

A neonatális Fc receptor (FcRn) IgG kötésének és a humorális immunválasz diverzitásának vizsgálata bFcRn transzgenikus egerekben

Készítette:

Szikora Bence

Biológus MSc. V. évfolyam

Témavezetők:

ILIÁS ATTILA Ph.D., tudományos főmunkatárs
Immunológiai Tanszék

KACSKOVICS IMRE D.Sc., habilitált egyetemi docens
Immunológiai Tanszék

XXXII. OTDK Biológia Szekció

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2015

Tartalomjegyzék

Absztrakt	3
Rövidítésjegyzék	4
Bevezetés	5
Célkitűzések	11
Anyagok és módszerek	12
Eredmények és megvitatásuk	15
Összefoglalás.....	25

Absztrakt

A heterodimer neonatális Fc receptor (FcRn) szerkezetileg az MHC-I-szerű molekulák családjába tartozik, amely az FcRn α láncból és egy β_2 -mikroglobulin fehérjéből épül fel. Központi szerepet tölt be a maternális immuntranszportban, megakadályozza az IgG és az albumin lebomlását, és ez által szabályozza e két kulcsfontosságú molekula homeosztázisát, valamint részt vesz az antigén-IgG immunkomplex antigén-prezentációjában. Az ELTE Immunológiai Tanszék FcRn munkacsoportja olyan transzgenikus (Tg) egerek immunválaszát kutatja, amelyek az endogén egér FcRn mellett, további 5 kópia szarvasmarha FcRn (bFcRn) α láncot fejeznek ki. A bFcRn α lánc képes funkcionálisan működő molekulát kialakítani az egér β_2 -mikroglobulinnal, így ezekben az állatokban az ún. „hibrid” FcRn is kifejeződik. Ezen egereknek számos előnyös tulajdonságát írták már le, így megnőtt bennük az IgG fél-élet ideje, gyengén immunogén antigénekkal szemben is sikerült ellenanyagot termelniük, több antigén-specifikus IgG-t termelnek, valamint lépük és nyirokcsomóik lényegesen több antigén specifikus B- és T helper-sejtet tartalmaznak.

Munkám során egyfelől a transzgenikus egerekben kifejeződő egér, illetve az ún. „hibrid” FcRn és a különböző egér IgG izotípusok kölcsönhatásának *in vitro* vizsgálatát végeztem el felületi plazmon rezonancia (SPR) módszerrel. Ennek során meghatároztam a pH függő IgG kötés kinetikai paramétereit. Kimutattam, hogy az egér és a hibrid FcRn nagyon hasonló kinetikai paraméterek mellett köti az egér IgG izotípusait.

Mivel a bFcRn transzgenikus egerekben fokozott immunválasz figyelhető meg, kíváncsiak voltunk arra, hogyan befolyásolja ez a humorális immundiverzitást. Vizsgálataim másik részében ezt a kérdést Western blot technikával elemezve kimutattam, hogy a transzgenikus egerekben egy nagyméretű antigén (KLH) ellen termelődött IgG típusú ellenanyagok a KLH fehérjében több epitópot ismernek fel, mint a vad típusú egerekből származó antitestek. Ezáltal sikerült alátámasztanunk azt a feltételezést, hogy a bFcRn transzgenikus egerekben termelődött antitesteknek nagyobb a diverzitása, amelynek következménye, hogy ezek az állatok egy kevésbé immunogén epitóp ellen is hatékonyabban termelnek ellenanyagot, mint vad típusú társaik.

Rövidítésjegyzék

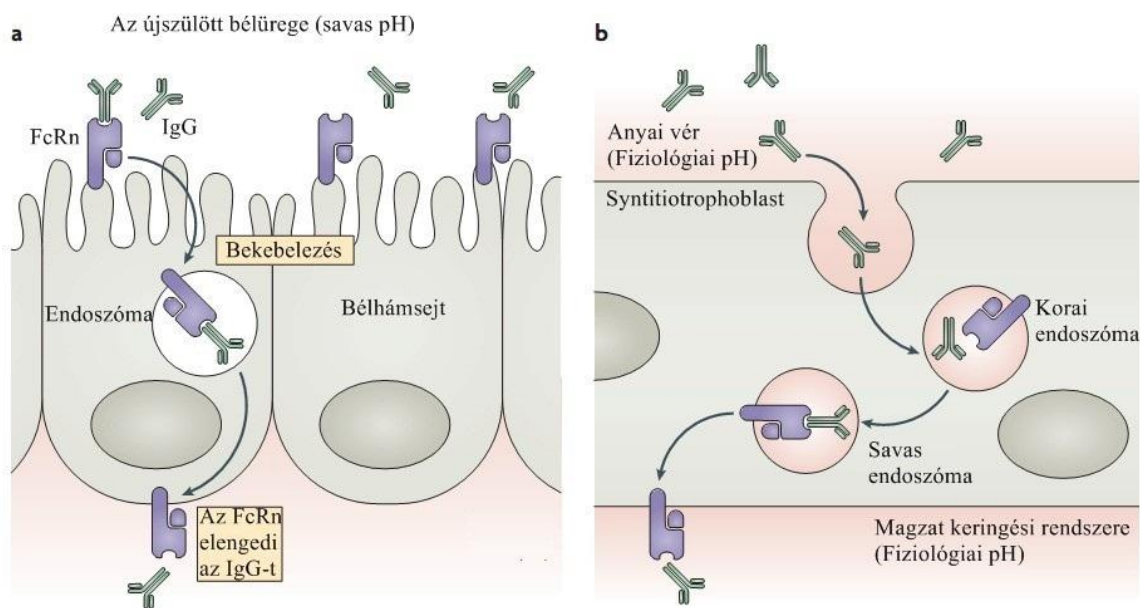
APC	professzionális antigén bemutató sejt
bFcRn	bovin neonatális Fc receptor
CFA	komplett Freund adjuváns
C _H 2-C _H 3	IgG nehéz lánc 2-es és 3-as konstans doménje
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
FBS, FCS	magzati borjú szérum
FcRn	neonatális Fc receptor
IFA	inkomplett Freund adjuváns
K _D	egyensúlyi disszociációs állandó
KLH	kulcslyuk csiga hemocianin (keyhole limpet hemocyanin)
k _{off}	disszociációs kinetikai konstans
k _{on}	asszociációs kinetikai konstans
mAb	monoklonális ellenanyag (monoclonal antibody)
MHC-I	fő hisztokompatibilitási komplex -I (major histocompatibility complex -I)
O/N	12-16 órás (overnight) inkubálás
OVA	Ovalbumin
PBS	foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat (phosphate buffered saline)
PBS-T	foszfát puffer – Tween oldata – Detergenst (Tween-20) tartalmazó PBS
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> ovárium sejt
SPR	felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance)
Sulfo-NHS	sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide
TCR	T-sejt receptor
TNP	trinitrofenil (hapten)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

