

**Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

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

**PhD értekezés**

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. Kacs Kovics Imre, PhD  
tudományos főmunkatárs  
SziE, ÁOTK, Élettani és Biokémiai Tanszék

Dr. Jancsik Veronika, PhD  
egyetemi magántanár  
SziE, ÁOTK, Anatómiai és Szöveti Tanszék

Készült 8 példányban. Ez az 1. sz. példány.

---

Mayer Balázs

# Tartalomjegyzék

|  |    |
|--|----|
| Tartalomjegyzék.....   | 3  |
| Rövidítések.....   | 5  |
| Összefoglalás.....   | 6  |
| 1. Bevezetés.....  | 10 |
| 2. Irodalmi áttekintés.....  | 12 |
| 2.1. A kérődzők immunglobulinjai és immunglobulin génjei.....  | 12 |
| 2.2. A kérődzők immunglobulinjainak megoszlása a tejmirigy és nyálkahártya<br>szekrétaumokban.....   | 13 |
| 2.3. A szekrétaum immunglobulinjainak eredete.....   | 16 |
| 2.4. A kérődzők maternalis immuntranszportjának jellemzői.....   | 19 |
| 2.5. A neonatalis Fc receptor és szerkezeti sajátosságai .....   | 23 |
| 2.6. Az FcRn szerepe a rágcsálók IgG transzportjában.....  | 25 |
| 2.7. Az FcRn szerepe a humán transzplacentális IgG transzportban .....   | 26 |
| 2.8. Az FcRn részt vesz az IgG homeosztázisban.....  | 27 |
| 2.9. Az FcRn egyéb funkciói.....   | 29 |
| 2.10. Az FcRn expressziója patkány máj- és agyszövetben.....   | 30 |
| 2.11. Az FcRn expressziója humán vesében .....   | 31 |
| 2.12. A légzőszervrendszerben expresszálódó FcRn funkciója .....   | 31 |
| 2.13. Az FcRn és a tejbe irányuló IgG transzport .....   | 31 |
| 2.14. A bovin neonatalis Fc receptor (bFcRn) klónozása és karakterizálása.....   | 32 |
| 2.15. A bovin FcRn génexpressziójának kimutatása különböző szövetekből.....  | 32 |
| 3. Célkitűzések .....  | 34 |
| 4. Anyag és módszer .....  | 35 |
| 4.1. BFcRn transzfectált sejtek és negatív kontroll sejtek előkészítése <i>in situ</i> hibridizációhoz<br>.....                                  | 35 |
| 4.2. Szövetminták előkészítése.....  | 35 |
| 4.3. Juh FcRn nehézlánc klónozása.....   | 36 |
| 4.4. A digoxigeninnel jelölt próba készítése .....   | 36 |
| 4.5. <i>In situ</i> hibridizáció.....  | 37 |
| 4.6. Az FcRn specifikus antiszérum elkészítése .....   | 38 |
| 4.7. Western blot .....  | 40 |
| 4.8. Immunhisztokémia .....  | 41 |
| 4.9. A pH-függő IgG kötés vizsgálata metszeteken .....   | 41 |
| 4.10. RT-PCR.....  | 41 |
| 5. Eredmények.....   | 43 |
| 5.1. A juh FcRn klónozása .....  | 43 |
| 5.2. <i>In situ</i> hibridizáció (ISH).....  | 46 |
| 5.3. Western blot és immunhisztokémia .....  | 48 |
| 5.4. Az FcRn pH-függő IgG kötés vizsgálata szöveti metszeteken .....   | 52 |
| 6. Megvitatás .....  | 54 |
| 6.1. A maternalis IgG transzport és a bovin FcRn $\alpha$ -lánc expressziója a tőgyben.....  | 54 |
| 6.2. A bovin FcRn $\alpha$ -lánc mRNS tőgyszöveti lokalizációja <i>in situ</i> hibridizációval .....   | 54 |
| 6.3. A juh FcRn $\alpha$ -lánc cDNS klónozása és az FcRn $\alpha$ -lánc mRNS tőgyszöveti lokalizációja<br>az ellés körüli időben.....            | 55 |
| 6.4. Az FcRn $\alpha$ -lánc fehérje szintű lokalizációja a tőgybioptátumokban az ellés körüli<br>időben és a tőgyszövet pH-függő IgG kötése..... | 56 |
| 6.5. Az FcRn feltételezett szerepe a tőgyben .....   | 56 |
| 6.6. Az FcRn $\alpha$ -lánc expressziója a vékonybélben .....  | 58 |
| 6.7. Az FcRn $\alpha$ -lánc expressziója az alsó légutakban .....  | 60 |
| 6.8. A kérődzők epithel sejteiben kifejeződő FcRn feltételezett szerepe.....   | 61 |

|   |    |
|---|----|
| 6.9. Az FcRn $\alpha$ -lánc expressziója szarvasmarha endothel sejtekben.....       | 61 |
| 6.10. Az FcRn $\alpha$ -lánc expressziója szarvasmarha vesében.....                 | 61 |
| 6.11. Az FcRn génexpresszió szabályozásának elméleti lehetősége és jelentősége..... | 62 |
| 7. Új tudományos eredmények.....  | 64 |
| 8. Irodalom.....  | 65 |
| 9. A kutatási témában megjelent közlemények.....                                    | 73 |
| 9.1. Referált angol nyelvű folyóiratokban megjelent közlemények .....               | 73 |
| 9.2. Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények.....                          | 74 |
| 9.3. Referált magyar nyelvű folyóiratokban megjelent közlemények .....              | 75 |
| 10. Egyéb közlemények .....   | 76 |
| 10.1. Referált angol nyelvű folyóiratokban megjelent közlemények .....              | 76 |
| 11. Köszönetnyilvánítás .....   | 77 |

## Rövidítések

|          |   |
|----------|---|
| AP-2     | adaptor protein-2   |
| β2m      | beta-2-mikroglobulin  |
| bFcRn    | szarvasmarha neonatalis Fc receptor (bovine neonatal Fc receptor) |
| bp       | bázispár  |
| BSA      | bovin szérum albumin (bovine serum albumin)                       |
| cDNS     | komplementer dezoxiribonukleinsav                                 |
| DEPC     | dietil-pirokarbonát (diethyl-pyrocarbonate)                       |
| DIG      | digoxigenin   |
| DMEM     | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                                |
| DPBS     | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline                              |
| dTTP     | dezoxitimidin trifoszfát  |
| dUTP     | dezoxiuridin trifoszfát   |
| EDTA     | etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediamine tetra acetic acid)    |
| Fc       | Fragment crystallizable   |
| FcγR     | IgG Fc receptor   |
| FcR      | immunglobulin Fc receptor   |
| FcRn     | neonatalis Fc receptor (neonatal Fc receptor)                     |
| HBS      | HEPES-buffered saline   |
| HEPES    | N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]           |
| Ig       | immunglobulin   |
| IMCD     | inner medullary collecting duct (patkány vesehámsejt)             |
| kDa      | kiloDalton  |
| MDBK     | Madin-Darby bovine kidney (szarvasmarha vesehámsejt)              |
| MHC I    | major histocompatibility complex I                                |
| M-MLV    | Moloney-Murine Leukemia Virus                                     |
| mRNS     | messenger ribonukleinsav  |
| NBT/BCIP | nitroblue tetrazolium salt/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate   |
| oFcRn    | juh neonatalis Fc receptor (ovine neonatal Fc receptor)           |
| PBS      | Phosphate Buffered Saline   |
| PFA      | paraformaldehid   |
| PCR      | polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)                 |
| PEG      | polietilén-glikol   |
| PVDF     | polivinil-difluorid   |
| RACE     | rapid amplification of cDNA ends                                  |
| RNS      | ribonukleinsav  |
| Rpm      | rate per minute   |
| RT       | reverz transzkriptáz  |
| SDS      | sodium dodecyl sulfate  |
| SSC      | sodium saline citrate   |
| TBS      | Tris-buffered saline  |
| tRNS     | transzfer ribonukleinsav  |

## Összefoglalás

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 maternalis 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 találhatóak, 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.

