Doktori értekezés tézisei

Az FcRn overexpresszió hatása a humorális immunválaszra

Dr. Schneider Zita

Témavezető: Dr. Kacskovics Imre

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

ELTE TTK Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék
2012.

Bevezetés

A szervezetbe jutó antigén hatására az immunrendszer megfelelő reagálása esetén a B-limfociták plazmasejtté differenciálódnak és nagy mennyiségben termelnek az adott antigénre specifikus immunglobulinokat. A poliklonális ellenanyagok előállítása során, a lehető legmagasabb antigén-specifikus ellenanyag koncentráció érdekében, az állatokat gyakori immunizálásnak vetik alá. A hiperimmunizálás során az antigén-specifikus immunglobulin G (IgG) molekulák szintje ugyan jelentősen meghaladhatja a fajra jellemző normál értéket. Bár az egyes immunglobulin osztályok közül az IgG rendelkezik a leghosszabb felezési idővel, a megtermelt értékes ellenanyagok lebomlása, a szérum IgG mennyiségének fokozódása miatt felgyorsul. Ezért folyamatos és gyakori immunizálásra van szükség ahhoz, hogy a specifikus immunglobulinok magas szérumszintje megmaradjon. A poliklonális ellenanyagokat mára a kutatás, diagnosztika és terápia területén sok helyen felváltó monoklonális ellenanyagok előállítása során előnyös, ha az antigén specifikus ellenanyagot termelő hibridómák minél nagyobb számban állnak rendelkezésre, növelve a megfelelő klón kiválasztásának esélyét.

A neonatális Fc receptor (FcRn) fontos szerepet játszik az IgG katabolizmus szabályozásában, az IgG epiteliális barriereken keresztüli transzportjában, és több állatfajban a maternális IgG átvitelét is szolgálja az anyából az utódba. Kimutatták továbbá, hogy az IgG molekulákhoz hasonlóan szabályozza az albumin homeosztázist, illetve azt, is hogy fontos szerepet játszik a fagocitózis és antigén prezentáció folyamatában.

Célkitűzések

Dr. Kacskovics Imre és munkatársai az elmúlt években klónozták és karakterizálták a szarvasmarha FcRn (bFcRn) molekulát és igazolták, hogy fontos szerepet tölt be a szarvasmarhák IgG homeosztázisában. Kimutatták azt is, hogy *in vitro* körülmények között a bFcRn jóval erősebben köti az emberi IgG molekulát, mint a szarvasmarha IgG-t. Ezt az eredményt *in vivo* is igazolták azzal, hogy mind a normál, mind a humán IgG-t termelő transzkromoszómális borjak vérkeringésébe humán IgG-t juttatva meghosszabbodott a molekula féléletideje az endogén szarvasmarha IgG-hez képest. A bFcRn funkcionális vizsgálatával párhuzamosan merült fel az igény a receptor expressziójának szabályozásával kapcsolatos ismeretek bővítésére. A bFcRn génexpressziós változások hatékony *in vivo* tanulmányozása érdekében kívánatosnak látszott egy, a bFcRn-nel rendelkező transzgenikus (Tg) egérmodell létrehozása. A Dr. Bősze Zsuzsanna munkacsoportjával (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont) közösen előállított, a bFcRn α-láncát többféle kópiaszámban expresszáló hemi- és homozigóta transzgenikus egerekben a receptor DNS és mRNS szintű szövet- és kópiaszámfüggő termelődést mutatott, így a további karakterizálásra alkalmasnak bizonyult.

Munkánk során célkitűzéseink között szerepelt:

- A Tg egérmodellben kifejeződő bFcRn funkcionális alkalmasságának tesztelése a receptor egér és humán IgG katabolizmusra gyakorolt hatásán keresztül, a befecskendezett ellenanyagok felezési idejének meghatározása révén.
- A bFcRn overexpresszió humorális immunválaszra gyakorolt egyes paramétereinek vizsgálata
    - T-dependens antigénnel történő immunizálás hatására képződő antigén-specifikus IgG titerének és totál IgG koncentrációjának összehasonlítása vad típusú (vt) és bFcRn Tg egerekben

- Más genetikai háttérre keresztezett bFcRn Tg egerek totál szérum IgG és albumin koncentrációjának meghatározása
- Antigén konjugátummal (OVA-KLH, TNP-KLH) immunizált vt és bFcRn Tg egerek antigén-specifikus ellenanyag titerének, lépsejtjeinek és antigén-specifikus ellenanyagot termelő lépsejtjeinek monitorozása
- Az immunizált egerekből származó lépsejtek fúzionáltatása mielóma sejtekkel és a keletkező hibridómák, valamint antigén-specifikus ellenanyagot termelő hibridóma mikrokultúrák számának és arányának összehasonlítása vt és Tg egerekben
- Autoimmun ellenanyagok monitorozása idős vt és Tg egerek szérumából

- A Tg egér sejteken és szöveteken a bFcRn fehérje szintű kimutatására és tanulmányozására alkalmas ellenanyagok tesztelése, illetve fejlesztése.

