

metszeteket készíttette. Továbbá köszönöm **Dr. Bartyik János** (Enyingi Agrár Rt), főállatorvosnak, hogy lehetővé tette a biopsziás mintavételeket szarvasmarhákból, és **Dr. Bajcsy Árpád Csabának** (Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika), hogy segítségünkre volt a biopsziás mintavételi eljárás kidolgozásában.

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A neonatalis Fc receptor (FcRn)
génexpressziójának szöveti lokalizációja
különböző élettani stádiumú kérődzőkben**

PhD értekezés tézisei

Készítette:

Mayer Balázs

2005

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Frenyó V. László, PhD

egyetemi tanár

SzIE, ÁOTK, Élettani és Biokémiai Tanszék

Dr. Kacskovics Imre, PhD

tudományos főmunkatárs

SzIE, ÁOTK, Élettani és Biokémiai Tanszék

Dr. Jancsik Veronika, PhD

egyetemi magántanár

SzIE, ÁOTK, Anatómiai és Szövetteni Tanszék

Készült 8 példányban. Ez a 8. sz. példány.

Mayer Balázs

in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. *J Immunol.* 169, 6822-6830.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Frenyó V. Lászlónak**, aki mindvégig mellettem állt és támogatta munkámat.

Különösen hálás vagyok konzulenseimnek, **Dr. Kacskovics Imrének** és **Dr. Jancsik Veronikának**, akik bevezettek a molekuláris-biológiai illetve szövetteni vizsgálati módszerek világába. A kísérlettervezés, a laboratóriumi munka és a publikációk írása során szintén sokat tanultam tőlük.

Köszönöm a sokrétű segítséget kollégáimnak, **Dr. Zolnai Annának** és **Dr. Kis Zsuzsannának**, valamint kollégáimnak **Doleschall Mártonnak**. Hálával tartozom asszisztenseinknek **Méhes Ágnesnek**, **Horn Ilonának** és **Bíró Zsoltnak** a laboratóriumban nyújtott kiváló technikai segítségért. Hálás vagyok **az Élettani és Biokémiai Tanszék összes munkatársának**.

Köszönet illeti **Mészáros Ágnest** (Országos Állategészségügyi Intézet), aki a paraffinos szövettani

bovine mammary gland around the time of parturition. *J Dairy Res. (in press)*

Referált magyar nyelvű folyóiratokban megjelent közlemények:

Mayer B., Zolnai A., Frenyó V. L., Jancsik V., Szentirmay Z., Hammarström L. és Kacs Kovics I. 2004. A maternális immunitás átadása kérődzőkben. *Magyar Állatorvosok Lapja* 126. 31-38.

Kis Zs., Mayer B., Juhász V., Doleschall M., Frenyó V. L., Kacs Kovics I. 2004. A szarvasmarha neonatalis Fc-receptorának (bFcRn) tőgybeli expressziója és IgG-kötő képessége. *Magyar Állatorvosok Lapja* 126. 598-605.

Egyéb közlemények

Referált angol nyelvű folyóiratokban megjelent közlemények:

Butler, J. E., Weber, P., Sinkora, M., Baker, D., Schoenherr, A., Mayer, B., Francis, D., 2002. Antibody repertoire development

Előzmények

Az újszülött immunrendszere a megszületést követő hetekben meglehetősen fejletlen és éppen ezért nem tud hatékonyan részt venni a fertőzések megakadályozásában. Ezt az időleges védelmi hiányt pótolják az anya immunrendszere által termelt ellenanyagok, amelyek a kórokozók széles spektrumával szemben nyújtanak specifikus védelmet. Anyai, vagy maternális immuntranszportnak nevezzük azt a folyamatot, amelynek során az anya jelentős mennyiségű immunglobulin „átadásával” biztosítja az újszülött életben maradását az élet első időszakában. Ezt a rendszert végső soron egyfajta „immunológiai tapasztalat” közvetítésének is felfoghatjuk, hiszen az anyában olyan ellenanyagok találhatók, amelyeket a környezetében található kórokozókkal szemben termelt. Minthogy az újszülött természetes élettere megegyezik az anyáéval, az ily módon nyert „tapasztalat” hatásos az újszülöttet fenyegető kórokozók semlegesítésében is. Az evolúció során többféle mechanizmus alakult ki, amely lehetővé teszi, hogy az anyai ellenanyagok átkerüljenek az újszülöttbe, és ezzel passzív védettséget biztosítsanak a kezdeti időszakban, mindaddig, amíg a fiatal szervezet immunrendszere védekezni képes a fertőzésekkel szemben.