Bevezetés

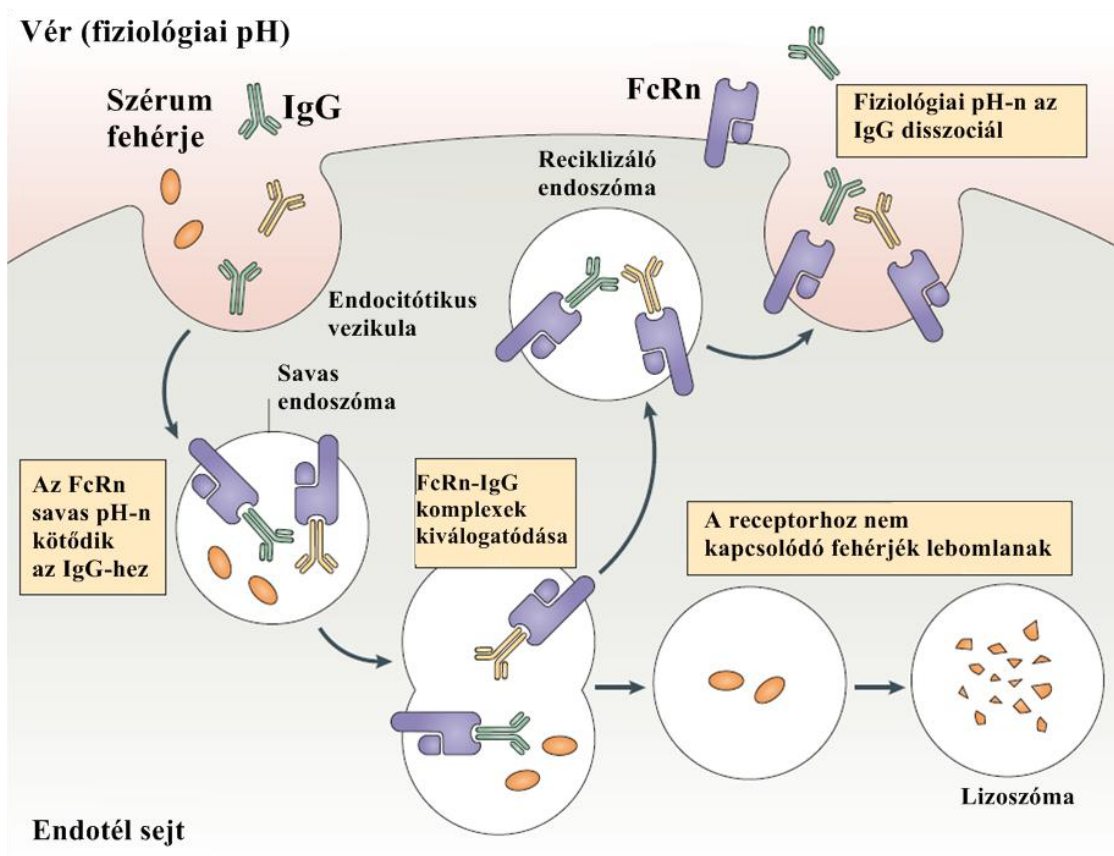
A Köhler és Milstein által felfedezett hibridóma technológia (1975), és a monoklonális antitestek (mAb) gyártása óriási előrelépést jelentett a gyógyászatban és kutatásban egyaránt. A terápiás alkalmazások új tárházát nyitotta meg, specifikusan és nagy szelektivitással célozva olyan kulcsfontosságú molekulákat, amelyek a szervezet részeként vesznek részt különféle patológiás folyamatok kiváltásában, vagy éppen szabályozásában. Ezen kívül a biológiai kutatások esetén is sikerrel tudjuk alkalmazni a nagyon specifikus felismerést biztosító, egységes és elvileg korlátlan mennyiségben rendelkezésre álló monoklonális ellenanyagokat. Köhler és Milstein korszakalkotó felfedezését 1984-ben Nobel-díjjal jutalmazták. Azóta már sokat fejlődött a monoklonális ellenanyagok előállítása, és humán gyógyászati felhasználásuk is egyre hatékonyabb lett. Ma már számos betegséget kezelnek monoklonális antitest terápiával, kezdve a transzplantációs, szív és érrendszeri problémáktól, az autoimmun betegségeken át egészen a tumor terápiákig [1]. Az első, monoklonális ellenanyagot 1986-ban alkalmazták az orvoslásban (Muromonab-CD3, OKT3), és azóta, például tumoros megbetegedések kezelésében már 14 különböző mAb-ot használnak, ill. több száz új készítményt tesztelnek klinikai vizsgálatok során [2]. Mostanra majdnem az összes ismert, könnyen támadható célpont ellen készült terápiás ellenanyag (vagy fejlesztés alatt áll). Ugyanakkor, számos betegség esetén ismerünk olyan célpontokat, amelyek gátlásával, vagy aktiválásával eredményeket lehetne elérni a betegség gyógyításában, vagy a diagnózisában, de ezek ellen a szokásos technikákkal nehéz vagy nem is lehetséges ellenanyagot előállítani. E probléma megoldásában segítő sokféle új technológia egyike az ELTE Immunológiai Tanszék FcRn munkacsoportja és a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont által létrehozott transzgenikus egerek alkalmazása, amelyek az endogén egér FcRn mellett, további 5 kópia szarvasmarha FcRn α láncot (bFcRn) fejeznek ki [3].

A neonatális Fc receptort (FcRn) először az 1970-s években azonosították, mint egy olyan receptor molekulát, amely képes az anyai tejben lévő ellenanyagokat az újszülött patkány vékonybelében megkötni, és az utód véráramába juttatni (1. ábra). Később számos más fajban is igazolták az FcRn jelenlétét, ami azt sugallja, hogy az összes emlős fajban fontos szerepet tölt be ez a receptor [4]. Az FcRn részletesebb vizsgálata során egyre több funkciójára derült fény. Kiderült, hogy megakadályozza az IgG lebomlását és így megnöveli a fél-élet idejét. Ezt, és a többi funkcióját is úgy képes végrehajtani, hogy a többi Fc receptortól eltérően, különféle intracelluláris kompartmentekben (kivétel az újszülött enterociták esetén, ahol a receptor a sejtek apikális felszínén található), szigorúan pH függő módon kapcsolódik az IgG

molekulához. Ez azt jelenti, hogy enyhén savas közegben (pH 6,0-6,5) kialakul a kapcsolat a két molekula között, míg fiziológias körülmények között (pH 7,4) az FcRn–IgG komplex disszociál (2. ábra). Ezt az IgG C_{H2}-C_{H3} kapocs régiójának két különböző részén elhelyezkedő hisztidin aminosavak (His310 ill. His433 és His435) protonáltsági állapotának változása, és az FcRn felszínén elhelyezkedő savas aminosavakkal történő ionos interakciója okozza. Mivel a kölcsönhatásban szereplő összes aminosavat ismerik, azok módosításával igyekeznek befolyásolni az interakció létrejöttét, erősségét [5].

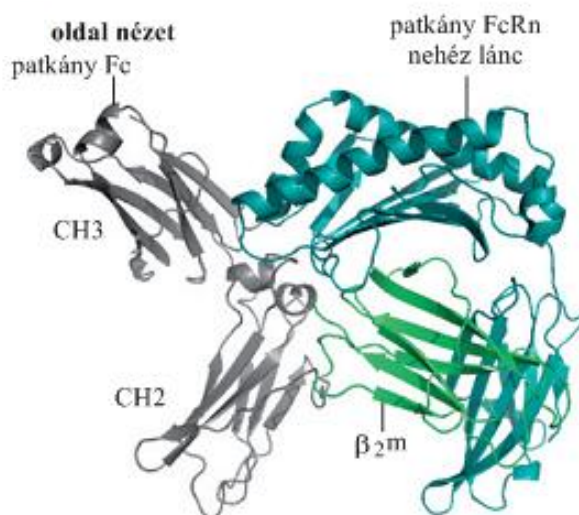


1. ábra Az FcRn szerepe a maternális immuntranszportban. A rágszálókban a születés után, vékonybélén keresztül (a), míg a főemlősökben a magzati élet alatt, a placentán keresztül történik az immuntranszport (b) [5].



2. ábra Az endotél sejtek (és monociták) szerepe az IgG lebontás megakadályozásában. Az FcRn-t kifejező sejtek nem specifikus endocitózissal felveszik az IgG-t. Az FcRn a savas endoszómákban található, ahol alacsony pH-n képes hozzákapszolni az ott található IgG molekulákhoz. Ezek után a kialakult komplex visszakerül a sejt felszínére, ahol semleges pH-n az IgG disszociál a receptorról [5].

Ezekon a tulajdonságokon kívül már az FcRn szerkezetéről és az IgG kötés kialakításáról is sok információval rendelkezünk. Az FcRn heterodimer receptor, amit egy MHC-I-szerű nehéz lánc (α lánc) és egy β_2 -mikroglobulin könnyű lánc alkot. Az FcRn-IgG Fc együttes kristályszerkezet elemzésével megállapították, hogy az FcRn a többi Fc receptortól eltérően az IgG C_H2-C_H3 domének közötti régióhoz kötődik (3. ábra). Az interakció sztöchiometriája 2:1, azaz 2 FcRn molekula köt 1 IgG molekulát, és ha az FcRn hozzákötődik az IgG egyik kötőhelyéhez, akkor a másik kötőhely affinitása csökken [6, 7]. Ugyanakkor kimutatták, hogy nem minden esetben képződik 2:1 arányú komplex, hanem 1:1 sztöchiometriájú kölcsönhatás is előfordul [8].



3. ábra: Az FcRn az IgG C_H2-C_H3 kapocs régiójához kapcsolódik [5].

A 2000-es évek elején azt is felfedezték, hogy az IgG mellett az albuminhoz is képes kötődni ez a receptor, és ugyanúgy képes megóvni ezt a fehérjét is az intracelluláris lebontástól. A kapcsolódás ebben az esetben is pH függő, de az albumin és az IgG egymástól függetlenül kapcsolódnak az FcRn-n két különböző régiójához. FcRn génkiütött egerekben figyelték meg, hogy ennek a két fehérjének a fél-élet ideje 6-8 napról 1 napra csökkent, ami egy átlagos vészérum fehérje fél-élet idejének felel meg. Ezzel is igazolták, hogy e két fontos vérplazma fehérje védelméért az FcRn felelős. Az IgG és az albumin az emberi vészérum fehérjéknek kb. 90 %-át alkotja, ezért is nagyon fontos, hogy az FcRn képes szabályozni e két kulcsfontosságú molekula homeosztázisát [5, 9].

