

# AZ IGG TRANSPORTJÁT ÉS KATABOLIZ- MUSÁT SZABÁLYOZÓ FCRN GÉNREGULÁCIÓS ELEMZÉSEK SZARVASMARHÁBAN

Kacskovics Imre  
PhD, tudományos főmunkatárs  
kacskovics.imre@aotk.szie.hu

Mayer Balázs  
PhD-hallgató

Kis Zsuzsanna  
PhD-hallgató

Doleschall Márton  
PhD-hallgató

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Élettani és Biokémiai Tanszék

Bósze Zsuzsanna  
D.Sc., intézetigazgató

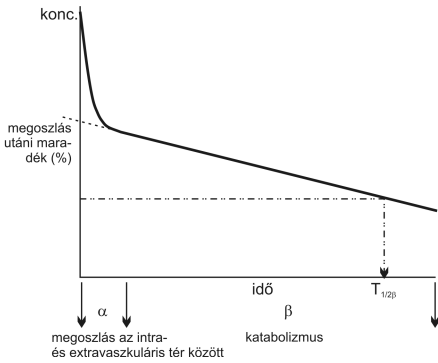
Bender Balázs  
PhD-hallgató

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Állatbiológiai Intézet

A legjelentősebb és egyben a vérplazmában legnagyobb mennyiségben jelen levő immunoglobulin – az IgG – védelmet biztosít vírusok, baktériumok illetve parazitás fertőzések ellen. Antigénnel történő kapcsolódását követően allergiás és gyulladáshoz vezető reakciókat vált ki, amellyel aktiválja az immunsejteket és az *extravasatio* folyamatával a kívánt szöveti helyre „toborozza” őket. Ösz-szehangolja az immunrendszer sejtes és humorális faktorait a kórokozók széles spektrumának legyőzése érdekében. Az IgG hiánya (agammaglobulinaemia) – ellentétben más izotípusok (IgM, IgA, és IgE) hiányával – súlyos immundeficienciát, sőt akár letális kimenetelű kórfolyamatokat okoz. E kiemelt szerep zavartalan ellátása érdekében az emlősök összetett folyamatokkal biztosítják az IgG pre-, illetve postnatis transzportját, azaz a maternális immunitás átadását, valamint a vér mindenkor magas IgG-szintjét.

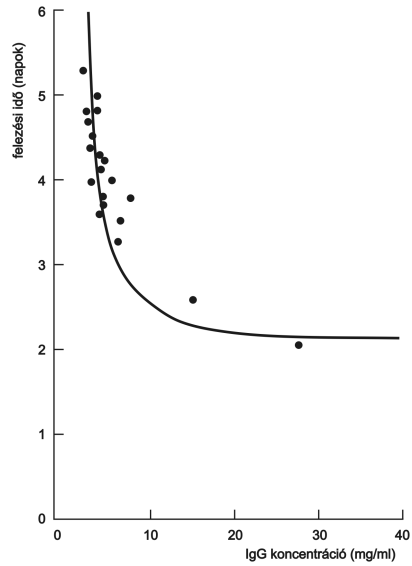
## *Történeti áttekintés*

Paul Ehrlich az 1890-es években fogalmazta meg, hogy az anyai immunitás átadása az újszülöttek egészsége szempontjából alapvető fontosságú annak érdekében, hogy megvédje őket a fertőzéstől életük első néhány hetében, amíg a saját immunvédetségük ki nem alakul (Ehrlich, 1892). Több mint fél évszázaddal később, 1958-ban F. W. Roberts Brambell egy olyan telíthető receptorrendszerrel számolt be (valójában az első IgG receptorról), amely az anya utódba irányuló IgG transzportját biztosítja a méhlepényen illetve a vékonybélben keresztül (Brambell et al., 1958). Néhány évvel később ugyancsak ő egy hasonló vagy esetleg azonos receptor létrehozását követve, amely megvédi a keringő IgG molekulákat a lebomlástól, és ezáltal biztosítja, hogy a keringés leghosszabb felezési idejű fehérjéi legyenek (*1. táblázat; 1. ábra*). Az anyai



1. ábra • Az IgG kétfázisú kiürülése a keringésből és a béta-fázis (β) felezési idejének ( $T_{1/2b}$ ) kiszámítása

immuntranszport folyamatához hasonlóan ez a mechanizmus is telíthetőnek bizonyult, azaz minél magasabb volt a keringő IgG koncentrációja, annál gyorsabb volt lebomlása a vérpályában (2. ábra). Ebből fakadóan Brambell a fehérjék katabolizmusát egy nem telíthető mechanizmussal, míg az IgG védelmét egy telíthető receptorral magyarázta. Ennek alapján a sejtekbe nem-specifikus endocitózissal felvételre került makromolekulák közül az IgG-t a receptor specifikusan visszajuttatja a véráramba, míg a többi fehérje a sejtben degradálódik (Brambell et al., 1964). Az ötvenes-hatvanas években végzett farmakokinetikai vizsgálatok arra az eredményre vezettek,