Alkalmazott módszerek

- ELISA
- ELISPOT
- monoklonális ellenanyag előállítás
- microarray formátumú ellenanyag profil vizsgálat
- Western blot
- áramlási citofluorimetria
- fluoreszcens immunhisztokémia

Eredmények

- A bFcRn Tg egerek vérkeringésébe injektált ovalbumin specifikus egér IgG1 féléletideje meghosszabbodott a vt kontrollokhoz képest.
- Az egerek vérkeringésébe kétféle dózisú humán IgG-t juttatva annak felezési ideje a Tg egerekben meghaladta a kontrollokban mérhető értéket.
- T-dependens ovalbumin antigénnel immunizálva a bFcRn Tg egerek antigén-specifikus IgG szintje és totál IgG koncentrációja sokszorosa a vt kontrollénak.
- A más genetikai háttérre keresztezett bFcRn Tg egerek totál szérum IgG és albumin szintje szignifikánsan magasabb, mint a vt kontrolloké.
- OVA-KLH és TNP-KLH antigén konjugátumokkal végzett, hibridóma-előállítást célzó immunizálást követően a bFcRn Tg egerek haptén- és hordozó-specifikus IgG titere, lépének mérete, lépsejtjeinek és

antigén-specifikus lépsejtjeinek száma nagyobb, és lépsejtjeiből jelentősen több hibridóma mikrokultúra keletkezik, mint a vt állatok lépsejtjeiből

- A bFcRn Tg egerek lépsejtjeiből keletkezett hibridóma mikrokultúrák jóval nagyobb számban termelnek haptén-, illetve hordozó-specifikus ellenanyagot, mint a kontrollok esetén.
- A bFcRn Tg egerek lépsejtjeiből nem csak számában, hanem arányaiban is több hibridóma, illetve antigén-specifikus hibridóma mikrokultúra keletkezik, így a fúzió hibridizációs frekvenciája magasabb, mint vt állatok esetén.
- A Tg egerek és kontrolljaik szérumából nem lehetett sejtmag ellenes ellenanyagokat kimutatni.
- A bFcRn-specifikus ellenanyagok tesztelésére használt, a bFcRn-t alapszinten expresszáló sejtvonal, illetve ugyanezen sejtvonal stabilan transzfektált változata funkcionális bFcRn-t expresszál, amely pH-dependens módon köti az IgG molekulákat.
- A bFcRn detektálására egér monoklonális ellenanyagot fejlesztettünk, amellyel erős bFcRn expressziót mutattunk ki Tg egerek csontvelői eredetű dendritikus sejtjeiben és peritoneális makrofágjaiban (Western blot).
- Kimutattuk, hogy a bFcRn Tg egerek lépének szerkezete alapvetően nem tér el a vt kontrollhoz képest, és a munkacsoport által korábban létrehozott, FcRn-specifikus tyúk ellenanyaggal erős FcRn expressziót mutattunk ki a MARCO+ marginális zóna makrofágokban (immunhisztokémiai elemzés).

Diszkusszió

A szarvasmarha FcRn-t fokozottan kifejező transzgenikus egerekbe injektált IgG féléletidejének meghosszabbodása jelzi, hogy a bFcRn α-lánc funcionális egységet alkot az endogén egér β_2-mikroglobulinnal, és hatékonyan óvja meg az IgG molekulákat a lebomlástól, továbbá megfelelően vesz részt az egér sejtekben zajló jelátviteli folyamatokban.

A bFcRn Tg egerek magasabb antigén-specifikus IgG titere vélhetően több immunkomplex képződésével jár a szekunder immunválasz során, ami a lép B sejtek fokozott klonális expanziójához vezet; ezt az antigén-specifikus lép B-sejtekek nagyobb száma is alátámasztja. A Tg egerek lépsejtjeiből létrehozható antigén-specifikus hibridómák nagyobb száma, valamint a fúzió magasabb hibridizációs frekvenciája

különösen alkalmassá teszi ezeket az állatokat monoklonális ellenanyagok előállítására. A monoklonális ellenanyagok előállításának fokozásában korábban tesztelt Tg egérmodellekkel ellentétben a bFcRn Tg egerek felhasználását autoimmun ellenanyagok jelenléte nem korlátozza.

A Tg egerek makrofágjaiban és dendritikus sejtjeiben nagymértékben kifejeződő bFcRn hatékonyabb fagocitózissal és antigén prezentációval jár, amely legalább részben magyarázatot ad a Tg egerek fokozott immunválaszára. A receptor szerepének tisztázása a másodlagos nyirokszervekben (MARCO+ marginális zóna makrofágokban és egyéb FcRn-t kifejező sejtpopulációkban) hozzájárulhat a bFcRn overexpresszió működési mechanizmusainak mélyebb megértéséhez.

Mindezek alapján a bFcRn Tg egerek alkalmazása jelentős előnyöket kínál nemcsak a poli- hanem a monoklonális ellenanyagok előállítása során is.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

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

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.

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