Az IgG és albumin lebomlásának megakadályozása mellett az FcRn részt vesz az antigén-IgG immunkomplexek antigén prezentációjában is. Ahhoz, hogy az adaptív immunválasz során a T-sejtek aktiválódjának, többek között a T-sejt receptoron (TCR) keresztül fel kell ismerniük az MHC-peptid komplexet. A professzionális antigén prezentáló sejtekben (APC: makrofágok, dendritikus sejtek, B-limfociták) kimutatták az FcRn kifejeződését, és igazolták, hogy ezekben a sejtekben az FcRn a felvett monomer IgG-t, az endotél sejtekhez hasonlóan visszajuttatja az extracelluláris térbe. Ugyanakkor, ha az APC sejtekbe antigén(Ag)-IgG immunkomplexek(IC) kerülnek (pl. az APC sejtek membránkötött Fcγ receptorai révén), az FcRn az Ag-IgG IC-t a lizoszómába juttatja, ezzel támogatva az antigén proteolízisét és az ezáltal létrejött epitópok integrálódását az MHC II molekulákba. Ennek köszönhetően az FcRn központi szereppel vesz részt az antigén prezentációs folyamatokban, a T helper sejtek

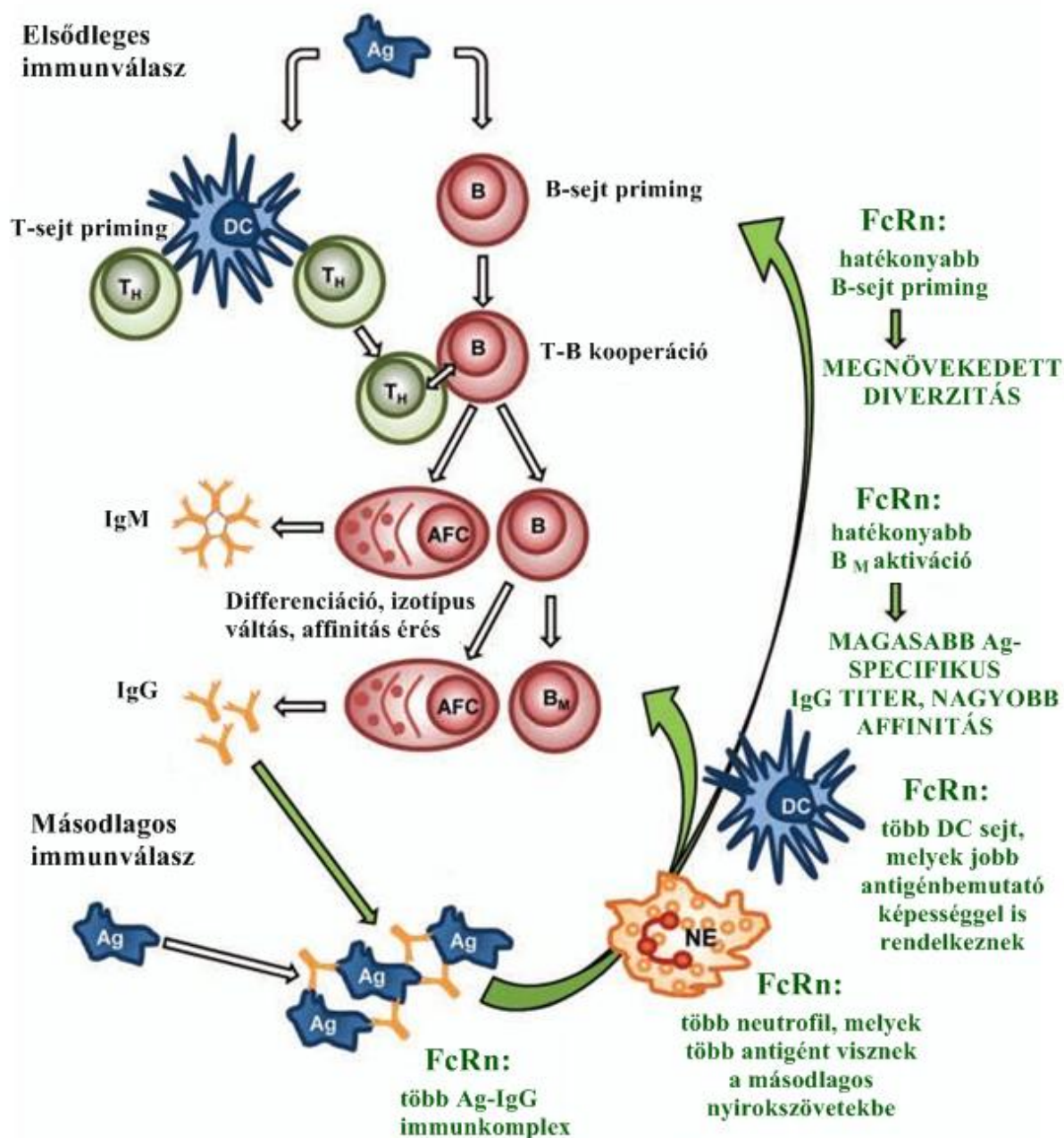
aktiválásában, különösen a másodlagos immunválasz fázisában (amikor már megjelent az Ag-specifikus IgG). (Az utóbbi időben azt is kimutatták, hogy az APC sejtekben az FcRn az ún. kereszt-prezentációs folyamatokban is kulcsszerepet tölt be, amelynek eredményeként az antigénekből származó oligopeptidek az MHC I molekulával kerülnek bemutatásra, azáltal aktiválva a citotoxikus T sejteket) [10].

Láthatjuk tehát, hogy a neonatális Fc receptor a jól működő immunválasz alapvető szereplője, és mivel szerepet játszik a terápiás ellenanyagok lebomlásában, a gyógyszeripar szempontjából is érdekessé vált ez a receptor. Ma már úgy próbálják módosítani a terápiás antitestek FcRn-hez kötődő Fc régióit, hogy enyhén savas körülmények között nagyobb affinitással kapcsolódjon ehhez a receptorhoz, amivel elérhető, hogy kevésbé bomlik le és hosszabb fél élet idővel rendelkezik. Ezáltal növelhető a gyógyszerek ismételt beadása között eltelt idő, és ritkábban kell a pácienseknek kezelésekre járniuk. Ezen kívül egyéb, nem ellenanyag típusú gyógyszermolekulákat is rekombináns módon fuzionáltatják az IgG Fc régiójával (Fc fúziós fehérjék), hogy csökkenjen a vérből való kiürülésük (pl. CNTO 530) [11].

Az FcRn kifejeződésének fokozásával a humorális immunválasz jelentősen fokozható. Ez olyan állatokban előnyös, amelyeket poliklonális vagy monoklonális ellenanyagok előállítására használnak. A kutatócsoportunk által létrehozott, bFcRn transzgenikus egerek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a vad típusú társaikhoz képest. Kimutatták, hogy ezekben a transzgenikus egerekben megnőtt a szérum IgG szintje, köszönhetően annak, hogy csökkent az IgG lebomlása, és nőtt az antigén-specifikus IgG-t termelő B limfociták száma, ezek antigén-specifikus IgG termelése. Immunizálást követően, ezeknek az állatoknak a lépe sokkal nagyobb, sokkal több B-sejtet, plazmasejtet, neutrofil granulocitát és dendritikus sejtet tartalmaz, mint a normál egereké. Ezen kívül a transzgenikus egerekből származó dendritikus sejtek antigén-prezentáló képességét is vizsgálták. A kísérlet során csontvelő eredetű dendritikus sejtekhez OVA-IgG immunkomplexeket adtak és megállapították, hogy az FcRn-t nagyobb mértékben kifejező dendritikus sejtek antigén bemutató képessége jelentősen nagyobb a kontroll állatok hasonló sejtjeihez képest [12]. Mindezek fokozottabb immunválaszra utalnak, amely abban is megnyilvánult, hogy gyengén immunogén antigének ellen is sikerült nagy mennyiségű ellenanyagot előállítani, illetve, hogy több antigén specifikus hibridómát sikerült létrehozni belőlük [3, 12].

A rendelkezésre álló ismeretek alapján létrehoztak egy feltételezett modellt arra, hogy az FcRn overexpresszió hogyan játszhat szerepet a megnövekedett humorális immunválaszban (4. ábra). Ezekben a transzgenikus állatokban oltás után jóval több antigén specifikus IgG

termelődik, köszönhetően az FcRn általi védelemnek, ami egy újraoltást követően több Ag-IgG immunkomplexet eredményez. A transzgenikus dendritikus sejtek hatékonyabb antigén-prezentációja több antigén-specifikus T_H-sejtet aktivál, amelyek nagyobb mértékű naív B-sejt aktiválódást okoznak. Ennek köszönhetően fokozott számú antigén specifikus memória B-sejt és plazmasejt termelődik. Ez diverzebb humorális immunválaszt, nagyobb titert és akár nagyobb affinitású antigén specifikus ellenanyagokat eredményez [4].



4. ábra Az FcRn overexpresszió feltételezett szerepe a megnövekedett humorális immunválasz létrejöttében.
Ag=antigén, B=B-sejt, T_H=T helper sejt, NE= neutrofil granulocita, DC= dendritikus sejt, B_M= memória B-sejt
AFC= plazma sejt (magyarázat a szövegben)[4].

Célkitűzések

A vizsgálataink során két fő kérdés foglalkoztatott minket. Bár a korábbi mérésekből következtettünk arra, hogy az egerekben nagy mennyiségben kifejeződő bovin FcRn (bFcRn) az egér β_2 -mikroglobulinjával heterodimert alkotva (bFcRn/m β_2 m; „hibrid” FcRn) képes az egér IgG-vel kapcsolódni, azonban közvetlen módon, fehérje-fehérje kölcsönhatást mérő módszerrel még nem bizonyítottuk a kapcsolat létrejöttét. Azt sem tudtuk, hogy van-e különbség a hibrid FcRn és az egyes egér IgG izotípusok (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) interakciójában, ill. hogyan hasonlítható ez a kapcsolat az endogén egér FcRn és az egér IgG izotípusok kapcsolatához, módosulhat-e az egér immunválaszának IgG izotípus-specifikus jellege. Ennek egyik első vizsgálatához a felületi plazmon rezonancia (SPR) technikával az egér FcRn és a hibrid FcRn interakcióit az egér IgG különféle izotípusaival kívántuk elemezni. Az ehhez szükséges szolubilis (azaz a membránhoz történő kikötődéshez szükséges, de az IgG kötésben részt nem vevő transzmembrán és citoplazmikus doméneket nem tartalmazó) bFcRn/m β_2 m fehérjét rekombináns módon, bakulovírus expressziós rendszerben állítottuk elő és SPR módszerrel meghatároztuk a különböző egér IgG alosztályokkal kialakított kölcsönhatásának kinetikai paramétereit, összehasonlítva az egér saját, endogén FcRn szintén szolubilis formája (mFcRn/m β_2 m) esetében kapott értékekkel.