2. ábra • Összefüggés az IgG katabolizmus és plazma koncentrációja között egerekben (Brambell et al., 1964)

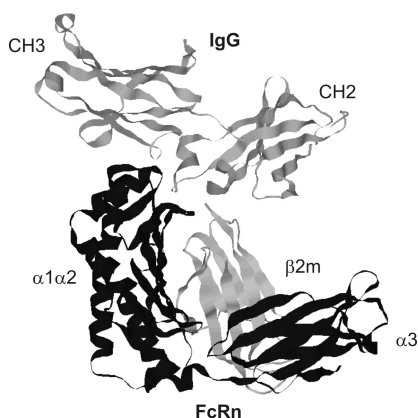
hogy a legtöbb plazmafehérje, így az IgG is, a vérpálya mentén bomlik le, és egyetlen szerv sem játszik kitüntetett szerepet ebben a folyamatban. Mindezek alapján Thomas Waldman és Warren Strober 1969-ben arra a következtetésre jutottak, hogy a plazmafehérjék lebomlása, illetve az IgG védelme a kapillárisok endotélsejtjeiben zajlik (Waldmann – Strober, 1969).

	IgA	IgD	IgE	<b>IgG</b>	IgM
molekulaméret (kDa)	160, 400	175	190	<b>150</b>	950, 1150
struktúra	monomer, dimer	monomer	monomer	<b>monomer</b>	pentamer, hexamer
valencia	2, 4	2	2	<b>2</b>	10, 12
szérumkoncentráció (mg/ml)	1,5–2,6	0,04	0,0003	<b>9,5–12,5</b>	0,7–1,7
szérum felezési idő	6	3	2,5	<b>23</b>	5

1. táblázat • Az emberi immunglobulin izotípusok jellemzői

*A neonatalis Fc receptor (FcRn)*

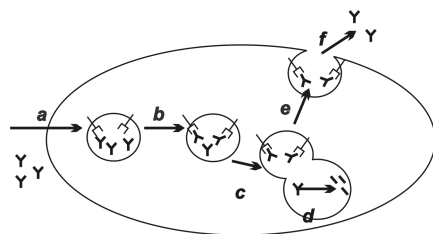
A maternális immuntranszport és az IgG katabolizmus folyamatainak biztosítását ugyanaz a receptor – FcRn – valósítja meg, amely az evolúció során e két funkcióhoz és sejtípushoz rendkívüli mértékben adaptálódott. Az FcRn szerkezetileg az MHC-I molekulával szoros rokonságot mutat, vagyis egy három alegységből álló, a sejtmembránban „horgonyzó” nehézláncból és a hozzá másodlagos kötőerőkkel kapcsolódó beta-2 mikroglobulinból ( $\beta_2m$ ; könnyűlánc) álló heterodimer (3. ábra). A receptor pH-függő módon, enyhén acidikus környezetben megkötözi az IgG molekulát, míg semleges-enyhén bázikus közegben disszociál az IgG/FcRn komplex (West – Bjorkman, 2000). E receptort először az újszülött rágsálók vékonybél enterocitáiból, később azonban számos egyéb epitelsejtől, így a rágsálók és az ember placentájából, felnőtt emberi vékonybélből, vesehámsajtól és a légutakban



3. ábra • A heterodimer FcRn egy nehézláncból és egy könnyűláncból ( $\beta_2m$ ) áll. A képen a nehézlánc extracelluláris doménjei ( $\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_3$ ) látszódnak, a transzmembrán és citoplazmikus régiót nem tüntettük fel. Az FcRn az IgG CH2-CH3 doménjével kapcsolódik (West – Bjorkman, 2000).

is kimutatták. Amint erre korábban utaltunk, a receptor az epitelsejtek mellett az erek endotelsejtjeiben is kifejeződik, ahol az IgG lebomlását szabályozza. Mindkét sejtípusban a sejtek legtöbbször nem-specifikus pinocitózissal veszik fel a makromolekulákat, amelyek ezt követően az endoszómákba, illetve a lizoszómákba kerülnek, és ott az alacsony kémhatás mellett, enzimek révén lebomlanak. A sejtbe került IgG molekula ebből a szempontból kivételnek számít. Amennyiben a sejt FcRn molekulát expresszál, az IgG a korai endoszómális vezikulumokban enyhén acidikus kémhatás mellett specifikusan kapcsolódik a receptorral, és a továbbiakban – az intracelluláris lebomlást elkerülve – transzcitózissal a sejt ellenoldalára kerül (epitelsejt), vagy visszajut a keringésbe (endotelsejt) (4. ábra) (Ghetie – Ward, 2002).

