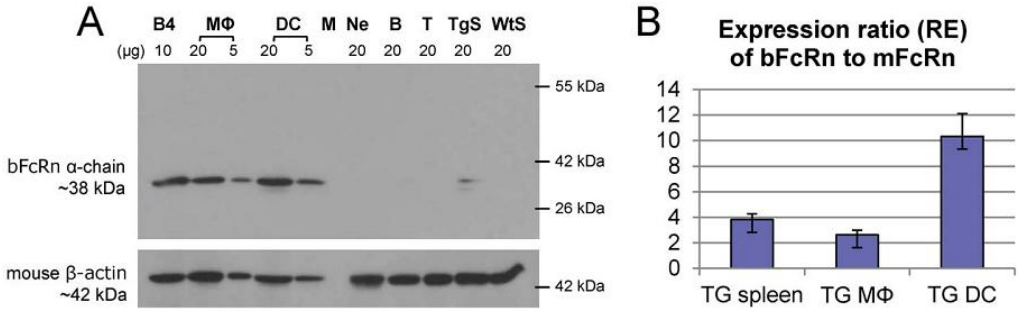
sejtek. Már a 30. perctől szignifikáns különbséget mutatott a tg DC-ben lévő IC mennyisége és ez a különbség még 120. percnél sem érte el a telítési szakaszt (27. ábra). A sejtben lévő IC mennyiség a vt DC-ben is növekszik, azonban ez a növekedés messze elmarad a tg sejtekétől. Konfokális mikroszkópiával követve az időkinetikát, a mért fluoreszcens jel a DC-k belsejében volt észlelhető, mint vt mind a tg DC esetén.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az FcRn ténylegesen segíti-e az antigént tartalmazó IC lizoszómális útvonalra való terelését, ill. az MHC II-n történő antigén peptid darabok hatékony bemutatását a specifikus T helper sejteknek. Kísérleteink szerint a bFcRn tg perifériás makrofágok nem bizonyultak sokkal hatékonyabb antigén bemutató sejteknek vad típusú társaiknál, azonban a csontvelői eredetű dendritikus sejtek esetén szignifikánsan nagyobb mértékű volt az antigénprezentáció, antigén-IgG immunkomplexek esetén, a kontroll sejtekhez képest. A szolubilis antigén esetében a vt és tg állatok T helper sejt proliferációt indukáló hatása alacsony volt és különbséget sem találtunk a vt és tg sejtek esetén.

Előzőekben bemutatott eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a bFcRn tg BMDC fokozott antigén bemutató képességgel rendelkezik, amennyiben az antigén IgG tartalmú immunkomplex formájában van jelen. Tekintettel arra, hogy az IC esetén az antigén prezentációt igen sok tényező befolyásolhatja, nem zárhattuk ki annak a lehetőségét, hogy a megfigyelt, fokozott antigén prezentációt nem, vagy nem pusztán az FcRn kifejeződés fokozódása magyarázza, hanem esetleg a tg sejtek egyéb kostimulátorainak megváltozott kifejeződése. A következő kísérletünkben azt ellenőriztük tehát, hogy a bFcRn tg DC MHCII, CD80, CD86, ill. az FcγR sejtfelszíni expressziója eltér-e a vt DC-hez képest. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy sem a fagocitáláshoz elengedhetetlen Fcγ receptorok, sem pedig a T helper sejt aktiváláshoz elengedhetetlen kostimulátor molekulák, ill. az MHC II sejtfelszíni expressziójában nem mutatkozott szignifikáns különbség a vt és a tg egerekből származó APC-k között, sem az IC-vel történő kezelés előtt, sem pedig utána. Munkacsoportunk időközben azt is megvizsgálta, hogy vajon ez a robusztus különbség annak köszönhető-e, hogy a bFcRn jobban kifejeződik-e mint a mFcRn. Kvantitatív RT-PCR segítségével meggyőződtek arról, hogy a lépben és makrofágban 2,5x ill. 4x jobban fejeződik ki a bFcRn, mint az egér FcRn, ill. a BMDC-ben ez a különbség 10x volt (35.b ábra).

Ezeknek az adatoknak a birtokában kijelenthetjük, hogy a megnövekedett IC fagocitózis a perifériás makrofágok 2,5x nagyobb FcRn expressziójával hozható

összefüggésbe, míg a hatékony IC felvételt és antigén bemutatást mutató BMDC-k 10x nagyobb FcRn expressziójával magyarázható azok viselkedése a kontroll, vagyis a csak egér FcRn-t kifejező állatokból származó sejtekhez képest.