Kísérleteink másik részében a bFcRn transzgenikus egerek humorális immunválaszának egy újabb elemét terveztük vizsgálni. Azt már korábban láttuk, hogy ezekben az állatokban nagyobb mennyiségű antigén-specifikus ellenanyag keletkezik, és sikerült azt is kimutatni, hogy a transzgenikus állatokban keletkező, ovalbumin specifikus IgM izotípusú ellenanyagoknak nagyobb a diverzitása, mint a vad típusú társaikban keletkezőké. Azonban ezt ovalbumin specifikus IgG molekulák esetén nem sikerült egyértelműen igazolni. Ezért kísérleteinkben egy másik módszerrel vizsgáltuk a transzgenikus egerek humorális immunválaszának sokszínűségét, diverzitását, vagyis azt, hogy egy adott antigén hányféle epitópja ellen termelődik bennük ellenanyag. Ehhez TNP-KLH antigénnel oltottunk transzgenikus és vad típusú egereket, majd az állatokból nyert szérumokkal, és részlegesen emésztett KLH mintákkal Western blot elemzést végeztünk.

Anyagok és módszerek

Rekombináns bakulovírus amplifikálása. A rekombináns szolubilis bFcRn fehérjét bakulovírus expressziós rendszerben állítottuk elő (BaculoGold Transfection Kit, BD Biosciences) A szolubilis bFcRn és m β_2 m cDNS-ét tartalmazó bakulovírus transzfer vektort (pAcUW51-bFcRn-m β_2 m) témavezetőm, Iliás Attila készítette el. Az Sf9 rovarsejteket 10% FBS-t (Sigma-Aldrich) és 1% Penicillin-Streptamicin oldatot (Sigma-Aldrich) tartalmazó TNM-FH (Sigma-Aldrich) médiumban tenyésztettük 27 °C-on.

A ko-transzfekeciót követő 4. napon a sejtek felülszóját 7 ml friss médiummal együtt 50 % konfluenciájú, Sf9 sejteket tartalmazó 25 cm²-s flaskába (Corning) raktuk. Egy hét múlva 1 ml, a kis flaskából származó, vírust tartalmazó felülszót 15 ml friss médiummal együtt 50 % konfluenciájú, Sf9 sejteket tartalmazó 75 cm²-s flaskába (Corning) helyeztük. Egy hét múlva ugyanezt végeztük el 175 cm²-s flaskában (Corning) is (70 % konfluencia, 25 ml friss médium).

Sf9 sejtek fertőzése fehérjetermelés céljából. 70%-os konfluenciájú Sf9 sejtekhez (75 cm²-es flaska) 6 ml friss médiumot, és 3 ml, vírust tartalmazó felülszót adtunk. Egy órát hagytuk a sejteket szobahőmérsékleten, majd 16 ml friss médiumot raktunk a sejtekre és 3-4 nap múlva a sejtek felülszójából kitisztítottuk a fehérjénket.

bFcRn/m β_2 m fehérje tisztítása Sf9 sejtek felülszójából. A bFcRn α lánc C-terminálisán 6x His-tag található, amelyet felhasználva a fehérjénket nikkel affinitás kromatográfiával tisztítottuk meg. A fertőzött Sf9 sejtek felülszóját 1:1 arányban összekevertük kötő pufferrel (50 mM foszfát puffer, 500 mM NaCl, 2 mM imidazol, pH 8,0), majd 10kDa-os koncentrálócsőben (MWCO 10.000, Millipore) centrifugáltuk az oldatot (2800 rpm, 30 perc, 4 °C). A koncentráció után az oldatot 30 ml-re egészítettük ki kötő pufferrel. Ehhez 1.5 ml előkészített nikkel agaróz gyöngyöt (His-select Nikkel, Sigma-Aldrich) pipettáztunk, és állandó kevergetés mellett szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáltunk. Ezt követő ülepítés után (4°C, 30 perc) a gyöngyökről leszívtuk a felülszót, helyére 10 oszloptérfogatnyi (15 ml) kötési puffert pipettáztunk, és állandó kevergetés mellett szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig. Ezt a lépést még egyszer megismételtük. Az eluálás során az agaróz gyöngyöket egy oszlopba töltöttük, majd 50 oszloptérfogatnyi mosó pufferrel (50 mM foszfát puffer, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) mostuk, végül kétszer 7 ml elúciós pufferrel (50 mM foszfát puffer, 500 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0) eluáltuk a fehérjéket az oszlopról. Az eluátumot új koncentráló csőbe (MWCO 10.000) gyűjtöttük össze, amelyet rögtön centrifugáltunk (2800 rpm, 30 perc, 4°C). Ezután a koncentrált mintához 14 ml PBS,

pH 6.0 oldatot (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) öntöttünk és újra centrifugáltunk (2800 rpm, 30 perc, 4°C). Ezt a lépést még kétszer megismételtük. Végül a 250 µl bFcRn/mb2m mintát egy Eppendorf csőbe pipettáztuk és a későbbi felhasználásig lefagyasztottuk.

Felületi plazmon rezonancia (SPR). Az SPR vizsgálatokat az ELTE TTK, Biológiai Intézetében a ProteOn™ XPR36 (Bio-Rad) készüléken végeztük el. Egy GLC chip felszínére amino csoporton keresztül immobilizáltuk az általunk előállított bFcRn/mb₂m, és mFcRn/mb₂m fehérjét, ez utóbbit (és a Western blothoz kontrollnak használt hFcRn/hb₂m fehérjét) kollaboráció keretében Dr. Sally Ward-tól (UT Southwestern Medical Center at Dallas, USA) kaptuk. Az immobilizáció során a gyártó protokollja szerint jártunk el: a chip felszínén található karboxil-csoportokat 40 mM EDAC és 10 mM Sulfo-NHS 1:1 arányú keverékével aktiváltuk, majd a fehérjék felkötését 10 mM Na-acetát pufferben (pH 4,5), 30 µl/perc áramlási sebességgel végeztük, végül a felszínen szabadon maradt reaktív helyeket 1 M etanolamin-HCl (pH 8,5) reagenssel blokkoltuk. Kontrollként az egyik csatornát üresen hagytuk, amelynek felszínét szintén kezeltük ugyan, de az immobilizációs puffer itt nem tartalmazott fehérjét. Futtató pufferként PBS-T oldatot (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,005% Tween 20, pH 6,0 vagy pH 7,4) használtunk. Az FcRn és az IgG molekulák kölcsönhatásának vizsgálata során a különböző egér IgG alosztályokat (mIgG₁, mIgG_{2a}, mIgG_{2b}, mIgG₃, Southern Biotech) 0,21-133 nM koncentrációban injektáltuk a chip felszínére, 100 µl/perc áramlási sebességgel, 25°C-on. A mérések utáni regenerációhoz, a disszociáció elősegítésére 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 oldatot használtunk. Minden esetben a nem specifikus jelek kiküszöbölésére a kontroll üres felszín, valamint a futtató pufferrel történő injektálás során kapott értékekkel korrigáltuk a szenzorgrammokat. A kiértékelést a ProteOn Manager 3.1.0.6 szoftverrel (Bio-Rad) végeztük, amelynek során a szenzorgrammokra a heterogén ligand modellt felhasználva görbéket illesztettünk és meghatároztuk a k_{on} és a k_{off} értékeket, majd ezekből kiszámítottuk a kölcsönhatásra jellemző affinitás (K_D) értéket ($K_D = k_{off}/k_{on}$).

Egerek. A diverzitás vizsgálatokhoz olyan hemizigóta, BALB/c genetikai háttérű transzgenikus nőstény egereket használtunk, melyek az endogén egér FcRn-t kódoló FCGRT gén mellett, további 5 kópia szarvasmarha FcRn α -láncot kódoló gént (szarvasmarha FCGRT) hordoznak és fejeznek ki (BALB/c_Tg5_bFCGRT) [15]. Kontrollként vad típusú, BALB/c háttérű alomtárs nőstényeket használtunk. A kísérleteket az ELTE Immunológiai Tanszékén végeztük a Pest Megyei Kormányhivatal, Élelmiszerlánc-Biztonsági és Állategészségügyi

Igazgatósága által kiadott 22.1/828/003/2007 és XIV-I-001/517-4/2012 számú engedélyek alapján.

Az egerek immunizálása TNP-KLH-val. Négy BALB/c_Tg5_bFCGRT és négy vad típusú egeret immunizáltunk 200 µg TNP-KLH konjugátummal, intraperitoneálisan (ip.), komplett Freund adjuváns (CFA, Sigma-Aldrich) hozzáadása mellett. Ezt kétszeri ip. ráoltás követte 100 µg antigénnel, inkomplett Freund adjuváns (IFA, Sigma-Aldrich) használatával a kísérlet kezdetétől számított 21. és 43. napon. Az immunizálástól számított 0., 14., 28., 50., 70. napon vérmintákat vettünk az állatokból.