Mindezen ismereteknek jelentős humán-terápiás vonzatai is vannak. Ismert, hogy egyes autoimmun betegségekben, amikor a szervezet saját anyagai ellen termelődik el-



4. ábra • Az FcRn által közvetített IgG-védelem sematikusan. a – az IgG pinocitózissal a sejtbe kerül (pl. endotelsejt); b – H<sup>+</sup> jut az endoszómába, csökkentve annak kémhatását és lehetővé téve az FcRn-IgG kapcsolódást; c – az endoszóma a lizoszómával egyesül, de az FcRn-IgG komplex nem kerül a lizoszómába; d – a nem kötődött IgG-t a lizoszómában a proteázok lebontják; e – az endoszóma a sejtmembránnal egyesül, ahol az FcRn-IgG komplexet fiziológias kémhatás éri; f – a megváltozott kémhatás hatására a komplexből felszabadul az IgG (Lobo et al., 2004).

lenanyag (főleg IgG), a nagy mennyiségben beinjektált IgG (intravénás immunglobulin – IVIG – terápia) jótékony hatású lehet, hiszen általánosan rövidíti valamennyi IgG molekula keringési idejét, és így a kóros immunglobulinok lebomlása is gyorsabb. A molekuláris biológiai technológiák mellett lehetőség nyílt arra is, hogy az IgG Fc részének célzott mutációjával fokozzák az IgG FcRn kötési képességét, és ezáltal hosszabb életidejű immunglobulin molekulákat állítanak elő, amelyeket például a daganatok immunterápiájára lehet használni (Hinton et al., 2004).

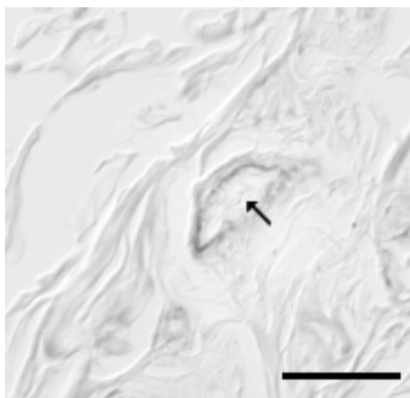
A két ismertetett sejtípus mellett az FcRn jelenlétét további sejtípusokból, így a májsejtekből, monocitákból, makrofágokból és dendritikus sejtekből is kimutatták, bár ezek funkciójáról jóval keveset tudunk.

#### *A szarvasmarha FcRn szöveti kifejeződése és funkciója*

A szarvasmarhában az IgG termelődése, immunfolyamatokban betöltött szerepe alapvetően megegyezik a többi emlősállatokkal összehasonlítva. Az IgG1 és IgG2 alosztályokat elemezve megállapítható, hogy vérbeli koncentrációjuk csaknem megegyezik, és együttes szérumkoncentrációjuk átlagosan 20 mg/ml. A szarvasmarha IgG vérépályán belüli feleződési üteme a többi emlősállathoz hasonlóan mintegy 15-20 nap, és ezzel lényegesen meghaladja a vérbeli IgA, IgM molekulák (3,5-4 nap) félelet idejét. A hasonlóságok mellett a kérődző állatok IgG metabolizmusának jellegzetes különbsége, hogy az IgG1 molekula számos nyálkahártya felszínére (tőgy, vékonybél, alsó légutak, uterus) szekretálódik és ott – az IgA protektív hatását kiegészítve – hatékonyan részt vesz az immunvédelemben. Az elmúlt években igazoltuk, hogy bár az ellés előtt és azt követően is ki lehet mutatni az FcRn jelenlétét a tőgy acinus sejtjeiben, a receptorsejten belüli lokalizációjában jellegzetes különbség

figyelhető meg. Míg az ellés előtti időszakban a receptor diffúzan tölti ki a citoplazmát, addig azt követően a hámsejtek lumen felőli oldalán található. Minthogy a tőgy acinus sejtjeiben a korábbiakban csak IgG1 molekulákat detektáltak, feltételezzük, hogy a szarvasmarha FcRn is ezeket a molekulákat köti és szekretálja (Kacskovics et al., 2000; Kacskovics, 2003; Mayer et al., 2005). A receptor szekréciós tevékenységének megerősítésére további szöveteket elemeztünk, amelyekben a korábbi vizsgálatok szintén IgG1 szekréciót mutattak ki. Vizsgálataink során az FcRn kifejeződését a vékonybél kriptasejtjeiben (Mayer et al., 2002), illetve az alsó légutakban is detektáltuk (Mayer et al., 2004).