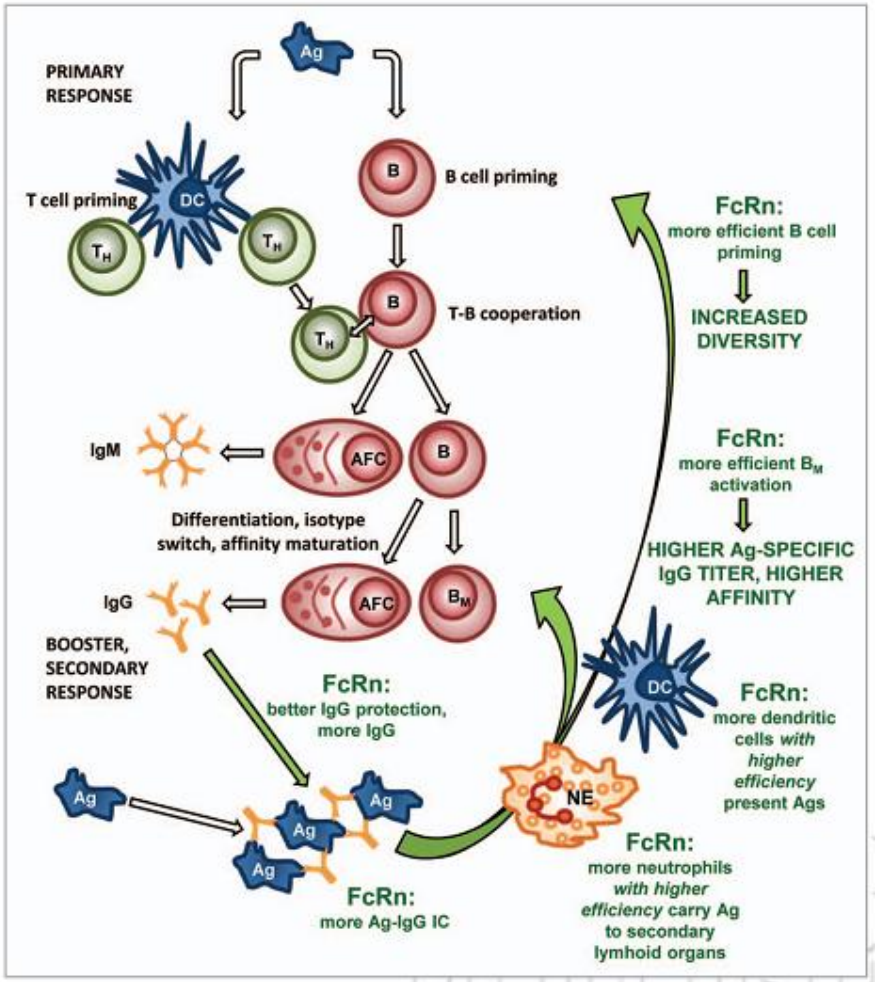


35. ábra: bFcRn fehérje expresszió kimutatása WB módszerrel (a B4 egy bFcRn-t overexpresszáló sejtvonal, TgS- tg lép, WS, vt lép) (A), bFcRn és mFcRn expressziós hányada a tg állatokból származó teljes lépsejtszuszpenzióból, tg MΦ és BMDC estén (B**)**

Ezekkel a kísérletekkel párhuzmosan folytak azok a vizsgálatok melyek a bFcRn immunsejtekben történő kimutatását célozták meg RT-PCR módszerrel. Tg egér lépéből szortírozással elválasztott B- és T limfocitákból, neutrofil granulocitákból, makrofágokból és DC-ból is sikerült kimutatni mind a bFcRn mind pedig a mFcRn expressziót (16. ábra). Azonban, egy a munkacsoportban elvégzett Western blot módszerrel történő fehérje kimutatás során sem a granulocitákból sem pedig a B és T limfocitákból nem sikerült a fehérje jelenlétét közvetlenül igazolni (35.a ábra). Ez a különbség a két módszer közti érzékenységből származhat (Végh és Farkas et al. 2012)