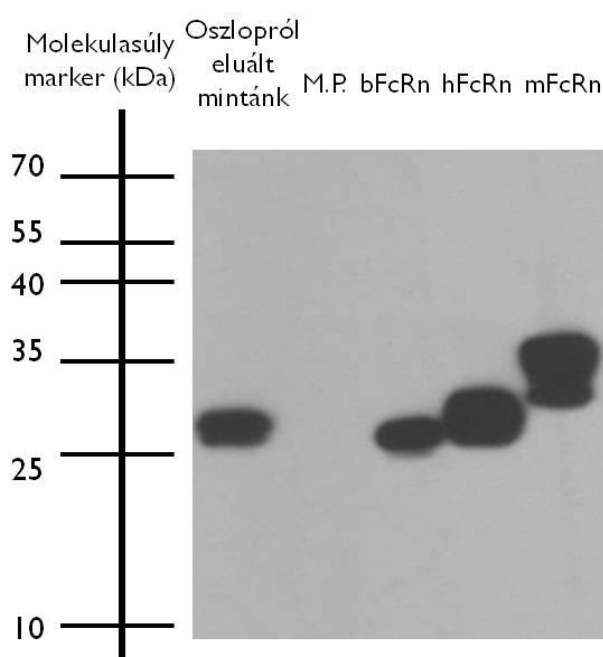
Részleges enzimatis emésztés. A KLH (*Megathura crenulata* hemocianin, Sigma-Aldrich) részleges proteolízisét 37 °C-on, 0,13M glicin/NaOH pH 9,6 oldatban (1 mg/ml) végeztük szarvasmarha tripszin (Boehringer Mannheim) és sertés elasztáz (Sigma-Aldrich) hozzáadásával [13, 14]. Az elasztázt (1 mg/ml), illetve a tripszint (2,5 mg/ml) egyaránt 0,1 M Tris, pH 8,0 oldatban oldottuk fel. A KLH és az elasztáz emésztési aránya 50:1, míg a KLH és a tripsziné 4,8:1 volt. Az emésztést különböző ideig (1 perc – 5 óra) végeztük, és a reakciót 5x redukáló mintafelvívő puffer, pH 6.8 (313 mM Tris-Cl, 5% SDS, 5% β-merkaptóetanol, 50% glicerin, 0,002% brómfenolkék) hozzáadásával állítottuk le.

SDS-PAGE. A poliakrilamid gélelektroforézis során 15 %-os gélben, redukáló körülmények között analizáltuk az emésztett mintáinkat. Molekulasúly markerként Page Ruler Prestained Protein Ladder-t (Thermo Scientific) használtunk. A gél ezek után Comassie Brilliant Blue festékkel festettük meg a fehérje fragmensek láthatóvá tétele érdekében.

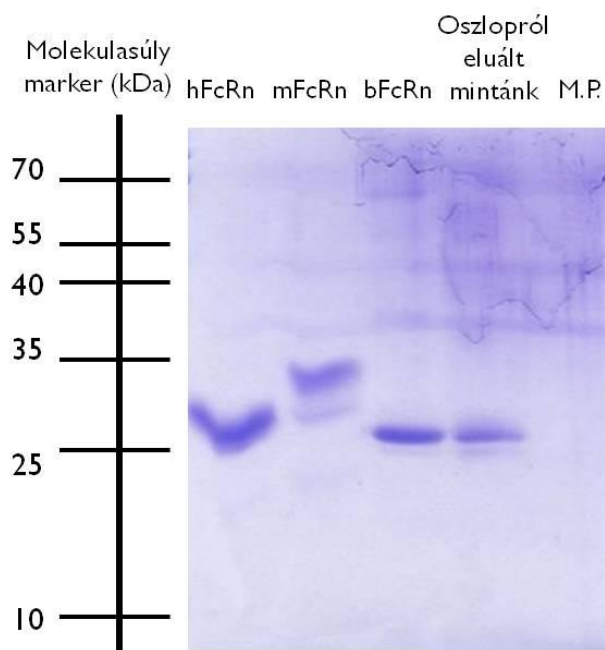
Western blot. A KLH emésztés vizsgálatoknál a Coomassie festés alapján kiválasztott körülmények között emésztett mintánkat (50 µg emésztett KLH) egyetlen, egész gélre kiterjedő zsebbe töltöttük, majd szétválasztottuk poliakrilamid gélelektroforézis segítségével (15%-os gél), redukáló körülmények között, végül a fehérjét PVDF membránra (Immobilon-P, Millipore) elektroblottoltuk. Ezután a PVDF membránt több részre felvagtuk. Az elsődleges ellenanyagok az egerekből származó szérum minták voltak 2000×-es hígításban. Másodlagos ellenanyagként HRP-vel konjugált kecske anti-egér IgG-t (Southern Biotech) használtunk 10000×-es hígításban. A detekció kemilumineszcens szubsztrát (Supersignal West Pico, Thermo Scientific) felhasználásával, autoradiográfiával történt. A nikkel affinitás kromatográfiával történt tisztítás ellenőrzéséhez ugyanúgy 15%-os poliakrilamid gél használtunk. Elsődleges ellenanyagként egér anti-His tag-et (AbD serotec) használtunk 1000× hígításban. A többi lépést (másodlagos ellenanyag, detekció) ugyanúgy végeztük el, mint ahogy korábban leírtuk.

Eredmények és megvitatásuk

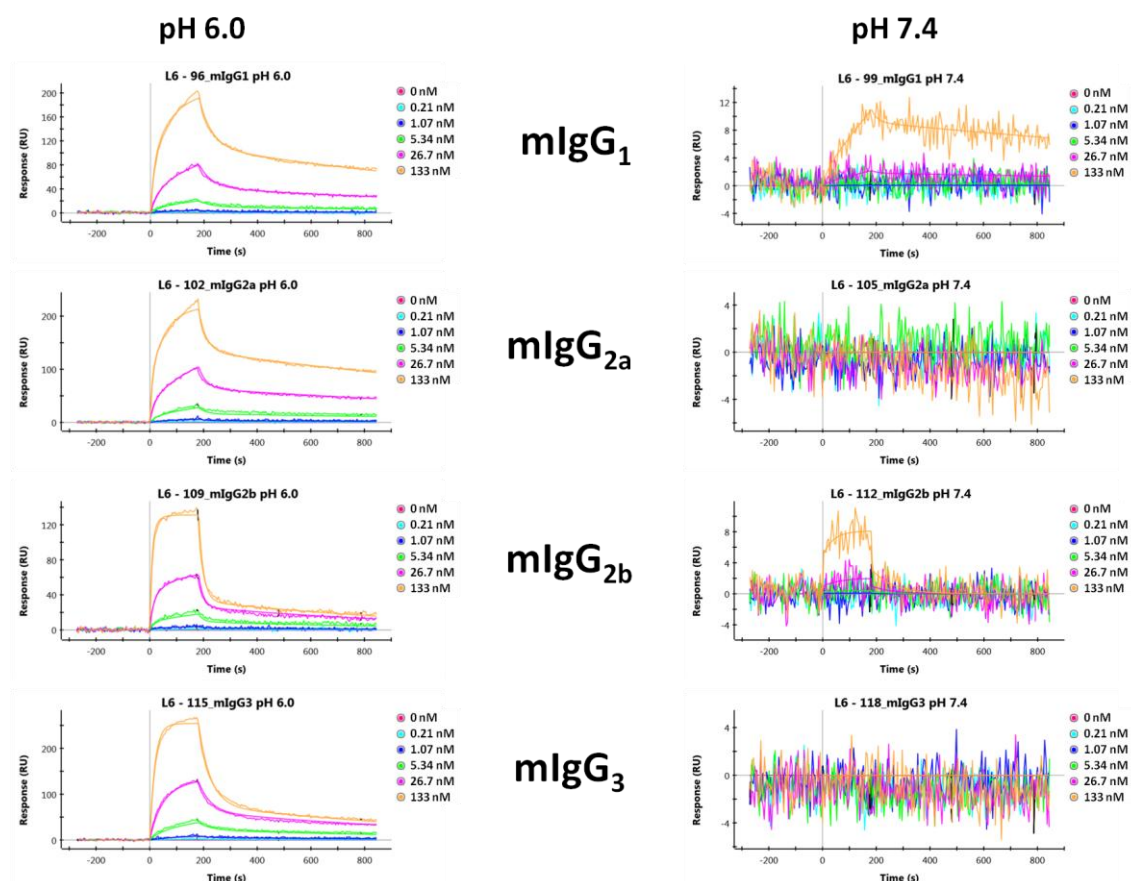
A bFcRn/m β ₂m előállítás és tisztítása. A hibrid FcRn molekulát bakulovírus expressziós rendszer használatával Sf9 rovarsejtekben állítottuk elő (BaculoGold Transfection Kit, BD Biosciences). A sikeres ko-transzfekció és a vírus amplifikálása (ezeket témavezetőm, Dr. Iliás Attila végezte el), valamint nagy mennyiségű Sf9 sejt fertőzése után a felülúszóból nikkel affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk a rekombináns fehérjét. A tisztítás után a bFcRn/m β ₂m fehérje jelenlétét Western blottal és Coomassie festéssel is ellenőriztük (5. és 6. ábra).



5. ábra: A nikkel affinitás kromatográfiával végzett tisztítás ellenőrzése Western blot analízissel. M.P.=mosó puffer (negatív kontroll). Elsődleges ellenanyagként egér anti-His tag-et használtunk 1000× hígításban.