Tekintettel arra, hogy a többi immunglobulinhoz képest mindkét IgG alosztálynak – ebben az állatfajban is hosszú a felezési ideje – feltételeztük, hogy az FcRn ebben az állatfajban is expresszálódik az endotélsejtekben és védi az IgG molekulákat a gyors lebomlástól. Míg az endotélsejtek FcRn expresszióját immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazoltuk (5. ábra), addig az FcRn IgG katabolizmusát befolyásoló szerepét funkcionális elemzésekkel erősítettük meg. Ennek kapcsán először



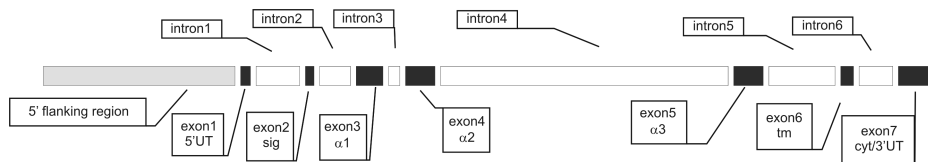
5. ábra • Szarvasmarha FcRn immunhisztokémiai detektálása bőralatti kötőszövet ereiben (nyíl: ér, horizontális csík: 50  $\mu$ m)

kimutattuk, hogy a  $^{125}\text{I}$  jelölt emberi IgG hatékonyan kapcsolódik a szarvasmarha FcRn receptorhoz, sőt ez az interakció lényegesen erősebb, mint a szarvasmarha IgG–FcRn kapcsolat. Tekintettel arra, hogy más állatfajban végzett vizsgálatok közvetlen összefüggést mutattak az IgG–FcRn kapcsolat erősségére, és az IgG felezési idejére vonatkozóan (azaz minél erősebb a kapcsolat, annál hosszabb a felezési idő), feltételeztük, hogy az emberi IgG felezési ideje szarvasmarhában meghaladja a szarvasmarha IgG félélet idejét (Ghetie – Ward, 2002). Természetesen egy idegen immunglobulin befecskendezése a szarvasmarhába immunreakciót vált ki (azaz humán IgG specifikus ellenanyagok jelennek meg), amelyek lényegesen befolyásolják a folyamat értékelését. E nemkívánatos folyamatot úgy tudtuk elkerülni, hogy a humán immunglobulint olyan klónozott borjakba fecskendeztük, amelyek kis mennyiségben maguk is emberi immunglobulint termelnek (vagyis az emberi immunglobulinok számukra nem számítanak idegen fehérjének), mivel az emberi nehéz- és könnyűláncokat tartalmazó kromoszómaregiókat hordozzák (Kuroiwa et al., 2002). E kísérleteink alapján egyértelműen igazoltuk, hogy az emberi IgG felezési ideje ezekben az állatokban lényegesen hosszabb, mint a szarvasmarha IgG felezési ideje, vagyis a szarvasmarha FcRn hatékonyan védi meg a keringő IgG molekulákat a lebomlástól. Kísérletünk további jelentősége, hogy kimutattuk a humán IgG védettségét a szarvasmarhában, azaz az említett transzkromoszomális szarvasmarhák nemcsak termelik a humán IgG-t, hanem az FcRn lebomlásukat

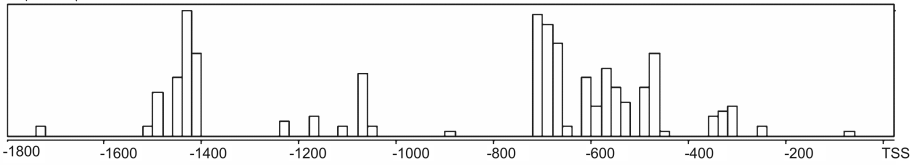
megakadályozva magas vérszintet is biztosít (Kacsokovics et al., 2005).

#### *A szarvasmarha FcRn génregulációs elemzése riporter génnel technikával*

Mindezen vizsgálati eredményeink kapcsán merült fel bennünk az a kérdés, hogy milyen hatások befolyásolják a szarvasmarha FcRn génextpresszióját. E kérdés tisztázása érdekében először klónoztuk és karakterizáltuk a receptor nehézláncának génjét (FCGRT), amely exon-intron szerkezetét tekintve hasonlóan bizonyult a korábban már elemzett humán és egergénekkal összehasonlítva (6. ábra). Ezt követően a kódoló szakaszt megelőző mintegy 1800 bp hosszú génszakaszt vizsgáltuk. Elemzéseink kapcsán először arra voltunk kíváncsiak, hogy mennyiben hasonlítanak a különböző állatfajok FCGRT promoter szekvenciái. Ismeretes, hogy a promoter szakaszokon található ún. transzkripciós faktorok kötőhelyei kevésbé érzékenyek a kisebb eltérésekre, mint például a fehérjéket kódoló mRNS, illetve a kötőhelyek közötti szakaszok nukleinsav összetétele alapvetően nem befolyásolja a transzkripció hatékonyságát (a köztes szakaszok hossz-szának lényeges változása azonban természetesen hat rá). Ez magyarázza, hogy az evolúció során a promoter könnyebben változik meg, mint a fehérjét kódoló exonok. Mindezek alapján az egyes állatfajok rokon génjeinek promoter hasonlósági elemzése a transzkripciós faktor kötőhelyek jellege és helye alapján lehetséges (Berezikov et al., 2004). Homológvizsgálatunk alapján megállapíthatjuk, hogy míg a szarvasmarha és a humán FCGRT