A poliklonális és monoklonális ellenanyaggyártásban teret hódító nyulak esetén munkacsoportunk célul tűzte ki, hogy az eddigi egér eredményekre támaszkodva létrehoz egy olyan transzgén nyúl állományt, mely az FcRn-t fokozottan fejezi ki. Azonban, hogy létre lehessen hozni egy ilyen genetikailag módosított állatot, karakterizálni kell a nyúl FcRn-t (rFcRn), hogy meg lehessen állapítani, hogy a nyúl FcRn mely sejtekben/szövetekben fejeződik ki és hasonló funkciókkal rendelkezik, mint a többi eddig karakterizált FcRn. Eredményeink szerint a nyúl FcRn kifejeződik az általunk vizsgált összes szövetben, ill. sejtben (máj, lép, vese, nyirokcsomó, agy, uterus, ovárium, placenta szikzacskó) és az általam vizsgált neutrofil granulocitában és perifériás makrofágokban is (15. ábra). Munkacsoportunk kísérletei igazolták, a bFcRn tg egerekhez hasonlóan, a rFcRn tg nyulak is fokozott humorális immunválasszal rendelkeznek (Catunda Lemos et al. 2012).

Az FcRn overexpresszió hatásmechanizmusának értelmezésére munkacsoportunk a következő összegző modellt állította fel (36. ábra):



36. ábra: Az FcRn overexpresszió hatása az immunfolyamatokra (Kacskovics et al. 2011)

Eszerint a fokozott immunválasszal rendelkező egerek megnövekedett antigén specifikus IgM és IgG szintjét elsősorban az antigén specifikus B sejtek fokozott klonális expanziója okozza, bár az FcRn fokozott kifejeződése hatékonyabb IgG védelmet is jelent. Megjegyzendő, hogy az IgG védelem nem antigén specifikus, mivel az FcRn – IgG interakció az IgG konstans részéhez köthető. Az antigén szervezetbe való kerülésekor az FcRn-t nagyobb mértékben kifejező tg állatokban hasonló primer immunválasz játszódik le, mint a kontroll állatokban. Ezt követően azonban, az antigén-specifikus IgG megjelenését követően, nagyobb mennyiségben alakulnak ki antigén-IgG immunkomplexek, amelyeket a hivatásos antigén prezentáló sejtek hatékonyabban fagocitálnak, ill. mutatnak be a T helper sejteknek, mint a kontroll állatok esetén. A

fokozott mértékű fajlagos T sejt aktiválódást, nagyobb számú és többféle antigén specifikus B sejt aktiválódása követi, amelynek eredményeképpen fokozódik az szekunder immunválasz során termelődő antigén-specifikus ellenanyagok (IgG és IgM) titere. Megjegyzendő, hogy az FcRn kizárólag az IgG izotípust köti, így a fokozott mértékű antigén-specifikus IgM titer egyértelműen jelzi a jelentősebb mértékű naív B-sejt aktivációt is, ami növeli az antigén specifikus ellenanyagok diverzitását (Kacskovics et al. 2011).

Összefoglalva elmondható, hogy az FcRn tg állatokban (egér, nyúl) az FcRn kifejeződésének fokozása csökkenti az IgG lebontását, fokozza a humorális immunválaszt, ami megnövekedett IgG és IgM titerben jelentkezik és a termelődött ellenanyagok diverzitása nő. A lépben az antigén specifikus immunsejtek száma nő és, belőlük nagyobb számú antigén specifikus hibridóma állítható elő. Saját kutatásom során sikerült igazolni, hogy a humorális immunválaszban kulcsszerepet betöltő hivatásos antigén-prezentló sejtek fagocitózisa és antigén-prezentációja is fokozott mértékű, a megnövekedett FcRn kifejeződés következtében. Az ilyen tg állatok előnye, hogy gyengén immunogén antigénekkel szemben is hatékony immunválasszal reagálnak. Ezek alapján elmondható, hogy az FcRn tg állatok alkalmazása a monoklonális és poliklonális antitest fejlesztés során ígéretes fejlesztés.