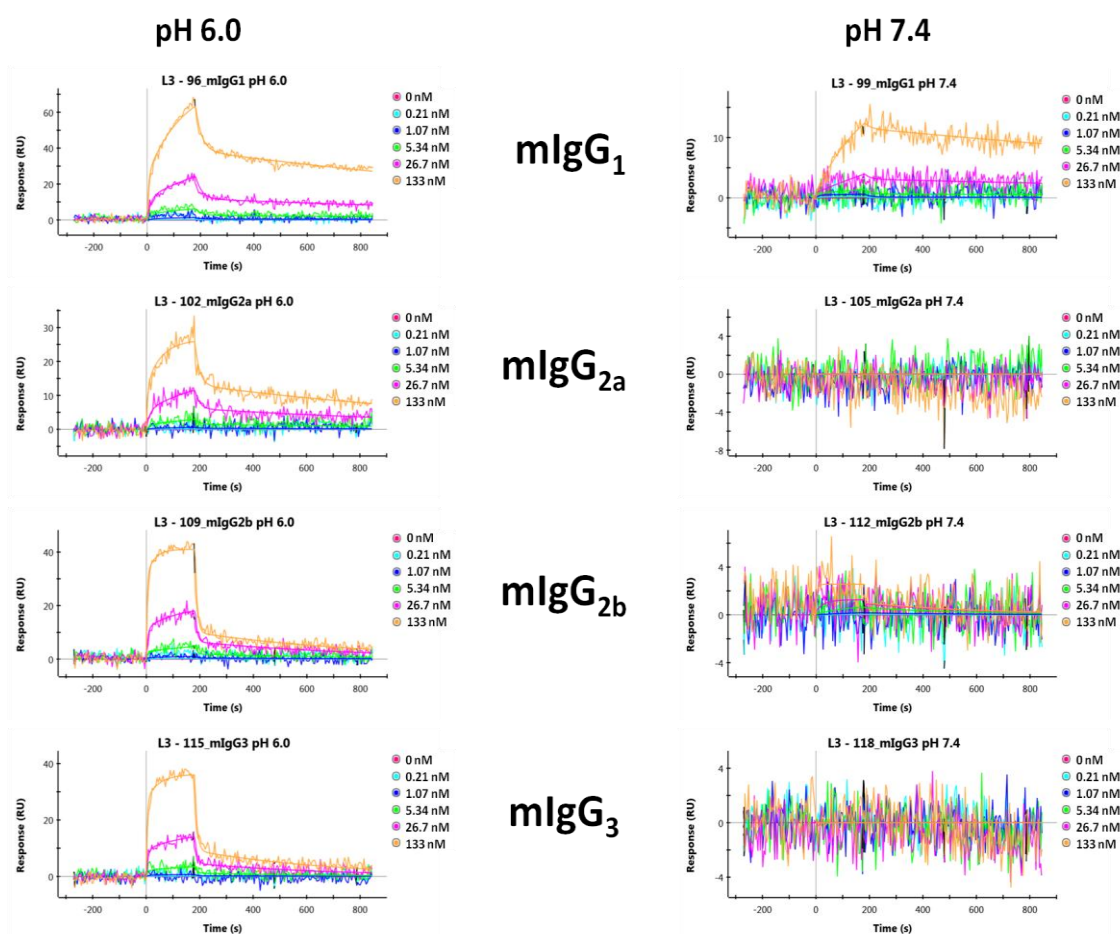


6. ábra: A nikkel affinitás kromatográfiával végzett tisztítás ellenőrzése Coomassie festéssel. A hFcRn-et, a mFcRn-t és a bFcRn-t pozitív, míg a mosó puffert (M.P.) negatív kontrollként használtuk.



7. ábra A mFcRn/m β_2 m és egér IgG alosztályok kölcsönhatásának analízise SPR módszerrel. A mFcRn/m β_2 m fehérjét amino csoporton keresztül immobilizáltuk (kb. 2100 RU) a GLC chip felszínére. Ezek után az egér IgG alosztályokat különböző koncentrációban (0,21-133 nM), 100 μ l/perc sebességgel, 25 °C-on injektáltuk a chipre. A kölcsönhatást pH 6.0-on (bal oszlop), és pH 7.4-en (jobb oszlop) is megvizsgáltuk.

A kötődési kinetika meghatározása SPR módszerrel. A vizsgálatban az endogén egér FcRn-t (mFcRn/m β 2m) és csak a bFcRn transzgenikus egerekben előforduló, ún. hibrid FcRn-t (bFcRn/m β 2m) immobilizáltuk a GLC chip felszínére, és a különböző egér IgG alosztályok felületre injektálása során határoztuk meg a kinetikai paramétereket. Mindkét vizsgált FcRn molekula és az egér IgG alosztályok (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃) között reverzibilis, pH függő kölcsönhatást figyeltünk meg, azaz pH 6,0-on az ellenanyagok koncentrációjától függő kötődést tapasztaltunk, míg pH 7,4-en szinte semmilyen kimutatható kapcsolat nem jött létre a molekulák között (7. és 8. ábra).



8. ábra: A bFcRn/m β 2m és egér IgG alosztályok kölcsönhatásának analízise SPR módszerrel. A bFcRn/m β 2m fehérjét amino csoporton keresztül immobilizáltuk (kb. 3200 RU) a GLC chip felszínére. Ezek után a különböző egér IgG alosztályokat különböző koncentrációban (0,21-133 nM), 100 μ l/perc sebességgel, 25 °C-on injektáltuk a chipre. A kölcsönhatást pH 6.0-on (bal oszlop), és pH 7.4-en (jobb oszlop) is megvizsgáltuk.

Az asszociációs (k_{on}) és a disszociációs kinetikai konstans (k_{off}) meghatározásához a szenzorgrammokra nem lineáris regresszióval görbét illesztettünk, amelyhez a heterogén ligand modellt használtuk. Ez a modell alkalmas az olyan kölcsönhatások leírására, amelynek során két, különböző affinitás értékkel jellemezhető interakció alakul ki a résztvevő partnerek között. Mint tudjuk egy IgG molekulához egyszerre egy, vagy akár két FcRn is képes

kapcsolódni. Az illesztés során kapott k_{on} és k_{off} értékekből a kölcsönhatásra jellemző affinitás értékek (K_{D1} és K_{D2}) kiszámíthatóak ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Az eredményekből megállapítható, hogy az endogén egér (mFcRn/m β_2 m), illetve a hibrid receptor (bFcRn/m β_2 m) hasonló erősséggel köti a különböző egér IgG alosztályokat pH 6,0-on, és egyáltalán nem, vagy csak kis mértékben (mIgG₁) kötődik hozzájuk pH 7,4-en (1. táblázat).

mFcRn/m β_2 m								
	pH 6.0				pH 7.4			
	K_{D1} (M) $\times 10^{-9}$	f_1 (%)	K_{D2} (M) $\times 10^{-9}$	f_2 (%)	K_{D1} (M) $\times 10^{-9}$	f_1 (%)	K_{D2} (M) $\times 10^{-9}$	f_2 (%)
mIgG ₁	7.77	53.2	53.3	46.8	L. B.			
mIgG _{2a}	4.24	58.6	40.4	41.4	N. B.			
mIgG _{2b}	3.01	16.7	96.2	83.3	N. B.			
mIgG ₃	2.45	20.1	99.8	79.9	N. B.			

bFcRn/m β_2 m								
	pH 6.0				pH 7.4			
	K_{D1} (M) $\times 10^{-9}$	f_1 (%)	K_{D2} (M) $\times 10^{-9}$	f_2 (%)	K_{D1} (M) $\times 10^{-9}$	f_1 (%)	K_{D2} (M) $\times 10^{-9}$	f_2 (%)
mIgG ₁	10.6	63.5	42.5	36.5	L. B.			
mIgG _{2a}	6.58	42.9	66.8	57.1	N. B.			
mIgG _{2b}	6.47	16.4	95.9	83.6	N. B.			
mIgG ₃	12.8	17.3	112	82.7	N. B.			

1. táblázat: a mFcRn/m β_2 m illetve a bFcRn/m β_2 m különböző egér IgG alosztályokkal kialakított kölcsönhatásának affinitás értékei pH 6,0-on és pH 7,4-en A K_D értékeket a szenzorgrammokra illesztett heterogén ligand modell alapján kapott k_{on} és k_{off} értékekből számítottuk ki. A modell olyan kölcsönhatást ír le, amelynek során két, különböző affinitás értékkel jellemezhető interakció alakul ki a résztvevő partnerek között
L.B.: kismértékű kötődés, de a gyenge jel miatt nem lehetett meghatározni a K_D értéket. N.B.: nem volt detektálható kötődés. Az f_1 (%) és f_2 (%) a két különböző interakció előfordulási valószínűsége.

Az mFcRn/m β_2 m esetében általunk kapott adatokat összehasonlítottuk a korábban mások által mért adatokkal [15-20]. Láthatjuk, hogy a kísérleti beállításoktól és az illesztett kölcsönhatási modellektől függően a számolt affinitás értékek elég nagy változatosságot mutatnak, de pl. az mIgG₁ esetén hasonló kísérleti paraméterekkel közel azonos eredményt kaptunk (2. táblázat) [15].

