

ZÁRÓJELENTÉS – OTKA IN 71293

Bevezetés

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

Munkacsoportunk az elmúlt években klónozte és karakterizálta a szarvasmarha, birka, sertés és teve FcRn-t (Kacskovics et al., 2006b; Kacskovics et al., 2000; Mayer et al., 2002b; Zhao et al., 2003) és különböző, az IgG szekrécióban résztvevő epitél sejtekben mutatta ki e gén expresszióját (tüdő, újszülött állat vékonybél, emlőmirigy) (Mayer et al., 2005; Mayer et al., 2004); valamint igazolta, hogy a szarvasmarha FcRn (bFcRn) fontos szerepet tölt be a szarvasmarhák IgG katabolizmusában (Kacskovics et al., 2006a).

Ezek a vizsgálatok rámutattak arra, hogy míg az IgG felezési idejét befolyásoló mechanizmus az emlős fajok esetén gyakorlatilag megegyezik, a maternális immuntranszport jelentős különbségeket mutat. Így a főemlősök és a nyúl esetén az anyai IgG kizárólag a placentán jut a fejlődő magzatba, a rágcsálóknál, húsevőknél ez a folyamat kisebb részben a placentán keresztül, nagyobb részben a kolosztrum felvétele során valósul meg. A patások esetén azonban az anyai IgG transzportja kizárólag a kolosztrum révén zajlik, ám ennek pontos tisztázása mindeddig nem valósult meg (Cervenak and Kacskovics, 2008). Annak ellenére, hogy az FcRn-t kimutattuk a juh és szarvasmarha tőgyszövetből, ill. sajátos lokalizációs változást is megfigyeltünk az ellés környékén, a receptor pontos szerepét nem tudtuk egyértelműen megállapítani (Mayer et al., 2005; Mayer et al., 2002a).

A szarvasmarha FcRn által mediált IgG katabolizmus és epithelialis transzport molekuláris szintű elemzését az OTKA T049015 pályázat támogatásával igyekeztünk pontosítani. A pályázat kapcsán számos értékes megfigyelést tettünk, sőt a funkcionális, génexpressziós vizsgálatok céljából transzgenikus egérmodelleket is létrehoztunk.

Az egyik ilyen transzgenikus egér modellt Dr. Lennart Hammarstöm (Karolinska Institute, Stockholm) és Dr. Yaofeng Zhao (Agricultural University, Beijing, China) professzorokkal együtt hoztuk létre és elemeztük. Ebben a modellben a bFcRn cDNS-t egy olyan expressziós kazettába integráltuk, amely kizárólag a laktáció idején fejezi ki a receptort a tejmirigyben (beta-kazein promoter). E vizsgálat kapcsán

azt tapasztaltuk, hogy az állatok vérében megemelkedett az IgG szint, de ezt csak kismértékben követte a tej IgG szintjének emelkedése. Ennek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az egér tejmirigyben a bFcRn visszajuttatja az IgG-t a vérpályába, és nem szekretálja azt (Lu et al., 2007). Ezzel hasonló eredményre jutottunk, mint amit korábban már egereknél publikáltak (Cianga et al., 1999). Fontos azonban, hogy ezt a kérdést kérődző állatokon is tisztázzuk, hiszen az említett egérmódelben a szarvasmarha FcRn eltérően viselkedhet. Kutatásunk egyik kiindulópontja tehát egy kérődző-specifikus rendszer létrehozása volt.