A domesztikált háziállatok (ló, sertés és a kérődzők) utódai a maternalis immunglobulin készletet (elsősorban immunglobulin G; IgG) a születést követő néhány óra alatt elfogyasztott fűcskej (kolosztrum) révén veszik fel.

A kérődzőkben a vér IgG1 és IgG2 koncentrációja közel azonos, azonban az ellés előtt 2-3 héttel **a tőgy acinus sejtjein keresztül lezajló IgG transzport** révén nagy mennyiségű maternalis ellenanyag (IgG1) jut a kolosztrumba. A transzport ellés körüli időzítése és nagyfokú szelektivitása **specifikus receptor mediált** folyamatot feltételez, e feltételezést szövettani és radioaktív módszerrel végzett receptor elemzések eredményei is alátámasztják. A kolosztrumba irányuló immunglobulintranszportot követően a kolosztrummal felvett anyai immunglobulinok az újszülött kérődzők vékonybelében, *nem-specifikus folyamat során felszívódnak*. A fiatal kérődzők esetén azonban a már vérpályába került **IgG1** egy része a **vékonybél crypta sejtjeinek aktív transzportáló** tevékenysége révén ismét a lumenbe kerül, ahol hozzájárul az emésztőtraktus specifikus immunvédelméhez. Funkcionális anyai immunglobulinokat a vékonybél szekrétuma mellett a légutak nyálkahártya szekrétumaiban is kimutattak. **A nyálkahártya IgG1 szekréciója kifejezett egyedekben is többféle szövetben kimutatható.**

A maternalis immunglobulinok transzport receptora, – rágcsálók és az ember esetében – a **neonatalis Fc receptor (FcRn)** MHC I típusú heterodimer fehérje, amely egy  **$\alpha$ -láncból** és a hozzá másodlagos kötőerőkkel kapcsolódó  **$\beta$ 2-mikroglobulinból** épül fel. Az FcRn-t először újszülött rágcsálók bélhámsejtjeiben azonosították, ezt követően kimutatták az emberi placenta

syncytiotrophoblast sejteiből és számos, az IgG-t transzportáló epithel sejtéből, valamint vérér endothel sejtekből. *Az epithel sejtekben expresszáldó FcRn az IgG transzportban, az endothel sejtekben jelen lévő receptor pedig az IgG homeosztázisában játszik szerepet.*

Kacs Kovics és munkatársai az utóbbi időben klónozták a **szarvasmarha FcRn  $\alpha$ -láncát** és Northern blottal több szövetből, köztük *a tőgyből és a vékonybélből is kimutatták e gén expresszióját* (KACSKOVICS et al., 2000). Tekintettel arra, hogy az FcRn emberben és rágcsálókban az epithel és az endothel sejtekben egyaránt kifejeződik, elsődlegesen arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a receptor a tőgyben milyen sejtekben fejeződik ki, és változik-e a kifejeződés mértéke, illetve jellege az ellés környéki időszakban.

Ennek eldöntésére először *in situ* hibridizációs módszert fejlesztettünk ki, és szarvasmarha tőgyszöveti metszeteken elemeztük az FcRn génexpresszió lokalizációját. Vágóhídi mintákon, szárazonálló **tehén tőgyszövetet elemezve az FcRn  $\alpha$ -lánc mRNS expressziót az acinus és ductus epithel sejtekben mutattuk ki.** Tekintettel arra, hogy a tőgyszöveti IgG1 szekréció szorosan összefügg az elléssel, megvizsgáltuk a receptor kifejeződését az ellés környékén mRNS és fehérje szinten is. Biopsziás vizsgálataink kezdetén, elsősorban gazdasági megfontolásból, a kiskérdő juh fajt választottuk. A juh tőgybiopátumokban az ellés előtt és azt követően az FcRn  $\alpha$ -lánc mRNS-t kizárólag az acinus és ductus sejtekben detektáltuk. Ugyanezen minták **immunhisztokémiai elemzése azt mutatta, hogy az acinusok és ductusok epithel sejteinek citoplazmája az ellés előtt egyöntetűen festődött, azonban az ellés után az FcRn  $\alpha$ -láncot csak az epithel sejtek apikális részén lehetett kimutatni.** A juhon végzett vizsgálatokat a későbbiekben ellés környéki teheneken megismételtük, és ugyanazokat az eredményeket kaptuk.

Az újszülött bárány és a felnőtt szarvasmarha vékonybéllel kapcsolatos vizsgálatainkban azt találtuk, hogy **az FcRn az IgG1 molekulákat szekretáló crypta sejtekben expresszáldik,** és főleg az apikális részen lokalizálódik. A korábbi elképzelésnek megfelelően, amely nem-specifikusnak jellemzi a kolosztrális IgG felszívódást, nem tudtuk kimutatni az FcRn jelenlétét az újszülött állatok enterocitáiban.

Az FcRn jelenléte a tőgy acinus és ductus epithel sejteiben és az eloszlásában bekövetkező jelentős változás az ellés előtt és után azt sejteti, hogy az FcRn fontos szerepet játszik az IgG transzportban a kolosztrumképzés idején. Hipotézisünket az a tény is alátámasztja, hogy FcRn expressziót találtunk az újszülött bárány és felnőtt szarvasmarha vékonybél (duodenum) crypta sejteiben, amelyekről már újszülött borjak esetén leírtak IgG1 szekréciót.

A szarvasmarhában nemcsak az újszülöttben, hanem még a kifejlett állatoknál is az IgG1 a meghatározó immunglobulin az alsó bronchoalveoláris régióban, ezért elemeztük a légutak FcRn expresszióját. Vizsgálatainkban más fajoknál tapasztaltakhoz hasonlóan megállapítottuk, hogy **az FcRn az alsó légutak és a tüdő alveolusok hámsejtjeiben expresszáldik, ahol a**

**szekrétumban jellemző az IgG túlsúly.** A légutak felső szakaszában az IgA a meghatározó izotípus, és ennek megfelelően a trachea epithel rétegéből nem tudunk FcRn expressziót kimutatni. Feltételezésünk szerint a szarvasmarha FcRn biztosítja az alsó bronchoalveoláris régióban az IgG dominanciáját.

A kérődzők epithel sejteiben kifejeződő FcRn a tejmirigyre, újszülött vékonybélre és a tüdőre vonatkozó adataink alapján tehát szelektíven köti és/vagy transzportálja a lumenbe az IgG1-et, amely a nyálkahártya helyi immunvédelméhez járul hozzá. Szarvasmarhánál az IgG1 általánosan megtalálható a nyál- és a könnymirigy váladékában, valamint a vékonybelet, vastagbelet, tüdőt és az ivari- és kiválasztószerveket bélelő nyálkahártya szekrétumában. **Az előbb említett nyálkahártya felszínre történő IgG transzport mechanizmusa jelenleg nem ismert, mi azonban, az itt leírtak alapján, azt feltételezzük, hogy a folyamat FcRn által közvetített.**

Az FcRn receptor nemcsak az IgG epithel sejteken keresztül történő transzportjában, hanem az IgG katabolizmusában is szerepet játszik, a katabolizmus helyszíne az egerben végzett vizsgálatok szerint a különböző szervekben, szövetekben található kapillárisok endothel rétege. Vizsgálataink során a szarvasmarha FcRn endothelialis jelenlétét detektáltuk a vékonybél lamina propriájában.

Az IgG metabolizmus szempontjából fontos szerepet tölthet be a vese, mert a vérből a glomeruláris filtrátumba került fehérjék, köztük az IgG, általánosan a proximális tubulushámon keresztül szívódnak vissza, ezért csak nagyon csekély mértékben ürülnek a vizelettel. Immunhisztokémiai elemzésünk során a szarvasmarha vese proximális tubulus epithel sejtekben detektáltuk a receptort, a glomerulusok azonban az immunfestődés szempontjából negatívnak bizonyultak. Annak ellenére, hogy a proximális tubulus epithel sejteken belül a receptor lokalizációja a humán proximális tubulus epithel sejtekben jellemző lokalizációtól eltérő (apikális helyett bazális), a funkciója feltehetően a humán FcRn-nel megegyezően az IgG szűrletből a keringésbe történő visszaforgatása, mivel a szarvasmarha vizelet is csak nyomokban tartalmaz IgG molekulákat.