6. ábra • A szarvasmarha FcRn nehézláncának (FCGRT) exon/intron szerkezete



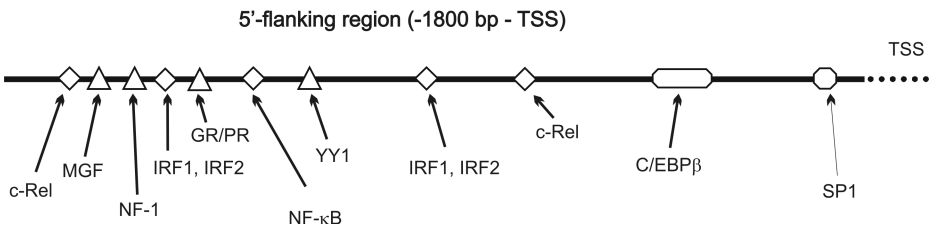
7. *ábra* • A szarvasmarha és a humán FcRn nehézlánc gén (FCGRT) promoter szakaszainak elemzése CONREAL programmal (TSS – transzkripció start helye). Az oszlopok a két promoter szakasz (1800 bp) pozíció és transzkripció faktor szerinti hasonlóságát mutatják.

promoter szakaszai között bizonyos mértékű hasonlóság kimutatható (7. *ábra*), addig ugyanez nem mondható el a szarvasmarha és az egér, illetve a humán és az egér FCGRT vonatkozásában (ez utóbbi megállapítást mások is megerősítették (Tiwari – Junghans, 2005)). Mindezek jól tükrözik a tényt, hogy az egyes állatfajokban expresszálandó FcRn receptorok jellegzetes különbségeket mutatnak sejttípus és a sejtek fejlődésspecifikus vonatkozásában (Tiwari – Junghans, 2005).

Vizsgálataink következő fázisában a szarvasmarha promoter transzkripció faktor kötőhelyeit elemeztük TESS és TFSEARCH programokkal (a programok a TRANSFAC 4.0 adatbázist használták; [Schug – Overton, 1997; Heinemeyer et al., 1998; Wingender et al., 2001]). Az így kapott lehetséges transzkripció faktor kötőhelyeket három csoportba soroltuk: 1. „tejfelhérje” motívumok: STAT5, NF1, GR/PR, YY1 – amelyeket a legtöbb, tejtermelés kapcsán kifejeződő gén promoterében ki lehetett mutatni; 2. „akut fázis” motívumok: c-Rel, IRF1/IRF2, NF- $\kappa$ B, IL-6 – amelyeket számos, az akut fázis idején aktiválódó gén

promoterében lehet kimutatni; végül 3. „általános” motívumok: CREB, SP1 – amelyek a transzkripció aktiváció során bizonyultak nélkülözhetetlenek számos kísérletben (8. *ábra*).

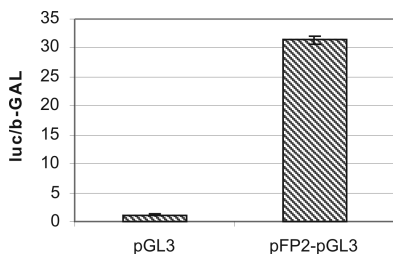
Hangsúlyozzuk azonban, hogy ezek az elemzések pusztán a kezdeti tájékozódásban segítenek, valódiságukat további kísérletes munkával kell megerősíteni. Ezen az úton haladva a továbbiakban a promoter elemzését az ún. luciferáz rendszerrel vizsgáltuk. Ennek lényege, hogy a promotert egy olyan vektorba illesztettük, amely egyben a luciferáz enzim kódoló szakaszát is tartalmazza (pGL3 vektor). A vektort szarvasmarhasejtekbe transfektáltuk és a promoter aktivitására az általa indukált luciferáz aktivitásából következtettünk. Esetünkben tehát a luciferáz enzim aktivitását – amelyet a luciferin hozzáadásával luminométerben vizsgáltunk – az előtte álló génszakasz, azaz a szarvasmarha FcRn promotere szabályozza. Előkísérleti elemzéseink alapján az izolált génszakasz promoter jellegűnek bizonyult, mert a luciferáz aktivitás a promoter nélküli



8. *ábra* • A szarvasmarha FcRn nehézlánc gén (FCGRT) promoter szakaszának feltételezett transzkripció faktor kötőhelyei TESS és TFSEARCH programokkal elemezve.

„üres” vektorral összehasonlítva kb. harmincszoros emelkedést mutatott (9. ábra).