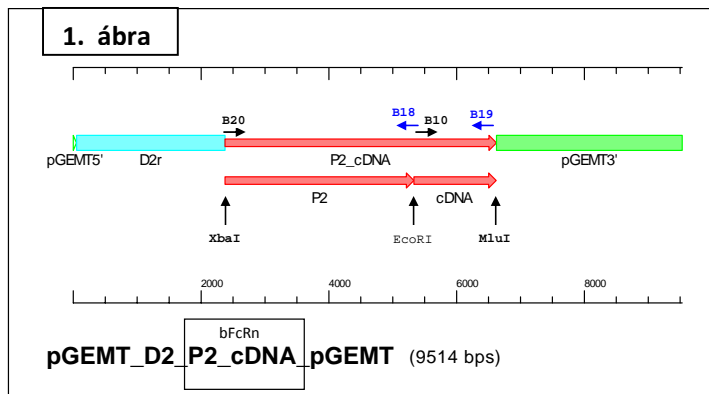
A tervezett bFcRn transzgenikus juh létrehozásának másik oka az volt, hogy kérődzőkben is ellenőrizzük azokat az eredményeket, amelyeket egy másik transzgenikus egérmódelben kaptunk. Dr. Bősze Zsuzsanna és munkatársai segítségével (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő) olyan transzgenikus egereket hoztunk létre, amelyek a szervezet valamennyi azon sejtjében túltermelik a bFcRn-t, amely sejtek a szarvasmarhában is kifejezik ezt a receptort (BAC transzgenezis). Vizsgálataink azt mutatják, hogy ezek az állatok sokkal hatékonyabban védik meg a befecskendezett IgG molekulákat a lebomlástól, mint nem transzgen társaik (Bender et al., 2007), ill. jelentősen nagyobb mennyiségben termelnek antigén specifikus poliklonális ellenanyagot (Kacs Kovics et al., 2007). Ezeket az eredményeket transzgenikus juhokban is ellenőrizni kívántuk.

Célkitűzés

E kérdések tisztázására Bruce Whitelaw professzorral és munkatársaival (Roslin Institute, UK) olyan transzgenikus juhot terveztünk előállítani, amely a nagymértékben homológ bFcRn-t expresszálja. Együttműködésünk során a mi munkacsoportunk a bFcRn konstrukciót (promoter és cDNS) állítja elő, míg ezt Whitelaw professzor munkacsoportja egy lentivírus vektorba illeszti, majd a vírust juh zigótákba injektálja. A transzgenikus juhokban közösen tervezzük elemezni az IgG katabolizmusát, az immunválaszra adott antigén specifikus IgG szintet, valamint későbbi fázisban a kolosztrumba/tejbe szekretálódó IgG mennyiségét.

Kutatási eredmények

A bFcRn alfa-lánc promoter szegmenseit és a hozzájuk kapcsolt cDNS-t (max: 5 kb hosszúságú lehet) genomi ill. plazmid DNS-ből, gén-specifikus primerekkel amplifikáljuk, a következőkben összefoglalt módon:

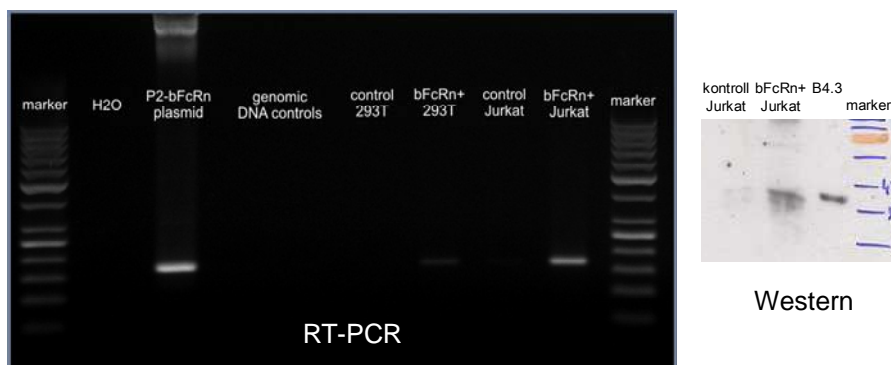


Az első lépés során a promoter (P1: 3000 bp ill. P2: 4300 bp) szakaszokat genomi DNS-ből XbaI- ill. EcoRI-toldalékú primerekkel állítjuk elő. A bFcRn cDNS-t EcoRI- és MluI-toldalékú primerekkel egy olyan vektorból amplifikáljuk ki, amelyet korábban sikerrel használtunk bFcRn stabil sejtek előállításához (Kacs Kovics et