Az előbbi eredmények alapot adnak ahhoz, hogy a továbbiakban értékeljük az FcRn IgG katabolizmusban betöltött szerepét szarvasmarhában.

Vizsgálataink az alap kutatás eredményei mellett jelentős gyakorlati felhasználási területeknek is alapot nyújthatnak. Ilyen alkalmazás e kutatási irány egyik hosszú távú célja is, miszerint e receptor expressziójának befolyásolásával, időbeli meghosszabbításával növelni lehetne a *tej* immunglobulin tartalmát. Amennyiben a teheneket olyan kórokozók előlt vagy legyengített változataival immunizáljuk, amelyek az adott tehenészetben gyakori kórokozói a tőgygyulladásnak, a tej emelt szintű ellenanyag termelése helyileg meggátolhatja a kórokozók



megtelepedését, és ezáltal csökkentené a tőgygyulladás súlyosságát, illetve akár kialakulásának lehetőségét. Egy másik alkalmazási lehetőség, hogy az ilyen tehenek specifikus immunizációt követő nagy mennyiségű ellenanyag tartalmú tejét a humán gyógykezelések során – szájon át alkalmazott (per os) – passzív immunizálással lehetne felhasználni a bélben elszaporodó kórokozókkal szemben.

# 1. Bevezetés

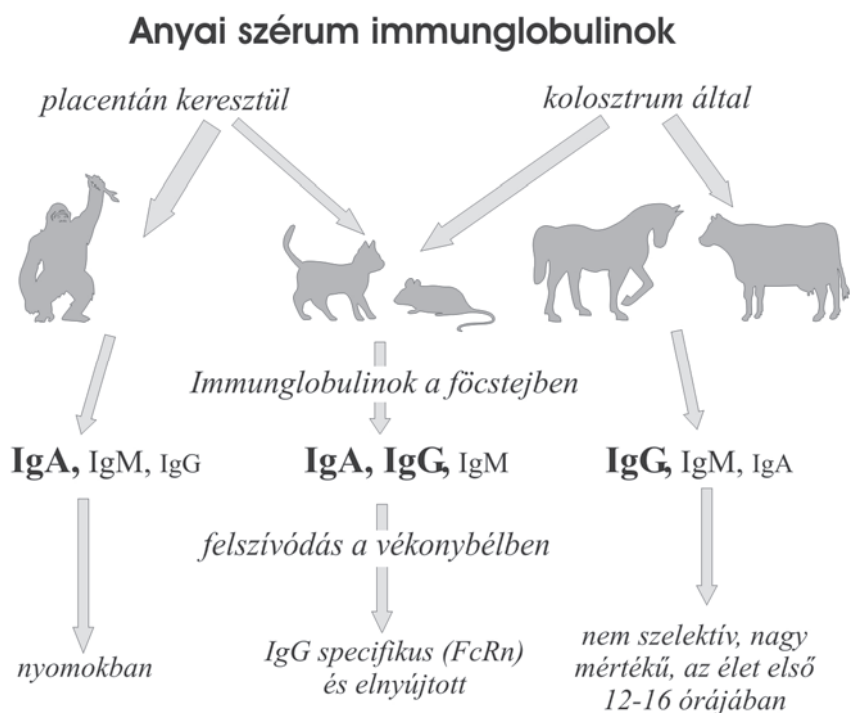
Már a jelenkori tudományos, immunológiai ismeretek elterjedése előtt jól ismert volt a gazdasági haszonállatokkal foglalkozók körében az a jelenség, hogy a csikó, bárány vagy borjú, amely születése után nem jutott főcstejhez (kolosztrumhoz), rövid időn belül elpusztult. Először 1892-ben Paul Ehrlich hívta fel arra a figyelmet, hogy a bekövetkező elhullás oka fertőző betegség (EHRlich, 1892). Azóta tudjuk, hogy ezen újszülöttek immunrendszere a megszületést követő hetekben meglehetősen fejletlen, és ezért nem tud hatékonyan részt venni a fertőzések megakadályozásában. A kezdeti időleges védelmi hiányt az anya immunrendszere által termelt ellenanyagok pótolják, amelyek a kórokozók széles spektrumával szemben nyújtanak specifikus védelmet. Anyai, vagy maternalis immuntranszportnak nevezzük azt a folyamatot, amelynek során az anya jelentős mennyiségű immunglobulin „átadásával” biztosítja az újszülött életben maradását az élet első néhány hetében. Ezt a rendszert végső soron egyfajta „immunológiai tapasztalat” közvetítésének is felfoghatjuk, hiszen az anyában olyan ellenanyagok találhatóak, 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.

Ehrlich korai sejtését, amely szerint a domesztikált háziállatok teje (kolosztruma) az újszülöttnak időlegesen védelmet nyújtó ellenanyagokat tartalmaz, csak 1946-ban igazolta Emil Smith, aki a szarvasmarha kolosztrum fő összetevőjét immun laktoglobulinként jelölte meg (ma immunglobulin G1) (SMITH, 1946).

A szervezetben található immunglobulinok (Ig) közül legjelentősebb és egyben a vérpályában legnagyobb mennyiségben jelenlevő ellenanyag – az IgG – védelmet biztosít vírusok, baktériumok, illetve parazitás fertőzések ellen. Az IgG hiánya – ellentétben más izotípusokkal (IgM, IgA, és IgE) – akár letális kimenetelű kórfolyamatokhoz is vezethet. Az emlősök evolúciója során összetett folyamatok alakultak ki, amelyek az előbb említett IgG izotípus praenatalis és/vagy postnatalis transzportját biztosítják.

Az emlősöket az anyai immunglobulin utódba irányuló transzportja alapján három csoportba sorolják (**1. ábra**). A főemlősök, köztük az emberszabásúak és az ember (I. csoport) a magzati élet során, a méhlepényen keresztül (*in utero*) kapják meg a maternalis immunglobulinok teljes készletét, így az újszülöttek vérében jórészt az anyai immunglobulinok (IgG) jelennek meg. Emellett e fajok újszülöttei jelentős mennyiségű IgA molekulát is felvesznek az anyatejjel, amely helyileg a béltraktusban vesz részt a kórokozók visszaszorításában, de a vérbe nem, vagy csak csekély mértékben szívódik fel. Ezzel szemben a domesztikált háziállatok (ló, a sertés és a kérődzők; III. csoport) magzatai a maternalis

immunglobulin készletet (elsősorban IgG) nem *in utero*, hanem a születést követő néhány óra alatt elfogyasztott föcstej (kolosztrum) révén veszik fel. Ebben az időszakban az újszülött állatok rendhagyó bélhámsejt szerkezete biztosítja, hogy a béltraktusba került immunglobulinok, más makroglobulinokkal együtt intakt formában felszívódhassanak, és a vérpályába kerülhessenek. (E folyamat a születést követő egy-két napon belül lezárul, azaz a bélben levő immunglobulinok ezután már nem képesek ilyen formában a vérbe kerülni – „gut closure”.) A rágcsálók, valamint a ragadozók (II. csoport) újszülöttjei mind *in utero*, mind pedig a kolosztrum révén részesülnek a maternalis immunitásban (összefoglalóan lásd: BUTLER, 1999), illetve a vékonybélben egy kémhatás függő specifikus receptor transzportálja az IgG-t a keringésbe (RODEWALD, 1976).