7. Új tudományos eredmények

- Sikerült kimutatni a nyúl FcRn expressziót nyúl peritoneális makrofágokból és vérből izolált neutrofil granulocitákban.
- Sikerült kimutatni a bFcRn tg egerekből a mFcRn és bFcRn expressziót a lépből izolált makrofágokból, dendritikus sejtekből, neutrofil granulocitákból.
- Fokozott fagocita funkciót sikerült kimutatnunk a bFcRn egerekből származó peritoneális makrofágokból és dendritikus sejtekből, ha az antigént immunkomplex formájában adtuk a sejtekhez.
- Sikerült kimutatni, hogy a bFcRn tg állatokból származó dendritikus sejtek immunkomplex felvételt követően hatékonyabban képesek az antigén specifikus T helper sejtek proliferációját kiváltani, mint a kontroll állatok hasonló sejtjei. A szolubilis antigénnel végzett kísérleteink során nem volt kimutatható különbség az antigén specifikus T sejt válaszban, amely az FcRn szerepét igazolja.
- A dendritikus sejtek sejtfelszínén megjelenő kostimulátor molekulák, MHCII és Fcγ receptorok expresszióját vizsgálva elmondható, hogy sem a CD80/CD86 sejtfelszíni expressziója, sem az MHC II és FcγR expressziója nem mutat szignifikáns különbséget a bFcRn-t overexpersszáló dendritikus sejtek felszínén a kontroll állatokhoz viszonyítva. Így elmondható, hogy a megnövekedett fagocita funkció és T sejt proliferáció az FcRn kifejeződés fokozódása miatt alakul ki.

8. Összefoglalás

Az FcRn szerepe az IgG homeosztázisban már régóta ismert. Alapvető funkciói közé tartozik, hogy részt vesz a maternális IgG transzportban, valamint gátolja az endotélsejtekben és monocitákban zajló IgG és albumin lebomlást növelve ezzel e két fontos plazmafehérje fél-életidejét. Az FcRn fontos szerepet tölt be az APC-k funkciójában mivel közreműködik az antigén-IgG immunkomplex (Ag-IgG IC) fagocitózisában és azáltal, hogy az Ag-IgG-IC-t lizoszómális útvonalra irányítja, amely együttesen fokozza az antigén prezentációt.

Mivel a közelmúltban több munkacsoport is beszámolt arról, hogy e receptor kulcsszerepet játszik a neutrofil granulociták és monociták IC fagocitózisában és a DC-k és MΦ-ok antigén prezentációjában, elsődleges célunk volt, hogy ezt a kérdést a bFcRn-t fokozott mértékben kifejező tg egerekben is tanulmányozzuk. Először azt elemeztük, hogy vajon a bFcRn tg egerek leukocitáiban, APC sejtjeiben kifejeződik-e a transzgén majd tanulmányoztuk, hogy fokozódik-e ezekben a sejtekben a fagocitózis és az ezt követő antigén-prezentáció, a kontroll állatok sejtjeivel összehasonlítva.

RT-PCR módszerrel megállapítottuk, hogy a tg neutrofil granulocita, MΦ, DC és B limfocita mellett, a T limfocitában is kifejeződik a bFcRn, csakúgy, mint a mFcRn. Áramlási citometriával és konfokális mikroszkóppal végzett kísérleteink alapján a tg állatokból nyert MΦ-k és DC-k fokozott számban és intenzitással veszik fel a fluoreszceinnel jelzett OVA-IgG immunkomplexet, a kontroll állatokból nyert sejtekhez képest. Míg a szolubilis antigén felvételében nem találtunk különbséget. Antigén prezentációs vizsgálataink alapján elmondható, hogy a tg állatokból származó DC-k IC felvételt követően hatékonyabban képesek az antigén specifikus T helper sejtek proliferációját kiváltani, mint a vad típusú sejtekből származó DC-k. Míg a szolubilis antigén felvételét követő T helper sejtproliferációs válaszban nem találtunk különbséget. A tg MΦ-ok hatékonyabban vették fel az IC-t a kontroll állatokhoz képest, azonban az antigén-prezentációban nem bizonyultak eredményesebbnek.

A nyúl FcRn karakterizálása során RT-PCR módszerrel vizsgáltuk a nyúl FcRn kifejeződését MΦ-ban és neutrofil granuloctában. Vizsgálataink hasonló eredménnyel jártak – mindkét sejtből sikerült a nyúl FcRn expressziót detektálni. Eredményeink alátámasztják azokat a korábbi vizsgálatokat, melyek szerint az FcRn fontos szerepet

játszik az immunkomplexek fagocitózisában és antigén prezentációjában, ill. kijelenthetjük, hogy a receptor fokozottabb kifejeződése ezt a folyamatot hatékonyabbá teszi.