A bFcRn nehézlánc promoterének számítógépes elemzése igen magas valószínűséggel jelzett egy NF- $\kappa$ B kötőhelyet (8. ábra), és ezért transzkripció faktor kötőhely vizsgálatainkat e kötőhely elemzésével kezdtük meg. Vizsgálataink során HC11 (egér emlőmirigy epitélisejtvonalon), JAR (humán trofoblaszt) és HEK293 (humán embrionális vesehám) sejtvonalakba a szarvasmarha FcRn nehézlánc promoterét (luciferáz), s egy olyan konstrukciót transzfektáltunk, amely egy citomegalovírus promoter által expresszióra készített p65 fehérjét fejez ki. A p65 az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor egyik alegysége, amely vagy homodimer, vagy pedig a sejtekben natív módon is előforduló másik alegységgel (p50) heterodimert képez, és az adott DNS szegmenshez kötődve aktivál (Li – Verma, 2002). Kísérletünk során meggyőződöttünk arról, hogy az NF- $\kappa$ B fokozza a szarvasmarha promoter aktivitását (10. ábra). Ezt az eredményünket további vizsgálatokkal (az NF- $\kappa$ B kötőhely mutációval történő semlegesítése, *electromobility shift assay*, *supershift assay*) is megerősítettük.

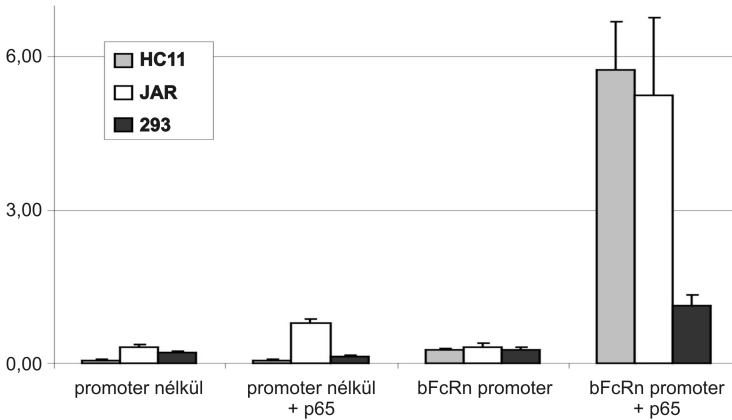


9. ábra • A szarvasmarha FcRn nehézlánc gén (FCGRT) promoter szakaszának elemzése luciferáz rendszerben. Az izolált mintegy 1800 bp hosszú kódoló régió előtti génszakasz (bFP2-pGL3) promoter jellegűnek bizonyult, mert a luciferáz aktivitás a promoter nélküli „üres” vektorral (pGL3) összehasonlítva kb. harmincszoros emelkedést mutatott.

### A szarvasmarha FcRn elemzése transzgén technikával

Mivel az FcRn receptor legalább két eltérő funkció ellátásában vesz részt, nevezetesen a maternális immunitás pre- és postnatális átadása, illetve a vér mindenkori magas IgG szintjének biztosítása, feltételezhető hogy az evolúció során a receptor fehérjeszintézisének szabályozására legalább két, az eltérő szövetspecifitást biztosító mechanizmus alakult ki. Ahhoz, hogy az *in vitro* kísérletekben azonosított szabályozó elemeket, illetve azok *in vivo* szerepét vizsgálni tudjunk, olyan transzgenikus állatmodellt kellett létrehoznunk, amely az elméletileg lehetséges legpontosabb módon „másolja le” mind a gén szövet- és fejlődésspecifikus kifejeződését, mind pedig a génről átíródó fehérje mennyiségét. A „hagyományos” transzgén konstrukciókkal létrehozott transzgenikus állatok az ismert szabályozó elemek optimális kombinációja esetében is, döntő többségükben a transzgén-integráció helyétől függő génkifejeződést mutatnak, melyhez igen gyakran ektopikus expresszió (olyan szövetben is kifejeződik, ahol az endogén gén nem termelődik) és a kópiaszámtól függetlenül változó mennyiségű géntermék keletkezése is társul.

Egy olyan gén esetében, mint a szarvasmarha FcRn receptor, ahol a legfontosabb szabályozó elemekről egyelőre csak korlátozott ismereteink vannak, az egyik lehetséges megoldás egy ún. *knock in*, génkicserélt, transzgenikus állat létrehozása lenne, melyben az FcRn gén kódoló szakaszát kicserélnénk egy könnyen nyomon követhető indikátor génre, például lac Z-re, és ebben a modell állatban próbálnánk választ kapni arra, hogy van-e a szabályozó hatású molekuláknak (például hormonoknak) olyan kombinációja, mellyel az állatot kezelve szövetspecifikus módon befolyásolni tudjuk az FcRn receptor mennyiségét és/vagy fejlődési szakasztól függő megjelenését. Ilyen típusú transzgenikus

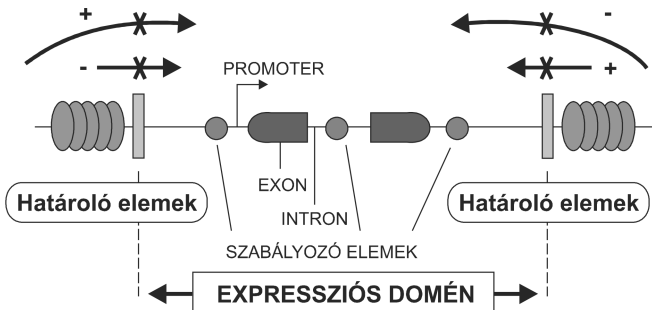


10. ábra • A szarvasmarha FcRn nehézlánc promotor indukálása az NF-κB transzkripciósi faktorról (p65) három különböző sejtvonalban.