**1. ábra. Az anyai (maternalis) immuntranszport különböző módjai emlősökben (magyarázat a szövegben), (KACSKOVICS, 2003)**

A jelen dolgozattal kapcsolatos kutatómunkám során a kérődző állatok IgG epitheliális transzportját, illetve egy IgG kötő Fc receptor, a **neonatalis Fc receptor (FcRn) szöveti kifejeződését** vizsgáltam. E receptor génexpressziójának lokalizációját tőgy, vékonybél, tüdő és vese szöveti metszeteken mutattam ki. A kutatócsoportunk által tanulmányozott FcRn molekula, adataink alapján, nemcsak a tőgy szérum-kolosztrum irányú IgG transzportjában, hanem általánosan a kérődzők epithel sejtein keresztül történő IgG transzportban is szerepet játszhat.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A kérődzők immunglobulinjai és immunglobulin génjei

A szarvasmarha és más kérődzők immunglobulinjai homológok a nem kérődző emlősök immunglobulinjaival. Ugyanúgy variábilis és konstans régiókból épülnek fel, mint az egér vagy humán immunglobulinok, ezen felül fizikai és kémiai tulajdonságaik is hasonlóak. Mivel a szarvasmarha, a juh és a kecske közel-rokon fajok, és a szarvasmarháról áll rendelkezésre a legtöbb adat, a szarvasmarháról itt leírtak általában jól alkalmazhatók a többi kérődzőre is (BUTLER, 1983). Megjegyzendő, hogy a tevéfélék kivételt képeznek sajátos, könnyűláncot nem tartalmazó IgG izotípusaik miatt (HAMERS-CASTERMAN et al., 1993).

A szarvasmarha immunglobulin nehézláncok konstans szakaszait kódoló gének a bovin 21. kromoszóma q23-q24 részén található (TOBIN-JANZEN és WOMACK, 1992, CHOWDHARY et al., 1996). A szarvasmarha immunglobulin nehézlánc lokusz konstans régiójában elhelyezkedő géneket, amelyek az IgM, a három IgG alosztály, az IgE és az IgA nehézláncok konstans szakaszait kódolják, már korábban leírták (KNIGHT et al., 1988). A párosujjú patások sokáig hiányzóknak vélt C<sub>δ</sub> szakaszt kódoló génjeit ellenben csak nemrégiben izolálták (ZHAO et al., 2002). A levezetett aminosavszekvenciák ismertek minden izotípus és az IgG1, IgG2 és IgG3 allotípus variánsai esetében (KNIGHT et al., 1988, SYMONS et al., 1989, HEYERMANN et al., 1992, KACSKOVICS és BUTLER, 1996, BROWN et al., 1997, MOUSAVI et al., 1997, RABBANI et al., 1997).

A juh IgM (HEIN és DUDLER, 1993), IgG1 (FOLEY és BEH, 1989), IgE (ENGWERDA et al., 1992), IgA (WHITE et al., 1998) és IgD (ZHAO et al., 2002) levezetett aminosavszekvencia adatai szintén hozzáférhetőek, és több mint 75% homológiát mutatnak a szarvasmarha szekvenciákkal. Mivel a gerincesek immunglobulinjai közül az IgM a legnagyobb mértékben konzervatív, a homológia magas foka a közel-rokon fajoknál nem meglepő. A szarvasmarha és juh esetében az aminosavszekvenciák homológiája 88%, a transzmembrán farokrész szekvenciája a két faj IgM molekulájánál teljesen megegyezik (MOUSAVI et al., 1998).

A szarvasmarha IgA felfedezése kezdetben „késett”, mert a kutatók a szekrétumok közül elsősorban a kolosztrumot vizsgálták, és nem vették figyelembe, hogy a főemlősökkel ellentétben a kérődzők kolosztrumában és tejében csekély az IgA mennyisége. Az IgA molekula, bár csak kis hányadát teszi ki a kolosztrumnak vagy a tejnek, egyes nyálkahártya szekrétumoknak ebben a fajban is domináns összetevője (MACH és PAHUD, 1971). Más fajokhoz hasonlóan a szekrétumban jelen lévő szarvasmarha IgA is a szekretoros darabbal összekapcsolt, amely körülbelül 86 kDa (MACH et al., 1969). A szabad szekretoros darab a

kolosztrumban és a tejben is nagy mennyiségben található, és először „glikoprotein-a” molekulának írták le (GROVES és GORDON, 1967). Más fajok IgA szekvenciájával összevetve a legnagyobb különbségek a kapocs régióban jelentkeznek, amely öt aminosavból; három szerinből és két ciszteinből áll. A nem kérődző, de párosujjú sertés IgA molekulával a szarvasmarha IgA 75%-ban homológ (BROWN et al., 1997).

A szarvasmarha immunglobulinok tanulmányozása során azok allotípus változatait korán felismerték, és leginkább az IgG2 két allélikus formáját vizsgálták. Az IgG2<sup>a</sup> és IgG2<sup>b</sup> a kapocs régióban jelentősen különbözik egymástól, és az IgG2<sup>a</sup> CH3 alegysége egy olyan immundomináns epitópot tartalmaz, amelyet a legtöbb poliklonális és monoklonális ellenanyag felismer. Ez az epitóp az IgG2 specifikus detektálásában nehézséget okozhat (BUTLER et al., 1994). Az allotípusok között különbséget találtak a komplement aktiválásban (BASTIDA-CORCUERA et al., 1999) és a *Haemophilus somnus* elleni immunválaszban (CORBEIL et al., 1997).

Az IgG3 molekulának két allotípus változata ismert, és az IgG1 is rendelkezik legalább kettővel, de ezek nem eredményeznek olyan nagy, az antigenitásban rejlő különbséget, mint amely az IgG2 genetikai változatait jellemzi. Szerológiai (DE BENEDICTIS et al., 1984) és szekvenciális különbség (BROWN et al., 1997) is igazolható a szarvasmarha IgA allotípusok között. Habár az IgM a legtöbb fajban egy allotípussal rendelkezik, RFLP (restriction fragment length polymorphism) és szekvencia elemzések illetve a monoklonális anti-IgM ellenanyagok eltérő specifikitása alátámasztja, hogy szarvasmarhában és juhban előfordulnak az IgM allotípus változatai (NAESSENS et al., 1988, HEIN és DUDLER, 1993, MOUSAVI et al., 1998).

Az immunglobulin könnyűlánc eloszlás a szarvasmarhában erősen eltolódott, főleg a  $\lambda$ -lánc expressziója jellemző (ARUN et al., 1996, BUTLER, 1998).

A különböző állatfajok, köztük a kérődzők immunglobulinjainak legfontosabb jellemzői és a nemzetközi „Comparative Immunoglobulin Workshop” által javasolt immunglobulin nevezéktan a szervezet honlapján található ([www.medicine.uiowa.edu/CIgW](http://www.medicine.uiowa.edu/CIgW)).

## **2.2. A kérődzők immunglobulinjainak megoszlása a tejmirigy és nyálkahártya szekrétumokban**

A házasított kérődzők IgG1 molekulái az egyes fajok között erős keresztreakciót adnak (BUTLER, 1983). Az IgG1 a fő immunglobulin a tehének, anyajuhok és nőtény kecskék kolosztrumában, és az IgG1 magas koncentrációja e szekrétumban a tőgybeli IgG1-specifikus szállító receptorok szelektív transzport mechanizmusának következménye (DIXON, 1961, BRANDON et al., 1971).

Annak ellenére, hogy az IgG2 számottevő mértékben nem szállítódik a kolosztrumba vagy a tejbe, fontos szerepet tölt be az immunvédelemben. Az IgG2 a legfontosabb opsonin a neutrophil granulocyták és makrofágok fagocitózisában (BUTLER, 1998).

Az IgG3 kvalitatív adatok alapján a szérumban kevésbé jelentős összetevője (BUTLER et al., 1987), funkcionális elemzése még nem történt meg.

A többi emlőshöz hasonlóan az IgM és IgA a normál szérumban immunglobulinok kis hányadát teszi ki. A szarvasmarhában a szérumban IgA nagyrésze dimer formában fordul elő, a humán szérumban IgA-val ellentétben, amelynek 80%-a monomer (DUNCAN et al., 1972).