Kérődzők esetén a maternális (anyai) immunanyagok átadása kizárólag a kolosztrális immunglobulin-transzfer révén valósul meg. Szarvasmarhában az ellés előtt pár héttel jelentősen lecsökken a vér immunglobulin (Ig) G1 koncentrációja, és az IgG1 szelektív transzporttal jut az anyai keringésből a kolosztrumba a tőgy acinus epithel sejtein keresztül. Az újszülött állat vékonybelében az immunglobulinok felvétele nem-specifikus folyamat, de később ezt egy IgG1 specifikus transzport követi, amely a felvett IgG1-et visszajuttatja a crypta sejteken keresztül az újszülött állat vékonybél lumenébe, ahol az a fertőzések elleni védelemben játszik szerepet. A tőgy és a vékonybél mellett más szervek (például a tüdő) és szövetek nyálkahártyával borított felszínein is jelentős mennyiségű IgG1 található a szekréumban. Kérődzőkben, a nyálkahártyák váladékában az IgA mellett az IgG1 a legjelentősebb immunglobulin, amit az is alátámaszt, hogy az IgA-hoz hasonlóan jobban ellenáll a proteolízisnek, mint az IgG2.

Bár az IgA epithel sejten keresztül történő transzportját már jellemezték, és a közreműködő polimer Ig receptort azonosították, az a mechanizmus, amelynek segítségével az IgG az epithelialis barrieren keresztül halad, nem ismert.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Referált angol nyelvű folyóiratokban megjelent közlemények:

Mayer, B., A. Zolnai, L. V. Frenyo, V. Jancsik, Z. Szentirmay, L. Hammarstrom and I. Kacs Kovics. 2002. Localization of the sheep FcRn in the mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 327-330.

Mayer, B., A. Zolnai, L. V. Frenyo, V. Jancsik, Z. Szentirmay, L. Hammarstrom and I. Kacs Kovics. 2002. Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. *Immunology* 107, 288-296.

Mayer, B., Z. Kis, G. Kajan, L. V. Frenyo, L. Hammarstrom and I. Kacs Kovics. 2004. The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. *Vet Immunol Immunopathol* 98, 85-89.

Mayer, B., L. V. Frenyó, J. Bartyik, B. Bender, Z. Bősze and I. Kacs Kovics. Expression of neonatal Fc receptor (FcRn) in the

A bovin FcRn jelenléte a kapilláris endothel sejtekben arra utal, hogy a receptornak az egér és a humán receptor funkciójával megegyezően a szarvasmarhában is szerepe van az IgG homeosztázisának biztosításában. A vese proximális tubulus epithel sejteiben expresszálódó FcRn feladata feltehetően – a humán vesében kifejeződő FcRn-hez hasonlóan – a szűrletbe került kis mennyiségű IgG molekula megkötése, és visszajuttatása a vérkeringésbe.

Az FcRn expresszió szintjének változásáról vagy az expresszió szabályozásáról kevés ismeretanyag áll rendelkezésre. A receptor α -lánc promotorszakaszának elemzését több kutatócsoport, köztük a mi munkacsoportunk is megkezdte, mivel a génextpresszió szabályozásának pontosabb ismerete és befolyásolása az alapkutatás szempontjából is érdekes, és a klinikum számára is sokféle lehetőséget adhat. A jövőbeli kutatások eredményeképpen, a kérődző FcRn génextpressziójának és ezen keresztül az Ig transzportnak a befolyásolása révén elképzelhető nagy mennyiségű állati eredetű Ig vagy transzgénikus állatban termelt humán Ig előállítását állatorvoslási, illetve emberi gyógyászati célokra.

Az IgG transzportjában újszülött egerek, patkányok vékonybelében és az emberi placentában a neonatalis Fc receptor (FcRn) vesz részt. Az FcRn egy MHC (major histocompatibility complex) I típusú glikozilált α -láncból és β 2-mikroglobulinból áll. Az FcRn az IgG molekulát pH-függő módon köti (pH 6.0 -kötés, pH 7.5 -disszociáció). Az epithel sejteken kívül endothel sejtekben is leírták a receptor expresszióját. Az endothel sejtekben kifejeződő FcRn az IgG homeosztázisának fenntartásában játszik szerepet, megköti az IgG molekulákat, és megvédi azokat a lizoszómális degradációtól.