szarvasmarhát azonban még senkinek sem sikerült létrehozni, az egér endogén FcRn receptorának így módon történő vizsgálata pedig azért nem volna célszerű, mert a szarvasmarha (általánosabban a kérődző) FcRn receptor vélhetően olyan tulajdonságokkal is rendelkezik, melyek más fajok, így az egér FcRn receptorára nem jellemzőek. Ilyen például az IgG1 öt-tízszeres koncentrációja a kolosztrumban a szérumhoz képest, melyért feltehetően az FcRn receptor felelős.

Ez esetben tehát az optimális megoldást egy olyan transzgenikus modellállat létrehozása jelentí, amelyben a vélhetően teljes, ún.

„expressziós domén” biztosítja a gén integrációs helytől független, kópiaszámfüggő kifejeződését (11. ábra). A mesterséges kromoszómák, illetve mesterséges kromoszóma típusú vektorok (YAC – Mega Yeast Artificial Chromosome, BAC – F-factor-based Bacterial Artificial Chromosome; PAC – P1-derived Artificial Chromosome) alkalmasak nagyméretű genomikus fragmentek befogadására, ezért megfelelőek az általunk tervezett transzgenikus kísérlet vektorának. Mindezek alapján a szarvasmarha FcRn receptor nehézlánc teljes kódoló szakaszát tartalmazó ~100–40 kb méretű BAC klónokat izoláltunk



11. ábra • A szövet- és fejlődésspecifikus, magas szintű génkifejeződéshez szükséges szabályozó elemek bemutatása



és karakterizáltunk, majd injektálásukkal transzgenikus egérvonalakat állítottunk elő. Mivel az FcRn egy heterodimer molekula – egy nehézlánc és egy könnyűlánc ( $\beta 2m$ ) alkotja, hangsúlyoznunk kell, hogy rendszerünkben a szarvasmarha-nehézlánc illetve az egér-könnyűlánc fogja a receptort kialakítani. Korábbi *in vitro* elemzésünk során azt tapasztaltuk, hogy az egérhez közeli, rokon patkány  $\beta 2m$  funkcionális egységet alkot a szarvasmarha nehézláncsal, és képes az IgG molekulákat specifikusan megkötni (Kacsokovics et al., 2000). Ennek alapján feltételezzük, hogy a szarvasmarha FcRn nehézlánc funkcionális FcRn receptort képez az egér  $\beta 2m$  molekulával is, hiszen a patkány és az egér  $\beta 2m$  között nincs értékelhető eltérés a receptor IgG kötőpontján.

A transzgenikus egerek szarvasmarha FcRn nehézlánc expresszióját májból izolált RNS Northern-blot elemzésével ellenőriztük, és megállapítottuk, hogy az FcRn expressziója a vizsgált két vonalban kópiaszámfüggő. Ez az eredmény alátámasztja kezdeti várakozásainkat, azaz a BAC transzgenézis valóban a transzgen által meghatározott, a beépülés helyétől független génkifejeződést eredményez, és lehetővé teszi különböző, génregulációt célzó *in vivo* kezelések elvégzését.

### Következtetések

Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a szarvasmarha neonatalis Fc receptor (FcRn) nemcsak a tőgyben, hanem más szervek azon sejtjeiben fejeződik ki, amelyek a nyálkahártya immunvédelmében közreműködő IgG1 szekrécióját biztosítják. További elemzéseink megerősítették, hogy ez a receptor a szarvasmarha vérér endotélsejtjeiben is kifejeződik, és hasonlóan az eddig vizsgált fajokhoz, megakadályozza a keringő IgG gyors lebomlását. Tiszázásra vár, hogy az epitélsejtekben milyen módon történik az IgG transzcitózisa, milyen tényezők befolyásolják a receptor intracelluláris lokalizációját, és milyen hatással bír a tőgyszövetben tapasztalt átrendeződés a sejtek IgG transzportjára. Fontos kérdés, hogy milyen faktorok befolyásolják a receptor expresszióját ezekben a sejtekben, és hogyan lehetne azt mesterségesen befolyásolni. A további elemzéshez transzgenikus egérvonalakat állítottunk elő, amelyek alkalmasnak tűnnek eredményeink *in vivo* kísérletekkel történő kiegészítésére, ill. a szervezetben zajló összetett folyamatok pontosabb elemzésére.