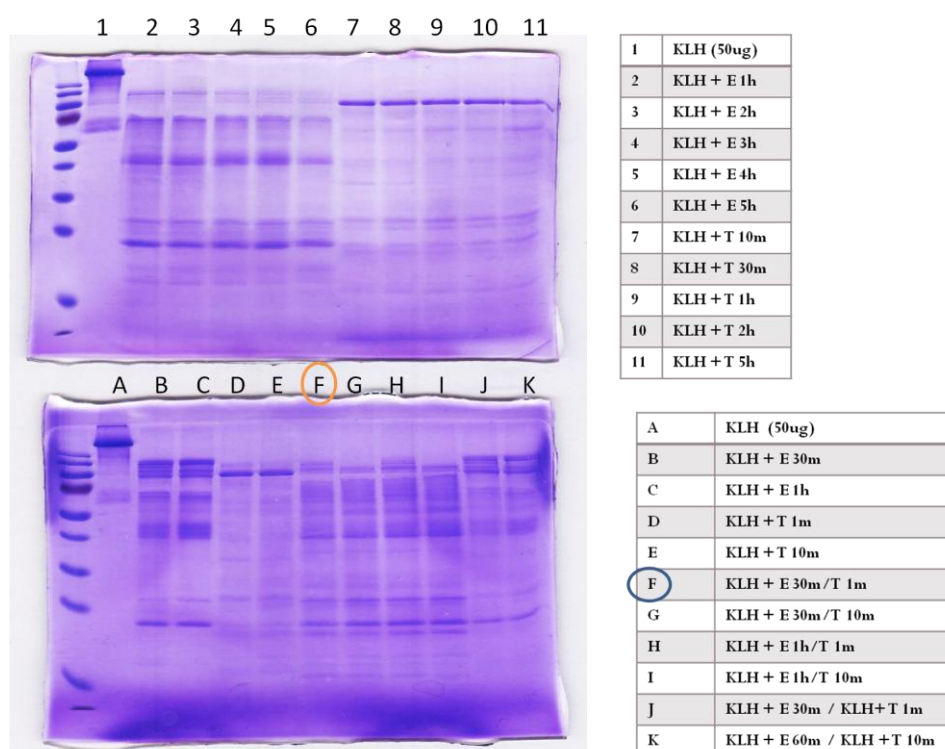
mFcRn	Antitest alosztály	Modell	Kötődési paraméterek				Irodalom
			K _D 1 (nM)	F1 (%)	K _D 2 (nM)	F2 (%)	
0	mIgG1	Heterogén ligand	7,77	53,2	53,3	46,8	Saját adat
1	mIgG1	Heterogén ligand	8,5	78,9	450	21,1	Andersen et al. (2010)
2	mIgG1	Two site binding	188,2				Ward et al. (2008)
3	mIgG1	Heterogén ligand	243				Datta Mannan et al. (2007)
4	mIgG1	Two site binding	280		2300		Zhou et al. (2005)
5	mIgG1	Scatchard analysis	750				Zhou et al. (2003)
6	mIgG1	Single site binding	7,4				Ghetie et al. (1997) *
0	mIgG2a	heterogén ligand	4,24	58,6	40,4	41,4	Saját adat
1	mIgG2a	Scatchard analysis	420				Zhou et al. (2003)
0	mIgG2b	heterogén ligand	3,01	16,7	96,2	83,3	Saját adat
1	mIgG2b	two site binding	150		1200		Zhou et al. (2005)
2	mIgG2b	Scatchard analysis	500				Zhou et al. (2003)

2. táblázat: Az mFcRn és a különböző alosztályú egér IgG molekulák kölcsönhatásának affinitás értékei: az általunk kapott és az irodalomban található eredmények összehasonlítása. A „0”-val jelölt sorok a saját méréseink eredményeit tartalmazzák. *Gurbaxani et al (2013) alapján

A korábbi vizsgálatokból számos, közvetett adat állt rendelkezésünkre, amelyek arra engedtek következtetni, hogy a bFcRn/m β ₂m fehérje funkcióképes, vagyis megköti az egér IgG-t. Most először sikerült egy, a tudományterületen széleskörűen elfogadott *in vitro* módszerrel (SPR) közvetlenül bebizonyítanunk, hogy ez a kapcsolat ténylegesen létrejön az adott molekulák között. Ez az eredmény alátámasztja azt is, hogy a transzgenikus egerek előnyös tulajdonságai, mint pl. hogy megnőtt bennük az IgG fél-élet ideje, vagy mint, hogy gyengén immunogén antigénekként szemben is képesek ellenanyagot termelniük, valamint, hogy több antigén specifikus IgG-t termelnek, az egérbe bejuttatott extra bFcRn α láncoknak köszönhető. Azt is sikerült igazolnunk, hogy az egér FcRn és a hibrid FcRn nagy hasonlóságot mutat az egyes egér IgG izotípusok kapcsolódásában, azaz nem feltételezzük, hogy a bFcRn transzgenikus egerek humorális immunválasza során módosul az egyes antigén-specifikus IgG izotípusok aránya. Ezt *in vivo* vizsgálatokkal kell a továbbiakban ellenőrizni.

A továbbiakban arra is kíváncsiak voltunk, hogy ennek a genetikai módosításnak milyen hatása van a transzgenikus állatok humorális immunválaszára, konkrétan az ellenanyag termelés diverzitására.

Részleges enzimatisz emésztés. A legnagyobb számú KLH fragmentum előállításához először az optimális emésztési körülményeket kellett megtalálnunk. Ennek meghatározásához a KLH-t különböző ideig emésztettük tripszinnel és elasztázzal külön-külön, illetve együtt is, majd SDS-PAGE segítségével szétválasztottuk a fragmentumokat. Eredményeink alapján választottuk ki a kombinált elasztáz 30 perc/tripszin 1 perc emésztést, mivel úgy ítéltük meg, hogy ebben az esetben keletkezett a legtöbb fehérje fragmentum (9. ábra).

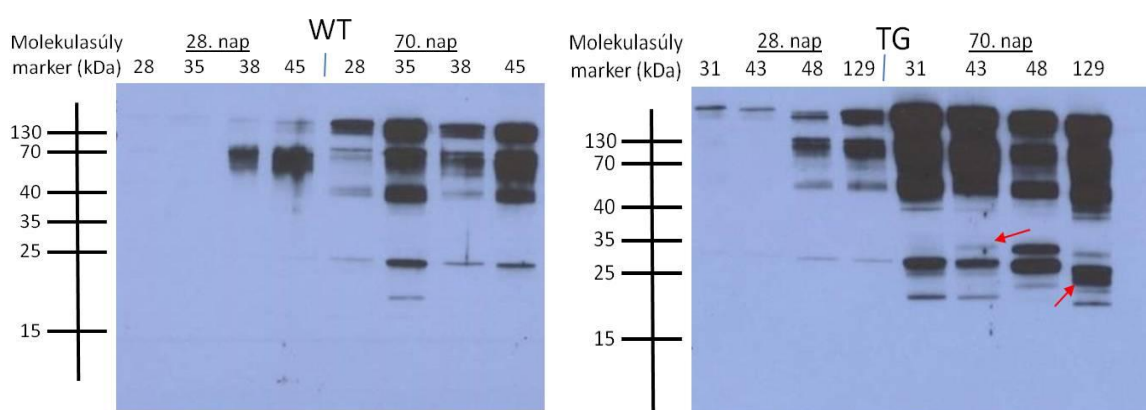


9. ábra: KLH részleges enzimatisz emésztése tripszinnel (T) illetve elasztázzal (E). A gélben a fragmentumokat Coomassie festéssel tettük láthatóvá. A későbbi vizsgálatokhoz a megjelölt emésztési körülményeket (elasztáz 30 perc, tripszin 1 perc) választottuk ki.

Diverzitás vizsgálata Western blot analízissel. Négy-négy TNP-KLH antigénnel immunizált transzgenikus és vad típusú egérből, öt különböző vérvételi időpontból (immunizálástól számított 0., 14., 28., 50., 70. nap) származó szérum mintát elemeztünk (az egerek oltását és a vérvételt a kutatólabor munkatársai végezték el). Először egy-egy

transzgenikus és vad típusú állatot jelöltünk ki, és vizsgáltuk meg mind az öt-öt, belőlük származó vérmintát Western blottal, hogy megállapítsuk, mely időpontokban vett mintákat érdemes felhasználni az összehasonlító kísérlethez (nem közölt kísérlet). Ezek alapján a 28. és a 70. napi szérumokat használtuk a további vizsgálatokhoz.

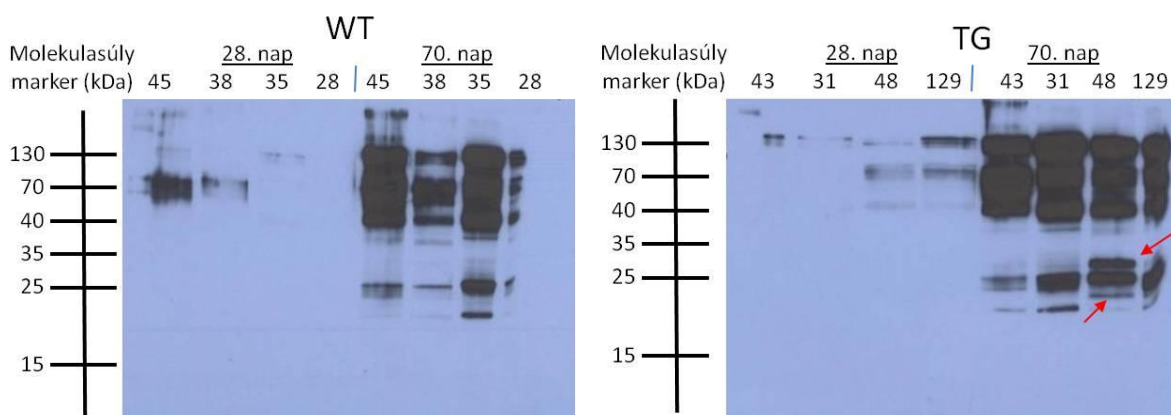
A Western blot analízis során először minden szérumot 2000×-es hígításban használtunk. Ekkor számos olyan KLH fragmentumot észleltünk, amelyek csak a transzgenikus egerek szérumaival történő előhívás során jelentek meg. Emellett jóval erősebb jelet detektáltunk a transzgenikus minták használata esetén, amely a szérumok magasabb ellenanyag tartalmával állhat összefüggésben (10. ábra).