Kacsokics és munkatársai (2000) korábban klónozták és karakterizálták a szarvasmarha FcRn-t, és expresszióját Northern blotol kimutatták számos szövetből, köztük a tőgyből és a vékonybélből is. Disszertációm a kérődzők FcRn expressziójának szöveti lokalizációját elemzi. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a receptor epithel vagy endothel sejtekben expresszálódik-e a tőgyben, vékonybélben, tüdőben, valamint a vesében; és hogyan változik az expressziója a tőgyben az IgG transzport idején, illetve mi lehet a szerepe az IgG szekréciójában.

Célkitűzések

- A juh FcRn α -lánc cDNS klónozása és jellemzése
- Az FcRn α -lánc mRNS detektálására alkalmas *in situ* hibridizációs módszer kidolgozása transzfektált sejteken és szöveti metszeteken
- Az FcRn α -lánc mRNS lokalizációja szarvasmarha és juh tőgy, valamint szarvasmarha tüdő metszeteken
- FcRn α -lánc specifikus ellenanyag előállítás
- Az FcRn α -lánc lokalizációjára alkalmas immunhisztokémiai metodika létrehozása
- FcRn fehérje kimutatása szarvasmarha és juh tőgy, szarvasmarha és újszülött bárány vékonybél valamint szarvasmarha tüdő és vese metszeteken
- Az FcRn gén tőgyszöveti expressziójának lokalizációja és a lokalizáció változásainak jellemzése az ellés körüli időben
- Az acinus sejtek pH-függő IgG kötésének detektálása tőgy szöveti metszeten

ez az a receptor, amely az epithelialis IgG1 szekrécióban szerepet játszik. Azonban feltevésünk további vizsgálatot igényel, amely arra irányul, hogy az IgG1 és IgG2 FcRn receptorhoz való kötésének affinitását elemezze.

Ami a második feltételt illeti, mind a szarvasmarha, mind a juh FcRn α -lánc az eddig ismert szekvenciáknál rövidebb. Mesterségesen csonkolt patkány FcRn-nel végzett transzport kísérletek alapján feltételezhető, hogy a kérődzőknél a mintegy 10 aminosavmaradékkal rövidebb citoplazmikus farokrész okozza a sejten belüli IgG transzport bazolaterális-apikális irányultságát, de ezt a feltevést kísérletekkel még nem támasztották alá. Ezenkívül a kérődzőkben a citoplazmikus farokrész triptofán motívuma a patkány triptofán motívumtól eltérő. A szekvenciális különbségek IgG transzportra vagy endocitózisa való hatásának elemzéséhez további kísérletes eredmények szükségesek.

Az FcRn kifejeződése a tőgy és vékonybél mellett egyéb szövetek epithel sejteiben, mint az általunk vizsgált légutak hámlja, felveti egy mostanáig nagyrészt figyelmen kívül hagyott IgG1 ellenanyagokat szekretáló rendszer létét a kérődzőkben, amely a nyálkahártyák felszínének fertőzés elleni védelméhez járul hozzá.

9. Immunhisztokémiai módszerrel kimutattuk a szarvasmarha vékonybél lamina propria kapilláris endothel sejteiben és a vese proximális tubulus epithel sejteiben az FcRn α -lánc expresszióját.

Következtetések

A kóródzók szérum-kolosztrum irányú IgG transzportban résztvevő receptorának két feltételnek kell megfelelnie. 1.) szelektíven köti és/vagy transzportálja az IgG1 molekulát, 2.) bazolaterális-apikális irányú transzportot közvetít.

Az első feltételhez közvetett bizonyítékkal szolgál az a megállapítás, hogy az FcRn-t olyan epithel sejtekből mutattuk ki, amelyekben immunhisztokémiai módszerrel szintén detektálták az IgG1-et. A receptor α -láncának mRNS expressziója megfigyelésünk szerint nem változik lényegesen az acinus epithel sejtekben az ellés környékén, ami összhangban van azzal az irodalmi adattal, amely a tőgyben az α -lánc expressziójának konstans szintje mellett a β 2-mikroglobulin mRNS szint növekedését állapítja meg a maternális IgG transzfer idején. A receptor fehérje acinus sejteken belüli lokalizációjának szembevetésű változása és az újszülött bárány és felnőtt szarvasmarha vékonybél crypta sejteiben detektált FcRn apikális elhelyeződése arra utal, hogy

Anyag és módszer

A juh FcRn cDNS-t a már ismert szarvasmarha szekvenciára tervezett primerek segítségével, illetve 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) technikával klónoztuk.