A tejben mind az IgA, mind az IgM a tejszírral asszociáltan fordul elő, koncentrációjuk ötször nagyobb a tejszírsavóban, mint az IgG1 vagy az IgG2 koncentrációja. A szekretoros IgA és az IgM koncentrációja kétszer illetve háromszor nagyobb az elválasztott tejszír rétegében, mint a tejsavóban. Ez a tejszírhoz köthető szelektív asszociáció az IgG1 és IgG2 molekulákra nem jellemző (FRENYO et al., 1986). Az IgA és IgM szelektív asszociációjának élettani jelentősége nem ismert.

Az **I. táblázat** összegzi a különböző alosztályú szarvasmarha immunglobulinok koncentrációját a szérumban és a szekrétaumokban. Az értékek John E. Butler által kiválasztott publikációkban található adatok átlagértékei, amelyek – amint arra a szerző rámutat – a mérések standardizálásának hiánya és a tényleges biológiai változatosság miatt csak útmutatóul szolgálnak (BUTLER, 1983). A legtöbb testfolyadékban a szérumban és a tejmirigy szekrétaumok kivételével az adatok csak egy vagy néhány publikáción alapulnak, és kevés számú mintát foglalnak magukba. Mindezek ellenére az értékek alapján tehető néhány általános megállapítás.

Az IgG1 és IgG2 közel azonos koncentrációban van jelen a szérumban és megközelítőleg 30%-át adja a teljes fehérje mennyiségnek; a szérumban a fehérjék körülbelül 50%-a albumin. A szérumban IgA a teljes fehérje mennyiségnek csupán 0,6%-át adja, míg az IgM ennek az értéknek majdnem tízszerese. A kolosztrumban az immunglobulinok adják a savó fehérjéinek, több mint 95%-át, és az IgG1 ennek a mennyiségnek a 80%-a. Az IgA és IgM szintek a szérumban mért értékekhez hasonlóak, az IgG2 jóval alacsonyabb, mint az IgG1, de sokkal magasabb, mint amit a szérumból történt transzudáció alapján várnánk. Az immunglobulin szintek a tejben a kolosztruménál sokkal alacsonyabbak, csak körülbelül 7%-át adják a savó teljes fehérje szintjének. Az IgA aránya az összes immunglobulinhoz képest azonban jelentősebb a tejben, mint a kolosztrumban. Az IgA a nyál és könny immunglobulinjainak 80%-át teszi ki, majdnem ilyen arányban található az ornyálkahártya szekrétaumában, de a normál bélnedvben és más szekrétaumokban kevesebb, mint felét jelenti az összes immunglobulinnak (BUTLER, 1983).

Az újszülött borjak vékonybél szekrétaumát Newby és Bourne vizsgálata alapján az első időben (2 hetes kor) az IgG1 szinte kizárólagos dominanciája jellemzi.

I. táblázat. Szarvasmarha immunglobulinok koncentrációja (mg/ml) a szérumban és egyes nyálkahártya szekrétumokban (BUTLER, 1983). A zárójelben a koncentráció tartomány szélső értékei szerepelnek, Ny: nyomokban megtalálható

| Testfolyadék                          | IgG1                    | IgG2                      | IgA               | IgM                | Teljes fehérje | Albumin        | Mintaszám | Közlemények száma |
|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|----------------|----------------|-----------|-------------------|
| Szérum                                | <b>11,2</b> (6,0-15,1)  | <b>9,2</b> (5,0-13,5)     | 0,37 (0,06-1,0)   | 3,05 (0,6-4,3)     | 64,7 (58-72,2) | 33,4 (28,3-35) | 544       | 14                |
| Kolosztrum (savó)                     | <b>46,4</b> (30,0-75,0) | <b>2,87</b> (1,9-4,0)     | 5,36 (1,8-14,5)   | 6,77 (3,2-12,1)    | 60,1           | 2,2 (1,5-3,0)  | 285       | 12                |
| Tej (ellés után több mint két héttel) | <b>0,58</b> (0,33-1,2)  | <b>0,055</b> (0,037-0,06) | 0,081 (0,5-0,11)  | 0,086 (0,037-0,15) | 12,3           | 0,036          | 191       | 7                 |
| Ornyálkahártya szekréuma              | 1,56                    |                           | 2,81 (1,76-3,9)   | 0,4 (0,23-0,56)    |                |                |           | 2                 |
| Nyál                                  | 0,034 (0,017-0,050)     | 0,016 (0,01-0,02)         | 0,34 (0,17-0,56)  | 0,006 (0,002-0,01) | 1,37           | 0,009          | 77        | 4                 |
| Könnny                                | 0,32 (0,13-0,54)        | 0,01 (Ny-0,13)            | 2,72 (0,006-0,39) | 0,176              | 7,5            | 0,293          | 93        | 4                 |
| Vizelet                               | 0,009                   | Ny                        | 0,0013            | Ny                 |                |                | 16        | 2                 |
| Epe                                   | 0,10                    | 0,09                      | 0,08              | 0,05               |                |                | 5         | 1                 |
| Hüvely szekréuma                      | 0,23                    | 0,13                      | 0,9               |                    |                |                | 10        | 2                 |

II. táblázat. A juh immunglobulinok koncentrációja (mg/ml) a tejmirigy szekrétumokban és a szérumban (BUTLER, 1999).

| Testfolyadék | IgG1   | IgG2 | IgA  | IgM        |
|--------------|--------|------|------|------------|
| Kolosztrum   | 94-162 | 2,00 | 3,50 | 1,30-21,20 |
| Tej          | 1,00   | 0,10 | 0,20 | 0,20       |
| Szérum       | 18,10  | 7,90 | 0,20 | 3,60       |

A 4 hetes állatokban már az IgG2-t, IgA-t és az IgM-t is ki lehet mutatni a szekrétumból. Az IgA relatív mennyisége növekedik az első 3 hónapban, és 10-12 hetes korban éri el a felnőtt állatokra jellemző értéket. Nemcsak a fiatal borjaknál, hanem a 18 hónapos szarvasmarhánál is az IgG1 a meghatározó a vékonybélben, és az IgA kisebb mennyiségben fordul elő (NEWBY és BOURNE, 1976a).

Az epében az immunglobulinok koncentrációja viszonylag alacsony, az IgG1 fordul elő legnagyobb mennyiségben. Az IgG2, IgA és IgM koncentrációja az előbbi sorrendben csökken (**I. táblázat**). A szérumból az epébe irányuló szekretoros IgA transzport nem hatékony. Egy korábbi vizsgálat rámutatott arra, hogy az epéből visszanyert radioaktívan jelölt szekretoros IgA nagyrészt, de nem kizárólag, alacsonyabb molekulatömeggel bírt, mint az intakt molekulák; valamint a szérumba injektált radioaktívan jelölt IgG1-et csak alacsonyabb molekulatömegű fragmentként sikerült kimutatni az epében (BUTLER et al., 1986).

A húgy-ivari rendszer nyálkahártya szekrétumait tekintve Duncan és munkacsoportja megállapította, hogy emberhez hasonlóan a tehén nemi utak váladékának IgG koncentrációja közel azonos vagy néhányszor nagyobb, mint az IgA koncentrációja (DUNCAN et al., 1972). Corbeil és munkatársai egy részletesebb elemzésben később leírták, hogy az IgA a meghatározó immunglobulin a tehenek hüvelyének nyálkahártya szekrétumában, míg a cervix és az uterus váladékban az IgG dominál (IgG/IgA arány 21.9 illetve 13) (CORBEIL et al., 1976).

A légutak nyálkahártya szekrétumának immunglobulin összetétele hasonlít a többi emlőséhez abban, hogy az IgA a meghatározó izotípus a felsőbb légutakban. Az IgG aránya fokozatosan nő az alsóbb légutak irányában (WILKIE, 1982). Borjakban az anyai immunglobulinok megjelennek a légutak nyálkahártya szekrétumában, és hozzájárulnak a helyi immunvédelemhez (BELKNAP et al., 1991). Hat hetes korig az IgG1 a fő immunglobulin a légúti szekrétumban, az IgA és IgM kisebb mennyiségben van jelen (MORGAN et al., 1981). Később az IgG aránya csökken az IgA javára, de még felnőtt korban is jellemző, hogy az alsóbb légutakban az IgG marad a meghatározó immunglobulin (WILKIE, 1982).