9. Summary

The role of the FcRn is fundamental in IgG and albumin metabolism. Fc receptors in endosomes bind to IgG internalized through pinocytosis, recycling it to the cell surface and preventing it from undergoing lysosomal degradation and this mechanism may provide an explanation for the greater half-life of IgG. FcRn is expressed in several cell types, including epithelial cells or capillary endothelium. The recently described expression of FcRn in antigen presenting cells (APCs) suggests that it may have important role in cellular immunity, as well. Earlier reports show that the FcRn has a major role of IgG-mediated phagocytosis and enhances the presentation of antigen when the antigen is in immunecomplex. Kacskovics et al. cloned and characterized the bovine FcRn (bFcRn) and generated the bFcRn transgenic mice. We analysed the bFcRn expression of immuncells (macrophage, DC, Gr, B cell, T cell) with RT-PCR and we found that bFcRn is expressed in all immuncells. Our hypotheses were that FcRn overexpression enhances the phagocytosis activity of macrophages and dendritic cells and increases the antigen presentation of CD4+ T cells. In the present study we analysed that the bFcRn overexpression can enhance the antigen uptake and presentation by macrophages and DCs. For the phagocytosis assay we used OVA-IgG IC. The antigen presentation ability of macrophages and DCs was measured by T-cell prolifeation assay. We used immuncomplex phagocyted bFcRn tg/wt macrophage and DC and for T-cells we used OVA specific Th cells..Our data present that macrophages and DCs cells from bFcRn transgenic mice show enhancement of IC phagocytosis and the bFcRn DC can enhance the antigen uptake for OVA specific T cells. No differences were observed in the levels of stimulation of T cell proliferation by Tg and wt DCs loaded with soluble OVA alone and if we use macrophages. Rabbits are an important source of polyclonal and monoclonal antibodies. For that we analized the rFcRn expression in two immoncells.We found that rFcRn is expressed both of them.

Our results confirm those of previous studies, that the FcRn plays an important role of phagocytic activities and antigen presentation. The increased expression of this receptor will make this process more efficient.

10. Köszönetnyílvánítás

Ezúton szeretném köszönetem kifejezni két témavezetőmnek **Dr. Kacskovics Imrének** és **Dr. Matkó Jánosnak**, hogy szakmai tudásukkal és útmutatásukkal folyamatosan egyengették doktori tanulmányaimat és értékes ötleteikkel előmozdították szakmai fejlődésemet.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Erdei Annának,** aki lehetővé tette számomra, hogy a PhD éveimet az ELTE-Immunológiai Tanszékén tölthessem.

Köszönöm **Dr. László Glóriának, Dr. Bajtay Zsuzsannának, Dr. Papp-Balogh Andreának, Dr. Szekeres Zsuzsannának, Dr. Kerekes Krisztinának**, hogy a kísérletes munkáim során mindig feltétel nélkül segítettek.

Ezúton köszönöm a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban dolgozó munkatársaknak, különösen **Dr. Bősze Zsuzsának, Dr. Hiripi Lászlónak és Dr. Bender Balázsnak** a rFcRn munkában nyújtott segítségüket és a mindig kedves fogadtatást.

Köszönöm a laborunkban dolgozó munkatársaknak a segítségét. Külön szeretném megköszönni **Dr. Cervenak Juditnak, Dr. Schneider Zitának és Magna Melindának,** hogy értékes ötleteikkel segítették munkám és megosztották velem eredményeiket.
Köszönetem szeretném kifejezni **Mikesy Árpádnak, Pásztor Mártának, Gősiné Kolena Gizellának** a technikai segítségüket.

Köszönetem szeretném kifejezni a tanszék minden dolgozójának a munkámhoz nyújtott segítségét és azt, hogy ezt a 4 évet jó hangulatban baráti társaságban tölthettem.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a **Családomnak és Barátaimnak**, hogy mindig minden körülmények között mellettem állnak.

11. Saját közlemények jegyzéke

12.1 Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Vegh A*, Farkas A*, Kovesdi D, Papp K, Cervenak J, Schneider Z, Bender B, Hiripi L,Laszlo G, Prechl J, Matko J, Kacskovics 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 (* megosztott első szerzők)

Catunda Lemos AP, Cervenak J, Bender B, Hoffmann OI, Baranyi M, Kerekes A, Farkas A, Bosze Z, Hiripi L, Kacskovics I. (2012) **Characterization of the rabbit neonatal Fc receptor (FcRn) and analyzing the immunophenotype of the transgenic rabbits that overexpresses FcRn.** PLoS One. 2012;7(1):e28869. doi: 10.1371/journal.pone.0028869.

12.2 Az értekezéshez nem kapcsolódó egyéb közlemények

Izsepi E, Balogh A, Farkas A, Molnar A, Solymos E, Toth EA, Csepanyi-Komi R, Matko J. (2012) **The AC8 IgG3 monoclonal anti-cholesterol antibody modulates uptake and presentation of antigens for T cell activation.** Immunol Lett.2012 Mar 30;143(1):106-15. doi: 10.1016/j.imlet.2012.01.009.