A bovin és ovin FcRn α -lánc mRNS kimutatására PCR módszerrel előállított, egyszálú, digoxigeninnel jelölt cDNS próbákat használtunk. A transzfektált sejtekben és a szöveti metszeten az mRNS-hez *in situ* hibridizációval kötődő próbát alkalikus foszfátazzal kapcsolt anti-digoxigenin ellenanyaggal detektáltuk. Az anti-digoxigenin ellenanyaghoz kapcsolt alkalikus foszfátáz enzimet NBT/BCIP szubsztrát oldat hozzáadásával mutattuk ki.

Az FcRn specifikus ellenanyag előállítására az FcRn α -lánc egy szakaszának (melynek aminosavsorrendje juhnál és szarvasmarhánál megegyezik) megfelelő, szintetizált oligopeptiddel nyulakat immunizáltunk. Az anti-szérumot Sulfolink géll tartalmú affinitásoszlopon tisztítottuk, és Western blotlalt teszteltük. Az immunhisztokémiai módszernél az affinitás-tisztított szérumot, biotinnal jelölt anti-nyúl antitestet és avidin-biotin peroxidáz komplex kitet használtunk. Színszubsztrátként 3,3'-diaminobenzidint alkalmaztunk.

Az *in situ* hibridizációhoz és az immunhisztokémiahoz a szövetszmintákat vágóhídról szereztük be, vagy automata

biopsziás készülékkel vettük azokat ellés körüli időben. A mintákat paraformaldehidben fixáltuk, és paraffinba ágyasztuk, majd a paraffin blokkokból szövettani metszeteket készítettünk.

A receptor pH-függő IgG kötését a metszetek felületén citratos antigén feltárás után, cianin 2 (Cy2)-vel jelölt bovin IgG hozzáadásával vizsgáltuk. A jelölt IgG kötődését fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük.

Új tudományos eredmények

1. *In situ* hibridizációs módszerrel szárazonálló tehén tőgy acinus és ductus sejteiből mutattuk ki az FcRn α -lánc mRNS-t.
2. Klónoztuk és karakterizáltuk a juh FcRn α -lánc cDNS-t.
3. Vemhes anyajuhokból tőgybiopsziátumokat vettünk az ellés körüli időben, és az előkészített metszeteken *in situ* hibridizációt végeztünk a juh FcRn-re specifikus cDNS próbával. Az FcRn α -lánc mRNS-t kizárólag az IgG1 transzportért felelős acinus és ductus sejtekből tudtuk kimutatni. Az expressziós szintben nem tapasztaltunk lényeges eltérést az ellés előtt és ellés utáni mintáknál.
4. *In situ* hibridizációs eredményeinket immunhisztokémiával erősítettük meg, a receptor fehérjét szintén az acinus és ductus sejtekben

detektáltuk. A receptor sejten belüli lokalizációjában azonban lényeges változást állapítottunk meg az ellés után. Az ellés előtti egyenletes, diffúz eloszlás helyett ellés után az epithel sejtek apikális, lumen felőli része festődött. Az involúció idején a jel ismét diffúzzá vált.

5. A receptort kimutattuk újszülött bárány és felnőtt szarvasmarha duodenumának crypta sejteiből is, amelyekről újszülött borjakban leírták, hogy IgG1-et szekretálnak a vékonybél lumenébe.

6. Egy újabb biopsziás vizsgálatssorozattal igazoltuk, hogy szarvasmarhában a tőgy acinus sejteiben jelen lévő FcRn szintén a juhnál megfigyelt sejten belüli lokalizáció-változást mutatja az ellés körüli időben.

7. Az ellés előtt gyűjtött szöveti metszetten igazoltuk a tehén tőgy acinus sejtek pH-függő IgG kötését (pH 6.0: kötés, pH 7.4: alig kimutatható kötés).

8. Elemeztük az FcRn génexpresszió lokalizációját szarvasmarha tüdőben, és a receptort RNS és fehérje szinten a bronchus epithelben, a bronchiolus epithelben és az alveolusokból mutattuk ki. A trachea epithel sejteiben sem *in situ* hibridizációval sem immunhisztokémiával nem tudtuk a receptor jelenlétét detektálni.