Pályázati támogatások: KI – OTKA035209, OMFB-01605/2002; BZS – 01606/2002

### IRODALOM

- Berezikov, Eugene – Guryev, V. – Plasterk, R. H. – Cuppen, E. (2004): CONREAL: Conserved Regulatory Elements Anchored Alignment Algorithm for Identification of Transcription Factor Binding Sites by Phylogenetic Footprinting. *Genome Research*. 14, 1, 170–178.
- Brambell, F. W. Rogers – Halliday, R. – Momis, 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 of London. Series B*. 149, 1.
- Brambell, F. W. Rogers – Hemmings, W. A. – Momis, I. G. (1964): A Theoretical Model of Gammaglobulin Catabolism. *Nature*. 203, 1352–1355.
- Ehrlich, Paul (1892): Über Immunität durch Vererbung und Säugung. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*. 12, 183–203.
- Ghetie, Victor – Ward, Elizabeth S. (2002): Transcytosis and Catabolism of Antibody. *Immunologic Research*. 25, 2, 97–113.
- Heinemeyer, Thomas – Wingender, E. – Reuter, I. – Hensjakob, H. – Kel, A. E. – Kel, O. V. – Ignatieva, E. V. – Ananko, E. A. – Podkolodnaya, O. A. – Kolpakov, F. A. – Podkolodny, N. L. – Kolchanov, N. A. (1998): Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Research*. 26, 1, 362–367.
- Hinton, Paul R. – Johlfs, M. G. – Xiong, J. M. – Hanestad, K. – Ong, K. C. – Bullock, C. – Keller, S. – Tang, M. T. – Tso, J. Y. – Vasquez, M. – Tsurushita, N. (2004): Engineered Human IgG Antibodies with Longer Serum Half-Lives in Primates. *The Journal of Biological Chemistry*. 279, 8, 6213–6216.
- Kacsokovics Inre (2003): A tehéntej immunglobulinja – a jövő precíziós fegyvere a bélfertőzések ellen.

- Magyar Tudomány. 4, 461–469.
- Kacskovics Imre – Kis Z. – Mayer B. – West, A. P. – Tiangco, N. E. – Tilahun, M. – Cervenak, L. – Bjorkman, P. J. – Goldsby, R. A. – Szenci O. – Hammarström, L. (2005): FcRn Mediates Elongated Serum Half-life of Human IgG in the Cattle. *The Journal of Immunology*. (közlésre benyújtva)
- Kacskovics Imre – Wu, Z. – Simister, N. E. – Frenyó L. V. – Hammarstrom, L. (2000): Cloning and Characterization of the Bovine MHC Class I-like Fc Receptor. *The Journal of Immunology*. 164, 4, 1889–1897.
- Kuroiwa, Yoshimi – Kasinathan, P. – Choi, Y. J. – Naeem, R. – Tomizuka, K. – Sullivan, E. J. – Knott, J. G. – Duteau, A. – Goldsby, R. A. – Osborne, B. A. – Ishida, I. – Robl, J. M. (2002): Cloned Transchromosomal Calves Producing Human Immunoglobulin. *Nature Biotechnology*. 20, 9, 889–894.
- Li, Qitang – Verma, Inder M. (2002): NF-kappaB Regulation in the Immune System. *Nature Reviews Immunology*. 2, 10, 725–734.
- Lobo, Evelyn D. – Hansen, R. J. – Balthasar, J. P. (2004): Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 93, 2645–2668.
- Mayer Balázs – Doleschall M. – Bender B. – Bartyik J. – Bősze Z. – Frenyó V. L. – Kacskovics I. (2005): Expression of the Neonatal Fc Receptor (FcRn) in the Bovine Mammary Gland. *The Journal of Dairy Research*. (közlésre elfogadva)
- Mayer Balázs – Kis Z. – Kaján G. – Frenyó L. V. – Hammarstrom, L. – Kacskovics I. (2004): The Neonatal Fc Receptor (FcRn) Is Expressed in the Bovine Lung. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 98, 1–2, 85–89.
- Mayer Balázs – Zolnai A. – Frenyó L. V. – Jancsik V. – Szentimay 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, 3, 288–296.
- Schug, Jonathan – Overton, G. Christian (1997): *TESS: Transcription Element Search System on the WWW*. Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania
- Tiwari, Bhavana – Junghans, Richard P. (2005): Functional Analysis of the Mouse Fcgrt 5' Proximal Promoter. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1681, 2–3, 88–98.
- Waldmann, Thomas A. – Strober, Warren (1969): Metabolism of Immunoglobulins. *Progress in Allergy*. 13, 1–110.
- West, Anthony P. Jr. – Bjorkman, Pamela J. (2000): Crystal Structure and Immunoglobulin G Binding Properties of the Human Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor. *Biochemistry*. 39, 32, 9698–9708.
- Wingender, Edgar – Chen, X. – Fricke, E. – Geffers, R. – Hehl, R. – Liebich, I. – Krull, M. – Matys, V. – Michael, H. – Ohnhauser, R. – Pruss, M. – Schacherer, F. – Thiele, S. – Urbach, S. (2001): The TRANSFAC System on Gene Expression Regulation. *Nucleic Acids Research*. 29, 1, 281–283.