A **II. táblázatban** a juh szérumban és tejmirigy szekrétumban jelen lévő immunglobulinok koncentrációja található. A tendenciák itt is a szarvasmarhánál leírt adatokhoz hasonlóak, de az IgG1/IgG2 arány eltolódott az előbbi javára.

### **2.3. A szekrétum immunglobulinjainak eredete**

A szérum és a nyirok immunglobulinjai a nyirokcsomók és a lép plazmasejtjeiből származnak, közvetlenül bejutván a vér- és nyirokkeringésbe. A nyálkahártya szekrétumok immunglobulinjainak ezzel szemben át kell haladniuk az alaphártyán és az epithel sejtek



sejtkapcsoló struktúrákkal szorosan zárt rétegén, hogy a szekrétumba kerüljenek. A szekrétumokba lépő immunglobulinok származhatnak a vérből vagy a nyálkahártya hámréteg alatti plazmasejt populációból. Minden szekrétumban egyaránt feltételezhető helyi és szérumból eredetű immunglobulin, de nyilvánvalóan a különböző szerveknél és a különböző izotípusoknál eltérő a kétféle eredetű immunglobulinok aránya.

Az eddigi kutatások során háromféle módszerrel próbálták meghatározni a kérődzőkben szintetizált immunglobulinok eredetét (összefoglalóan lásd: BUTLER, 1983). Az elsőt az immunglobulin szintézist mérték *in vitro* a különböző szövetek és szervek esetén. A másodikkal a szövetekben és szervekben jelen lévő plazmasejteket számolták meg. A harmadik módszernél, pedig *in vivo* radioaktívan jelölt immunglobulinokat adtak be, és a megjelenésüket mérték a különböző szekrétumokban. Ha az utóbbi módszert a szállított immunglobulinok specifikus aktivitásának mérésével kiegészítik, a helyi és szérumból eredetű immunglobulinok aránya kiszámolható.

Az *in vitro* szerv illetve szövet kultúrákkal kapcsolatos korábbi mérések igazolták, hogy a kérődzők különböző szövetei termelnek immunglobulinokat. Az IgG és az IgM tűnt a perifériás nyirokcsomók és a lép által termelt immunglobulinok közül dominánsnak, míg a nyálkahártyahámot tartalmazó szervkultúrákban az IgA termelés volt a legjelentősebb. Az IgG alosztályok termelődését külön ezzel a módszerrel nem lehetett kimutatni, a jelenlegi elképzelések az egyes immunglobulin izotípusokat tartalmazó sejtek eloszlásának vizsgálatán alapulnak. Sok exokrin szövetnél az IgG1-tartalmú plazmasejtek domináns előfordulásáról számoltak be (BUTLER, 1983).

Az emberben naponta 28 mg/testtömeg kg IgA és 30 mg/testtömeg kg IgG termelődik. A többi immunglobulin izotípus termelődésére sokkal alacsonyabb értékeket kaptak (WALDMANN, 1970). A szarvasmarhában nem végeztek hasonló méréseket, amelyek az IgG1 nyilvánvaló dominanciája miatt kifejezetten érdekesnek bizonyulnának. A kérődzők kolosztrumában és tejében található IgG1 közel 100%-a szérumból eredetű (NEWBY és BOURNE, 1977), emellett azonban az IgG1 helyi termelődését (BUTLER et al., 1972) és IgG1 termelő plazmasejteket (YURCHAK et al., 1971) is ki lehetett mutatni szarvasmarha tejmirigyben. A kérődzők tőgyében megismert IgG1 transzport mechanizmus (lásd a 2.4. fejezetben) felvetette a kérdést, vajon más mirigy, illetve nyálkahártya epithel réteg képes-e IgG1 transzportra. Ez az elképzelés valószínűnek tűnt tekintve a tejmirigy szekrétum mellett egyéb szekrétumok jelentős IgG1 tartalmát (**I. táblázat**). A légutak szekrétumába történő transzport kimutatására tett kísérletek a jelölt IgG1 molekulák bizonyos fokú szelektív transzportját mutatták (CURTAIN et al., 1971). Wells nem tudta kimutatni az IgG1 vagy IgG2 orrnyálkahártya szekrétumába irányuló szelektív transzportját (WELLS et al., 1977). A juh felső légúti szekrétumának elemzésénél az

IgM, IgG1 és IgG2 teljes mértékben a vérplazmából származott, míg az IgA körülbelül 81%-a helyi eredetű volt. Szelektív transzportot mutattak ki az IgA és IgM molekuláknál (SCICCHITANO et al., 1986).

A nyálban a szérumhoz képest nagyobb IgG1/IgG2 arányt (MACH és PAHUD, 1971) a szérumból eredő IgG1 transzport (CURTAIN et al., 1971) és a helyi szintézis (MORGAN et al., 1981) együttesen okozhatják. Függetlenül azonban attól, hogy az IgG1 helyben termelődik vagy szérum eredetű, sejten keresztül történő transzport szükséges ahhoz, hogy a megfelelő epithel rétegen átjusson. A könnyben az IgG1 nagyobb mennyiségben van jelen, mint az IgG2, és az IgG1 szelektív transzportját igazolták (PEDERSEN, 1973). A vékonybél szekrétumában az IgG1 dominanciája jellemző, és a crypta sejtekből ki tudták mutatni az IgG-t, igazolva a sejtek szelektív IgG1 transzportját (NEWBY és BOURNE, 1976a). A helyi plazmasejtek által termelt IgG1 nemcsak a transzepitheliális transzportban vesz részt, hanem egy részét a nyirokkeringés felveszi, és a szérum IgG1 mennyiségéhez járul hozzá (MORGAN et al., 1981).

A szarvasmarha szövetekben a helyi IgA termelés kimagasló (BUTLER et al., 1972). Emellett Newby és Bourne kimutatta, hogy a tej IgA tartalmának több mint 50%-a szérum eredetű (NEWBY és BOURNE, 1977). Ezzel összefügg a szérum IgA koncentrációjának csökkenése nagyobb mennyiségű tej lefejtése idején. A helyi plazmasejtek által termelt és a szérumban található IgA dimerek ugyanazon transzport mechanizmus révén jutnak a lumenbe (BUTLER, 1983). A transzport mechanizmust és a transzportot közvetítő szarvasmarha polimer immunglobulin receptort korábban karakterizálták (KULSETH et al., 1995, VERBEET et al., 1995).

A tej IgM tartalmának kevesebb, mint a fele szérum eredetű (NEWBY és BOURNE, 1977). A bél szekrétum IgM molekulái helyben termelődnek (ALLEN és PORTER, 1975). Az IgM transzportja az IgA dimerekével megegyező módon, a polimer immunglobulin receptor segítségével zajlik.

Mastitis esetén az IgG2 szint emelkedhet a szekrétumban. Általánosan elfogadott, hogy a tőgy gyulladásakor szérum transzudáció, valamint az albumin és Ig esetenként IgG2 szint növekedése jellemző a szekrétumban (GUIDRY et al., 1980). A mirigyben nő a polymorphonuclearis sejtek száma (ANDERSON és ANDREWS, 1977), ezek a sejtek megkötve az IgG2-t beléphetnek a szekrétumba, ezt követően az IgG2 a sejtek pusztulásával szabaddá válik. Az egészséges tejmirigyben alacsony az IgG2 szintje, helyi szintézis kimutatható (BUTLER, 1983). A szekrétum IgG2 tartalma 98%-ban helyi eredetű (NEWBY és BOURNE, 1977).