Farkas A, Horváth É, Paul M, Varankáné László K, Fekete M, (2003) **A B12-vitaminhiány korai diagnosztizálásának laboratóriumi lehetőségei**, Klinikai és kísérletes laboratóriumi medicina 30:(3) *pp. 106-118.*

12.3 Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztraktok

Anita Farkas, Dorottya Kövesdi, Glória László, János Matkó, Imre Kacskovics: **Enhanced IgG-immune complex phagocytosis and antigen presentation inmacrophages and dendritic cells isolated from tg mice that overexpress FcRn** Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies, Visegrad, Hungary, 2011

J. Cervenak, M. Magna, B. Bender, Z. Schneider, A. Farkas, L. Hiripi, A. Erdei, Z. Bősze and I. Kacskovics: **FcRn overexpression boosts humoral immune response** 15thefis-EJI Symposium on Signals and signal processing in the immune system, Balatonöszöd, Hungary, 2009

12.4 Hazai konferencia kiadványban megjelent absztraktok

Farkas Anita, Kövesdi Dorottya, Magna Melinda, Bender Balázs, László Glória, Matkó János, Kacskovics Imre: **Az FcRn fokozott kifejeződése növeli az immunkomplexek fagocitózisának hatékonyságát makrofágokban és neutrofil granulocitákban**, Magyar Immunológiai Társaság Ifjúsági Kongresszusa, Harkány, 2009

Farkas Anita, Kövesdi Dorottya, László Glória, Matkó János, Kacskovics Imre: **Az FcRn fokozott kifejeződése dendritikus sejteken és makrofágokban növeli az immunkomplexek fagocitózisának hatékonyságát és az antigén prezentációt**, Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011

Cervenak Judit, Schneider Zita, Végh Attila, Baranyi Mária, Farkas Anita, Bender Balázs, Papp Krisztián, Prechl József, Bősze Zsuzsanna, Erdei Anna és Kacskovics Imre: **Az FcRn transzgénikus állatok kimagasló immunválasza jelentősen fokozza a mono-**

és poliklonális ellenanyagok előállításának hatékonyságát, Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011

Lemos Ana Paula Catunda, Cervenak Judit, Bender Balázs, Hoffmann Ivett Orsolya,Baranyi Mária, Kerekes Andrea, Farkas Anita, Bõsze Zsuzsanna, Hiripi László,Kacskovics Imre: **A nyúl FcRn karakterizálása; az FcRn transzgénikus nyulak immunfenotípusának jellemzése,** Magyar Immunológiai Társaság 41. Vándorgyűlése, Debrecen, 2012

12. Irodalomjegyzék

Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, Hanč P, Kjær S, Feest C, Fletcher G, Durkin C, Postigo A, Skehel M, Batista F, Thompson B, Way M, Reis e Sousa C, Schulz O., 2012, F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells., Immunity. 20;36(4):635-45. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.008.

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.

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., Bjorneboe, 1964, Gamma globulin turnover in rabbits before and during hyperimmunization. J. Exp. Med. 119, 537-546. Brambell, F.W.R., 1970, The transmission of passive immunity from mother to young, Vol 18. North-Holland Pub. Co.

Antohe F, Rădulescu L, Gafencu A, Gheție V, Simionescu M., 2001, Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells., Hum Immunol. ;62(2):93-105.

Bender, B., Bodrogi, L., Mayer, B., Schneider, Z., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Eggen, A., Kacskovics, 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

Blander JM, Medzhitov R., 2004, Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors. Science;304:1014–1018.

Blumberg, R.S., Koss, T., Story, C.M., Barisani, D., Polischuk, J., Lipin, A., Pablo, L., Green, R., Simister, N.E., 1995, A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes. J Clin Invest 95, 2397-2402.

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., 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.

Burmeister, W.P., Gastinel, L.N., Simister, N.E., Blum, M.L., Bjorkman, P.J., 1994, Crystal structure at 2.2 A resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. Nature 372, 336-343

Butler JE.: Immunoglobulins and immunocytes in animal milks. In: Mucosal Immunology. New York. Academic Press, 1999. p. 1531-1554

Butler, J.E., 1983, Bovine immunoglobulins: an augmented review. Vet Immunol Immunopathol 4, 43-152.