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

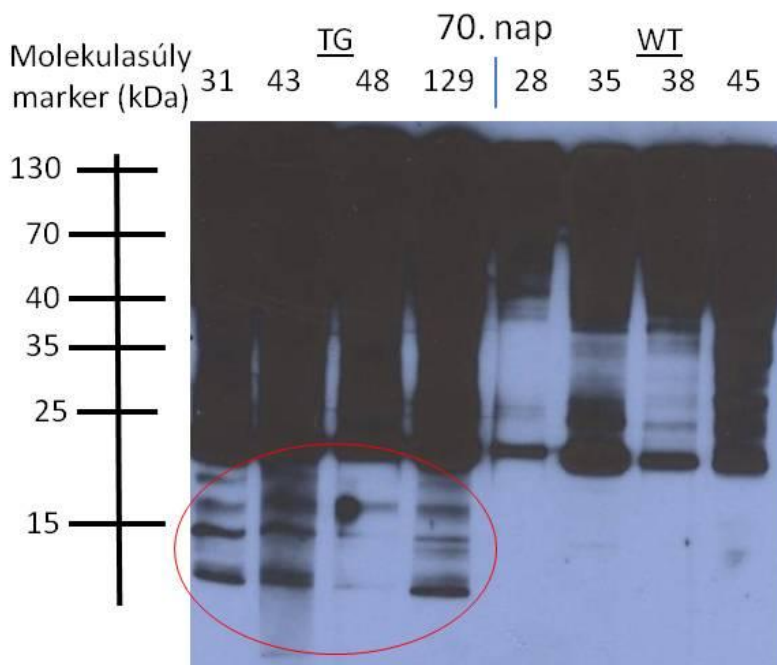
A kísérletünkben használt transzgenikus és vad típusú szérumok esetében egy korábbi vizsgálat során már meghatározták a KLH specifikus ellenanyag titer értékeit. Ezekre a KLH titer értékekre normalizált szérumokkal is elvégeztük ugyanezt a kísérletet, így eltüntettük a transzgenikus egerek azon előnyét,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

Eredményeink azt mutatták, hogy a normalizált mintákban is több egyedi fragmentum volt felismerhető a transzgenikus minták esetén (11. ábra).



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

Végül megvizsgáltuk a csak tripszinnel emésztett KLH preparátumokat is, amelynek során ismét azonos hígítású (2000x) szérum mintákat használtunk. A korábbiakhoz hasonlóan, de még inkább hangsúlyozottan láthattuk, hogy jelentős különbség mutatkozott a vad típusú és a transzgenikus egerek 70. napi szérumai között, mivel a kisebb méretű KLH fragmentumokat csak a transzgenikus egerek szérumaiból származó ellenanyagok ismerték fel (12. ábra).



12. ábra: Tripszinnel részlegesen emésztett KLH Western blot analízise vad típusú (wt) és transzgenikus (Tg) egerek szérumainak felhasználásával. Az emésztést a 4. ábra „D” körülményei között végeztük el. Minden állat (számok) szérumát 2000× hígításban használtuk fel. A piros kör a csak a transzgenikus állatokban megjelenő fragmentumokat jelöli.

Ugyanezt a diverzitás vizsgálatot egy másik antigén, az ovalbumin (OVA) esetében szintén elvégeztük, és ugyan nem ilyen látványos módon, de hasonló különbségeket tapasztaltunk a vad típusú és a transzgenikus állatok között (nem közölt kísérlet).

Jelen kísérleteink eredményei alátámasztják az bFcRn transzgenikus állatokkal kapcsolatos korábbi kísérleti eredményeket. Az ELTE Immunológiai Tanszék FcRn munkacsoportja már többször is igazolta, hogy a bFcRn/m β _{2m}-t expresszáló transzgenikus egerekben immunizálás hatására nagyobb mennyiségű antigén-specifikus IgG és IgM keletkezik, illetve több antigén-specifikus B-sejt fejlődik a lépükben, mint a vad típusú társaikban [3, 21]. Azonban nemcsak az ellenanyagok mennyisége, hanem azok minősége, diverzitása is fontos tulajdonság a gyógyászatban, diagnosztikában, vagy a kutatásban használt antitestek esetén is. A munkacsoport már korábban beszámolt róla, hogy a bFcRn transzgenikus egerekben, ovalbumin (OVA) ellen termelődött, IgM izotípusú ellenanyagok több OVA peptid fragmentumot ismernek fel, mint a vad típusú egerekből származó antitestek. Ez arra utalt, hogy több-féle B-sejt receptorról rendelkező, antigén-specifikus B-sejt aktiválódott az immunválasz során [3]. A mostani vizsgálatok során pedig sikerült kimutatni, hogy a bFcRn α láncot expresszáló egerekben nagyobb mennyiségű és többféle epitópot felismerő IgG izotípusú ellenanyag keletkezik egy adott antigén (KLH vagy OVA) ellen, mint a vad típusú állatokban. Ezek az eredmények mind arra utalnak, hogy a transzgenikus egerek humorális immunválaszának nagyobb a diverzitása.

A bemutatott Western blot vizsgálatok során kapott eredmények meggyőzően mutatják a bFcRn transzgenikus egerek antigén-specifikus IgG válaszában fokozott mértékű diverzitását. A módszernek ugyanakkor van egy detektálási határa, így előfordulhat, hogy hosszabb expozíciós idő, vagy kisebb szérumszámok használata megjelennének a vad típusú állatokból származó mintáknál is a transzgenikus egereknél látott extra fragmentumok. Mindazonáltal, a jelenlegi eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a transzgenikus állatokban sokkal nagyobb az egyedi epitópotokat felismerő ellenanyagok mennyisége, amelynek hátterében a lényegesen nagyobb számú egyedi ellenanyagokat termelő B-sejtek állnak. Kijelenthető tehát, hogy a transzgenikus egerek B-sejtjeiből sokkal nagyobb eséllyel lehet egy adott epitópra, még a gyengén immunogén epitópotokra is, monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómát előállítani.

Ahhoz, hogy még pontosabb képet kapjunk az immunizálás hatására bekövetkező humorális immunválasz diverzitásáról, különböző antigénekkal, több állattal is el kellene végezni a kísérleteket, illetve más módszereket is be lehetne vonni a vizsgálatba (pl. ellenanyagok CDR

régióinak szekvencia összehasonlítása). Ezeket a vizsgálatokat a munkacsoport a továbbiakban tervezi elvégezni.

Összefoglalás

A neonatális Fc receptor alapvető szereplője a jól működő humorális immunválasznak. Ezzel összhangban a kutatócsoport által létrehozott, bovin FcRn α láncot tartalmazó transzgenikus egerek sokkal hatékonyabb immunválasszal rendelkeznek, mint a vad típusú társaik. Kutatásaim során először az ezekben a transzgenikus egerekben kifejeződő, ún. hibrid FcRn, illetve az endogén egér FcRn és a különböző izotípusú egér immunglobulinok kölcsönhatását vizsgáltam *in vitro*, SPR technikát alkalmazva. Ennek során meghatároztam a pH függő IgG kötés kinetikai paramétereit. Kimutattuk, hogy az endogén egér (mFcRn/m β_2m), illetve a hibrid receptor (bFcRn/m β_2m) hasonló erősséggel köti a különböző egér IgG alosztályokat pH 6,0-on, és egyáltalán nem, vagy csak elenyészően kis mértékben (mIgG₁) kötődik hozzájuk pH 7,4-en. Emellett az mFcRn/m β_2m esetében általunk kapott adatokat összehasonlítottuk a korábban mások által mért adatokkal. A kísérleti beállításoktól és az illesztett kölcsönhatási modellektől függően a számolt affinitás értékek elég nagy változatosságot mutatnak, de pl. az mIgG₁ esetén hasonló kísérleti beállításokkal, az irodalmi adatokkal közel azonos eredményt kaptunk.

Kísérleteim másik részében a bFcRn transzgenikus egerek humorális immunválaszának sokszínűségét, diverzitását vizsgáltam. Ehhez TNP-KLH, illetve ovalbumin (OVA) antigénnel oltottunk transzgenikus és vad típusú egereket, majd az állatokból nyert szérumokkal, és részlegesen emésztett KLH, illetve OVA mintákkal Western blot elemzést végeztem. Ennek során mindkét antigénnel szemben és több emésztési körülmény között is egyértelműen sikerült kimutatnom, hogy a transzgenikus állatokból származó ellenanyagok több KLH, illetve OVA fragmentumot ismernek fel, mint a vad típusú egerekből származó antitestek. Az eredmények harmonikusan illeszkednek abba a képbe, amely már korábban kialakult a bFcRn transzgenikus állatokkal kapcsolatban és azt mutatják, hogy e transzgenikus egerek humorális immunválaszának nagyobb a diverzitása.

Támogatás:

Kutatásomat az OTKA K 101364 és a KMOP-4.2.1./B-10-2011-0002 pályázatok támogatták.