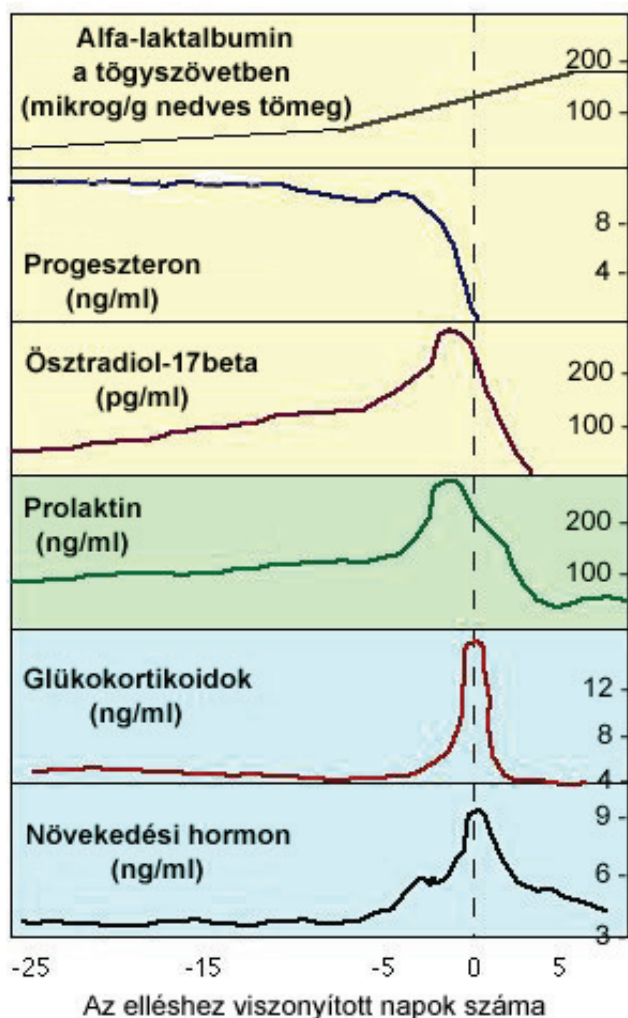
## 2.4. A kérődzők maternalis immuntranszportjának jellemzői

Az epitheliochorialis (syndesmochorialis) placentával rendelkező kérődzőknél a maternalis immunitás átadása, vagyis az anyai IgG transzport, nem a méhlepényen keresztül, hanem kizárólag a kolosztrum felvételével valósul meg. E folyamat első lépése, a tőgy kolosztrumba irányuló IgG szekréciója, már régóta ismert. Az IgG1 szérum-kolosztrum irányú transzportját először 1961-ben Dixon és munkatársai mutatták ki (DIXON, 1961).

A kérődzőkben a vér IgG1 és IgG2 koncentrációja közel azonos (**I. táblázat**). Sasaki és munkatársainak radioaktív izotóppal jelölt immunglobulinokkal végzett vizsgálata alapján igazolható volt, hogy az ellést megelőző időben a jelölt IgG1 és IgG2 egyforma megoszlást mutat az intra- és extravaszkuláris terekben. Az ellés előtt közvetlenül azonban az immunglobulin metabolizmusban jelentős változások következnek be. A plazma IgG1 termelődés, vagyis az IgG1 belépése a vérkeringésbe megnövekszik, és az ellés előtti napokon éri el a maximum értéket. A plazma IgG1 felezési ideje és koncentrációja ugyanakkor lecsökken. Ez utóbbi két változás együtt jár a kolosztrumban az IgG1 nagyarányú felhalmozódásával (SASAKI et al., 1976). A fent említett, a tőgy acinus sejtjein keresztül történő, IgG1 transzport az ellést megelőző 2-3 hétben zajlik, és egybeesik a vér IgG1 koncentrációjának csökkenésével (NEWBY és BOURNE, 1977). Az ellést követő napokban, a tejben az IgG1 koncentrációja mintegy két nagyságrenddel csökken (**I. táblázat**). A transzport ellés körüli időzítése és nagyfokú szelektivitása specifikus receptor mediált folyamatot feltételez, amelyet szövettani és radioreceptor elemzések eredményei is alátámasztanak.

Kemler és munkatársai kimutatták a szarvasmarha IgG kötődését a kolosztrumképzés idején vett tőgyszöveti minták metszetein, ezzel ellentétben a laktáció idejéből származó metszeteken IgG kötést nem tapasztaltak. Inhibíciós kísérletek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az acinus sejtek IgG receptora az IgG CH<sub>2</sub> doménjét köti. Az IgG kötést humán, juh és nyúl IgG hozzáadásával eredményesen gátolni tudták, míg nem-emplős (csirke) Ig hozzáadásával a kötést nem lehetett gátolni (KEMLER et al., 1975). Egy másik kutatócsoport immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutatta, hogy az IgG1 ellés előtt főképpen a tőgy acinus epithel sejtjeiben és a lumenben található. Az IgG2 főleg az interstitiumban volt jelen, az acinus sejtekben nem detektálták. Az ellés után az IgG1-re és az IgG2-re jellemző eltérő festődési mintázatot nem lehetett megfigyelni, a laktáló szövetben mindkét alosztály az interstitiumban helyeződött el. A tőgy kötőszövetes állománya az előző adatok szerint extravaszkuláris raktárként (pool) szolgálhat a szérumfehérjék, köztük az IgG számára. A vemhesség utolsó hetében a tőgy interstitiumában jelentősen lecsökkent IgG1 mennyisége az acinus sejtek aktív transzportjának eredménye (LEARY et al., 1982).

Brandon és munkatársai feltételezték, hogy az IgG1 szelektív transzepitheliális transzportját a bazális vagy intracelluláris membránon fellelhető receptorok segítik (BRANDON et al., 1971). Immunhisztokémiai és receptor analízis vizsgálatok eredményei igazolták, hogy valóban egy nagy affinitású, az ellés körüli időszakban jelentősen felszaporodó, a tőgy epithel sejteken expresszálódó IgG1 receptor biztosítja az IgG1 vérből kolosztrumba való átjutását. Receptorkinetikai paraméterek meghatározásával sikerült jellemezni a transzportot végző IgG1 receptormolekulákat. Eszerint a normál laktáció során is fellelhető, 9000/sejt számú, viszonylag alacsony affinitású ( $K_a=5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) kötőhelyek száma az ellés körül megszorodik. Ezen kívül egy új, jóval magasabb affinitású ( $K_a=45 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) receptorpopuláció is megjelenik az ellés előtt körülbelül 1 héttel. Ezekből a receptorokból a számítások alapján sejtenként 5000 található (SASAKI et al., 1977).



2. ábra. Az  $\alpha$ -laktalbumin szint és különböző hormonok szérumban koncentrációjának változása tehénekben az ellés körüli időben. (TUCKER, 1988) után, ábra módosítva

A vemhesség késői szakaszában, a kolosztrogenezissel egyidőben hormonális változások következnek be. A hormonális változásokat és az  $\alpha$ -laktalbumin szint változását (TUCKER, 1988) a 2. ábra szemlélteti. A hormonális és helyi környezet változásait és azok hatásait az IgG1 transzportra számos esetben vizsgálták.