Catunda Lemos AP, Cervenak J, Bender B, Hoffmann OI, Baranyi M, Kerekes A, Farkas A, Bosze Z, Hiripi L, Kacskovics I. 2012 Characterization of the rabbit neonatal Fc receptor (FcRn) and analyzing the immunophenotype of the transgenic rabbits that overexpresses FcRn**.** PLoS One. 2012;7(1):e28869. doi: 10.1371/journal.pone.0028869.

Cervenak, J., Bender, B., Schneider, Z., Magna, M., Carstea, B.V., Liliom, K., Erdei, A., Bosze, Z., Kacskovics, 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.

Crome SQ, Wang AY, Levings MK: Translational mini-review series on Th17 cells, 2010, function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. Clin Exp Immunol; 159:109–119**.**

Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC., 2007, Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo, Science. 315(5808):107-11.

Ekiert, D.C., Bhabha, G., Elsliger, M.A., Friesen, R.H., Jongeneelen, M., Throsby, M., Goudsmit, J., Wilson, I.A., 2009, Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. Science 324, 246-251.

Erdei Anna, Sármai Gabriella , Prechl József, 2012, Immunbiológia, Medicina Könyvkiadó

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., 1997, FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter. Immunol Today 18, 592-598.

Ghetie, V., Ward, E.S., 2000, Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn. Annu Rev Immunol 18, 739-766.

Ghetie, V., Ward, E.S., 2002, Transcytosis and catabolism of antibody. Immunol. Res. 25, 97-113.

Hastings KT, Cresswell P., 2011, Disulfide reduction in the endocytic pathway: immunological functions of gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase, Antioxid Redox Signal. 1;15(3):657-68. doi: 10.1089/ars.2010.3684

Haymann, J.P., Levraud, J.P., Bouet, S., Kappes, V., Hagege, J., Nguyen, G., Xu, Y., Rondeau, E., Sraer, J.D., 2000, Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult human kidney. J Am Soc Nephrol 11, 632-639.

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.

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.

Izon D, Rudd K, DeMuth W, Pear WS, Clendenin C, Lindsley RC, Allman D., 2001, A common pathway for dendritic cell and early B cell development.,J Immunol ;167(3):1387-92.

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.

Kacskovics, 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.

Kacskovics, 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.

Kacskovics, 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.

Kacskovics, 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.

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.

Kim, J.K., Firan, M., Radu, C.G., Kim, C.H., Ghetie, V., Ward, E.S., 1999, Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn. Eur J Immunol 29, 2819-2825.

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.

Laszlo G, Dickler HB. 1988, IL-4 induces loss of B lymphocyte Fc gamma R II ligand binding capacity., J Immunol. 15;141(10):3416-21.

Lehmann B, Schwab I, Böhm S, Lux A, Biburger M, Nimmerjahn F., 2012, FcγRIIB: a modulator of cell activation and humoral tolerance, Expert Rev Clin Immunol. Mar;8(3):243-54. doi: 10.1586/eci.12.5.

Liu X, Lu L, Yang Z, Palaniyandi S, Zeng R, Gao LY, Mosser DM, Roopenian DC, 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(8):4674-86. doi: 10.4049/jimmunol.1003584

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.

Lu, W., Zhao, Z., Zhao, Y., Yu, S., Fan, B., Kacskovics, I., Hammarstrom, 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.

Machy P, Serre K, Leserman L., 2000, Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fcgamma receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells. Eur J Immunol;30:848–857

Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS., 2013, Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II., Traffic. 135-52. doi: 10.1111/tra.12026.

Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L. & Akashi, K. 2001, Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. Blood 97, 3333-3341

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.

Matsuo M, Nagata Y, Sato E, Atanackovic D, Valmori D, Chen YT, Ritter G, Mellman I, Old LJ, Gnjatic S. 2004, IFN-gamma enables cross-presentation of exogenous protein antigen in human Langerhans cells by potentiating maturation. Proc Natl Acad Sci USA;101:14467–14472.

Mayer, B., Doleschall, M., Bender, B., Bartyik, J., Bosze, Z., Frenyo, L.V., Kacskovics, 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., Kacskovics, 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., Kacskovics, 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.

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.

Mellman I., Relationships between structure and function in the Fc receptor family., 1988, Curr Opin Immunol., 1(1):16-25. Review.

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.

Michimata T, Tsuda H, Sakai M, Fujimura M, Nagata K, Nakamura M, Saito S, 2002, Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D(2)-mediated manner. Mol Hum Reprod; 8:181–187.

Miyazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y,Futatani T, Miyawaki T, Saito S, 2003, Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. J Leukoc Biol; 74:514–522.