al., 2006a). Ezt követően a P1 és P2 ill. a cDNS ampikonokat EcoRI –el hasítjuk, és egymáshoz ligáljuk (P1-cDNS, ill. P2-cDNS). A ligált DNS-eket ezt követően újra amplifikáljuk XbaI- és MluI-toldalékú primerekkel. Az így előállított ampikonokat azután XbaI és MluI enzimekkel hasítjuk és egy megfelelően előkészített vektorba klónozzuk további amplifikálás ill. szekvenálás végett (az **1. ábrán** a hosszabb promoterből készült konstrukciót – P2-cDNA - mutatjuk be). (Megjegyzés: valamennyi PCR reakcióhoz Deep Vent (NEB) enzimet használunk, amelyre kiemelten magas másolási pontosság jellemző).

A konstrukciók elkészítésével, ellenőrzésével és a Roslin Intézetbe küldésével a kutatási terv ránk eső részét teljesítettük. A külföldi partnernek azonban kezdetben nem sikerült a lentivírus előállítása és ezért azt egy hazai kollaboráció segítségével (Dr. Kvell Krisztián és Dr. Czömpöly Tamás, Pécsi Orvostudományi Egyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, ill. ImmunGenomika Kft) mi is előállítottuk). Kvell és Czömpöly a lentivirussal 293T és Jurkat sejteket fertőztek és a bFcRn transzkripciót ellenőrizték. A kísérletben a Jurkat sejteket sikerült megfertőzni, amelyben a bFcRn alfa-láncáról átíródó mRNS-t ki tudtak mutatni (**2. ábra - RT-PCR**). Ezt követően a Jurkat sejtizátumból Western blottal kimutattuk a bFcRn fehérjét is (**2. ábra - Western**).

2. ábra



-1: víz (negatív kontroll)-2: P2-bFcRn plazmid (pozitív kontroll)-3-4: genomikus DNS kontrollok (kontroll és bFcRn+ 293T sejtekből)-5: kontroll 293T-6: bFcRn+ 293T-7: kontroll Jurkat-8: bFcRn+ Jurkat

Ezzel a kísérlettel igazoltuk, hogy a konstrukció megfelelő promoter szakaszt tartalmaz (a bFcRn transzkripció kimutatható a fertőzött sejtekben), ill. a klónozott cDNS szegmens is intakt, hiszen a Western blot megfelelő méretű fehérje transzlációt mutatott.

A molekuláris munkák mellett, nagy mennyiségű ovalbumin specifikus juh szérumot termeltettünk annak érdekében, hogy a későbbiekben születendő transzgenikus juhokban *in vivo* vizsgálni tudjuk a bFcRn fokozott kifejeződésének biológiai hatását. Mint ismert, az FcRn megvédi az IgG-t a lebomlástól, és az FcRn overexpresszió hatására megnő a beinjektált IgG felezési ideje (csökken a lebomlása) (Bender et al., 2007; Petkova et al., 2006). Az ovalbumin specifikált ellenanyag alkalmazása lehetővé teszi, hogy egy ovalbumin specifikus ELISA rendszerben meghatározzuk a befecskendezett IgG kiürülésének dinamikáját és ezzel ellenőrizzük a transzgenikus birkákban kifejeződő bFcRn funkcionális tulajdonságát.

A Roslin Intézetben 2007-ben sikerrel készítették el a P1-cDNS lentivírus konstrukciót, amellyel sejteket fertőztek, majd a pozitív eredmények után bFcRn transzgenikus egereket állítottak elő. Az egerek hordozzák a bFcRn gént, funkcionális karakterizálásuk jelenleg is tart. Tekintettel arra, hogy a juh szaporodása szezonális (azaz csak a január-februári hónapokban lehet a megfelelő számú zigótákat a vágóhídról beszerezni) a 2007. évben nem, csak a 2008. évben kezdhették meg külföldi kollegáink a tg juh lentivírus transzgenezisét. Az első alkalommal összesen 18 anyajuhot vemhesítettek lentivírus fertőzött zigótákkal (8 állat az általuk előállított P1, 10 állat az

általunk előállított P2 konstrukcióval fertőzött zigótát hordozott). Sajnálatos módon azonban a megszületett bárányok közül egyik sem volt transzgenikus. A kísérleteket 2009-ben folytatjuk.