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.

Popov, S., Hubbard, J.G., Kim, J., Ober, B., Ghetie, V., Ward, E.S., 1996, The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn. Mol Immunol 33, 521-530.

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.

Rath T, Kuo TT, Baker K, Qiao SW, Kobayashi K, Yoshida M, Roopenian D, Fiebiger E, Lencer WI, Blumberg RS., 2013, The immunologic functions of the neonatal Fc receptor for IgG., J Clin Immunol. ;33 Suppl 1:S9-17. doi: 10.1007/s10875-012-9768-y.

Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, Nadeau BA, Zetoune FS, Sarma JV, Werner CM, Wanner GA, Simmen HP, Huber-Lang MS, Ward PA., 2009, Cross-talk between TLR4 and FcgammaReceptorIII (CD16) pathways, PLoS Pathog.;5(6):e1000464. doi: 10.1371/journal.ppat.1000464.

Rodewald, R., 1976, pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. J Cell Biol 71, 666-669.

Rodewald, R., Kraehenbuhl, J.P., 1984, Receptor-mediated transport of IgG. J. Cell Biol. 99, S159-S164.

Roopenian, D.C., Christianson, G.J., Sproule, T.J., Brown, A.C., Akilesh, S., Jung, N., Petkova, S., Avanessian, 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.

Roopenian, D.C., Akilesh, S., 2007, FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nature Reviews Immunology 7, 715-725.

Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R, 2009, Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. J Immunol; 183:7023–7030

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. Immunology Letters 2011. 137(1-2), 62-69

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

Serre K, Giraudo L, Siret C, Leserman L, Machy P., 2006, CD4 T cell help is required for primary CD8 T cell responses to vesicular antigen delivered to dendritic cells in vivo. Eur J Immunol. 2006 Jun;36(6):1386-97.

Simister, N.E., 2003, Placental transport of immunoglobulin G. Vaccine 21, 3365-3369.

Simister, N.E., Ahouse, J.C., 1996, The structure and evolution of FcRn. Res Immunol 147, 333-337; discussion 353.

Simister, N.E., Mostov, K.E., 1989, An Fc receptor structurally related to MHC class-I antigens. Nature 337, 184-187.

Simister, N.E., Rees, A.R., 1985, Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. Eur J Immunol 15, 733-738. 92

Simister, N.E., Story, C.M., 1997, Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. Journal of reproductive immunology 37, 1-23.

Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS., 2011, Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum., Science. 334(6059):1086-90. doi: 10.1126/science.1209235.

Smith, E.L., 1946, The immune proteins of bovine colostrum and plasma. J. Biol. Chem. 164, 345-358.

Sondermann P, Jacob U, Kutscher C, Frey J., 1999, Characterization and crystallization of soluble human Fc gamma receptor II (CD32) isoforms produced in insect cells., Biochemistry. 29;38(26):8469-77.

Steinman RM., 2012, Decisions about dendritic cells: past, present, and future, Annu Rev Immunol. 1-22. doi: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839

Story, C.M., Mikulska, J.E., Simister, N.E., 1994, A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. J Exp Med 180, 2377-2381.

Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL., 2000, Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor, Science., 290(5499):2152-4.

Tsuda H, Michimata T, Sakai M, Nagata K, Nakamura M, Saito S, 2001, A novel surface molecule of Th2- and Tc2-type cells, CRTH2 expression on human peripheral and decidual CD4+ and CD8+ T cells during the early stage of pregnancy. Clin Exp Immunol; 123:105–111.

Vegh, A., Cervenak, J., Jankovics, I., Kacskovics, 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., Kacskovics, 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.

Ward, E.S., Ober, R.J., 2009, Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn. Adv Immunol 103, 77-115.

Ward, E.S., Zhou, J., Ghetie, V., Ober, R.J., 2003, Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. Int Immunol 15, 187-195.

Warmerdam PA, Long EO, Roche PA. 1996, Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. J Cell Biol, 133:281–291.

West, A.P., Jr., Bjorkman, P.J., 2000, Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor(,). iochemistry 39, 9698-9708.

Woof JM., 2012, Insights from Fc receptor biology: a route to improved antibody reagents.,MAbs. 4(3):291-3. doi: 10.4161/mabs.20100.

Wu L, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K, Lucas K., 2001, Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. Blood 98, 3376-3382

Wu, L., Liu, Y. J. , 2007, Development of dendritic-cell lineages. Immunity. 26, 741-750

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.

Zhao, Y., Kacskovics, 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.