Konklúzió

A kutatás során az általunk vállalt feladatokat maradéktalanul teljesítettük, illetve az általunk létrehozott lentivírus konstrukciókkal történő validálást a vállalt feladatokon túl is teljesítettük.

A külföldi partner sikerrel hozott létre lentivírus alapú transzgenézissel bFcRn-t hordozó tg egereket, amelyek karakterizálása jelenleg is tart. A transzgenikus juhok előállítása az első alkalommal sikertelen volt, de a munkát közösen folytatjuk.

Hivatkozott irodalmak:

- Bender, B., Bodrogi, L., Mayer, B., Schneider, Z., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Eggen, A., Kacskovics, I., and 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.
- Cervenak, J., and Kacskovics, I. (2008). The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. *Vet Immunol Immunopathol*.
- Cianga, P., Medesan, C., Richardson, J.A., Ghetie, V., and Ward, E.S. (1999). Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. *Eur J Immunol* 29, 2515-2523.
- Kacskovics, I., Bosze, Z., Bender, B., Cervenak, J., and Hiripi, L. (2007). Transgenic animal with enhanced immune response and method for the preparation thereof. I.B.o.t.W.I.P. Organization, ed.
- Kacskovics, I., Kis, Z., Mayer, B., West, A.P., Jr., Tiangco, N.E., Tilahun, M., Cervenak, L., Bjorkman, P.J., Goldsby, R.A., Szenci, O., and 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., and Hammarstrom, L. (2006b). Cloning and characterization of the dromedary (*Camelus dromedarius*) neonatal Fc receptor (drFcRn). *Dev Comp Immunol* 30, 1203-1215.
- Kacskovics, I., Wu, Z., Simister, N.E., Frenyo, L.V., and Hammarstrom, L. (2000). Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc receptor. *J Immunol* 164, 1889-1897.
- Lu, W., Zhao, Z., Zhao, Y., Yu, S., Zhao, Y., Fan, B., Kacskovics, I., Hammarstrom, L., and Li, N. (2007). Over-expression of the bovine FcRn in the mammary gland results in increased IgG levels in both milk and serum of transgenic mice. *Immunology* 122, 401-408.
- Mayer, B., Doleschall, M., Bender, B., Bartyik, J., Bosze, Z., Frenyo, L.V., and Kacskovics, I. (2005). Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. *J Dairy Res* 72 *Spec No*, 107-112.
- Mayer, B., Kis, Z., Kajan, G., Frenyo, L.V., Hammarstrom, L., and Kacskovics, I. (2004). The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. *Vet Immunol Immunopathol* 98, 85-89.
- Mayer, B., Zolnai, A., Frenyo, L.V., Jancsik, V., Szentirmay, Z., Hammarstrom, L., and Kacskovics, I. (2002a). Localization of the sheep FcRn in the mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 327-330.
- Mayer, B., Zolnai, A., Frenyo, L.V., Jancsik, V., Szentirmay, Z., Hammarstrom, L., and Kacskovics, I. (2002b). 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.
- Petkova, S.B., Akilesh, S., Sproule, T.J., Christianson, G.J., Al Khabbaz, H., Brown, A.C., Presta, L.G., Meng, Y.G., and Roopenian, D.C. (2006). Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int Immunol* 18, 1759-1769.
- Roopenian, D.C., and Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7, 715-725.
- Zhao, Y., Kacskovics, I., Zhao, Z., and Hammarstrom, L. (2003). Presence of the di-leucine motif in the cytoplasmic tail of the pig FcRn alpha chain. *Vet Immunol Immunopathol* 96, 229-233.