A kolosztrogenezist kísérő hormonális változások során az ösztrogénszint megnövekedik körülbelül egy hónappal az ellés előtt. Egy héttel az ellést megelőzően növekszik a szérumban kortikoszteroidok, a növekedési hormon, és a prolaktin szintje is. A szérumban progeszteronszintje jelentősen csökken egy-két nappal az ellés előtt. A vemhesség utolsó 4-6 hetében az ösztrogén és progeszteron szintjében bekövetkezett változás közvetlenül vagy közvetve befolyásolja az IgG1 szelektív transzportját a szarvasmarha tejmirigy szekréciójába (SMITH et al., 1971). A kolosztrogenezis beindulásának szabályozása összetett. A progeszteron koncentráció már ellés előtt 2-3 héttel elkezd csökkenni, mielőtt közvetlenül ellés előtt hirtelen lezuhanna, ezért

feltételezhető, hogy ez a kezdeti progeszteronszint csökkenés, amely egybeesik a kolosztrogenezis megindulásával, jelenti az első szignált. Guy és munkatársai igazolták, hogy a progeszteronszint ellés előtt 10-30 nappal szignifikánsan csökkent, és ez együtt járt a szérumban IgG1 szintjének csökkenésével, bár a szekrétumban ez idő alatt az IgG1 koncentráció csak kismértékben változott (GUY et al., 1994b). Mivel a kolosztrogenezis a laktáció kezdetével befejeződik, a laktogenezishez szükséges hormonok feltehetően felfüggesztik az IgG1 transzportot. A laktogén komplex részeként jól ismert glükokortikoidok a tejtermelés beindulásáért is felelősek. Az ellés körül megnövekedett szérumszintjük valószínűleg fontos szerepet játszik a kolosztrogenezis megszüntetésében. Az ellés előtt 6-8 héttel adott glükokortikoidok megakadályozták a szekrétumba irányuló nagymennyiségű IgG1 transzportot (BRANDON et al., 1975). Glükokortikoidokkal indukált ellésnél a kolosztrogén IgG1 tartalmát állapították meg (BAILEY et al., 1973). Az előbbi közlemények alapján a glükokortikoidok lerövidítik a kolosztrogenezist az idő előtti elléshez kapcsolódó laktogenezis beindításával. A tüdőepithel sejtek differenciálódásáért felelős prolaktin hatását az IgG1 receptor expressziójára Barrington és munkatársai vizsgálták. *In vitro* kísérletükben ellés előtt álló tehenekből vett tüdőszövetmintákat kezeltek prolaktinnal,  $17\beta$ -ösztadiollal vagy mindkettővel. A prolaktin a pozitív laktogén hatása mellett ( $\alpha$ -laktalbumin termelés növekedése) az IgG1 receptorok expresszióját csökkentette, ellenben a  $17\beta$ -ösztadiol önmagában nem csökkentette az IgG1 receptor expressziót (BARRINGTON et al., 1997). *In vivo* kísérletükben szárazonálló teheneben laktációt indukáltak. Rekombináns bovin prolaktin vérpályába adásával a laktogén aktivitás nőtt, a tejbe szekretált IgG1 mennyiség és az IgG1 receptorok expressziója csökkent. Bromokriptin alkalmazásával a szérumban prolaktinszintet és a laktogén aktivitást csökkenteni tudták, az IgG1 receptor expressziója viszont fennmaradt. Tehát a prolaktin a laktogenezis beindulásakor csökkenti az IgG1 receptor expresszióját (BARRINGTON et al., 1999).

Ismert, hogy a hormonális tényezőkkel együttműködve vagy azoktól függetlenül lokális hatások szintén befolyásolják a kolosztrogenezist. A legegyszerűbb példa a lokális szabályozás hatására az egyes tüdőnegyedek eltérő IgG1 tartalma és a szekrétum eltérő összetétele. Tekintve, hogy a tejmirigyek közös szisztémás szabályozás alatt állnak, a különbségeket az egyes tüdőnegyedek eltérő helyi környezete okozza. Más esetekben a lokális szabályozás átmeneti IgG1 transzport emelkedést okoz az egyes tüdőnegyedekben. Megfigyelték, hogy az IgG1 transzport átmeneti emelkedése összefügg a tejszekréció gátlásával, tüdőgyulladásal vagy az involúcióval (WATSON et al., 1972, DARTON és MCDOWELL, 1980). Az involúció kezdetén, a kolosztrogenezishez hasonlóan, az IgG1 lokalizációjának változását mutatták ki. A laktáló tüdőszövetben az IgG1 az acinusok közötti állományban helyeződött, míg az involúció első napjaiban az acinus epithel sejtekben apikálisan és bazolaterálisan jelent meg (ZOU et al., 1988). További,

az egyes tőgynegyedek vizsgálatára irányuló kísérletek közvetlen bizonyítékokkal szolgáltak a lokális szabályozást illetően. Brandon és Lascelles kimutatták, hogy amennyiben a teheneknél két tőgynegyedre szorítkozva fenntartották a tejtermelést a vemhesség végéig, ezekben a mirigyekben az IgG1 koncentrációja jelentősen alatta maradt a szárazra állított tőgyfélben mért értéknek (BRANDON és LASCELLES, 1975). Eredményük igazolja, hogy a lokális hatások felülírhatják a szisztémás szabályozást a tőgyfelek funkcionális állapota között jelentős különbséget okozva. Guy és munkatársai leírták, hogy 10 nappal a várható ellés előtt megindított fejés csökkentette az IgG1 és a prolaktin koncentrációját a fejt tőgyfélben, ugyanakkor az ürített immunglobulin és hormon mennyisége meghaladta a kontroll oldalon mért értéket (GUY et al., 1994a). Feltételezések szerint a prolaktin kezdetben az IgG1 receptorokat expresszáló tőgyepithel sejtekben elősegíti a differenciálódást és a sejt transzcitózisra való képességét. Ez megnöveli az IgG1 és a prolaktin transzportját a tejmirigy szekrétumába. Ezt követően a prolaktin a tejszekréciónak felelős géneket kapcsolja be, és egyben közvetlen vagy közvetett módon az IgG1 receptorok expresszióját gátolja (BARRINGTON et al., 2001).

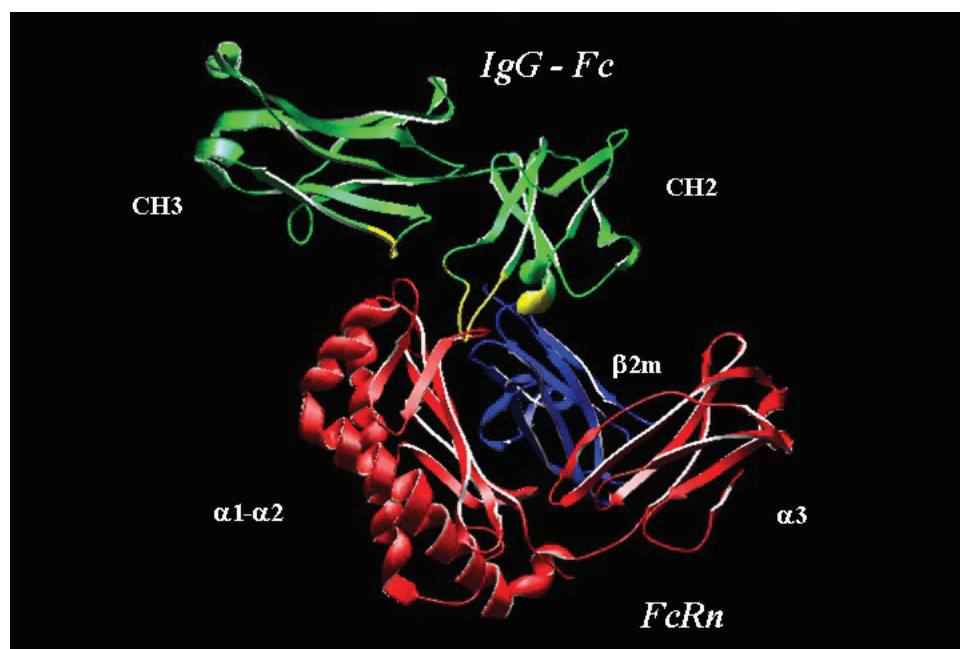
A kolosztrumba irányuló immunglobulin-transzportot követően a maternalis immunitás átadásának második lépése a kolosztrummal felvett anyai immunglobulinok felszívódása, amely az újszülött kérődzők vékonybelében lezajló nem-specifikus folyamat. A fiatal kérődzők esetén azonban a már vérpályába került IgG1 egy része többek között a vékonybél Lieberkühn crypta sejteinek aktív transzportáló tevékenysége révén ismét a lumenbe kerül. A lumenbe szekretált IgG1 hozzájárul az emésztőtraktus specifikus immunvédelméhez (NEWBY és BOURNE, 1976a, BESSER et al., 1988b). Korábbi vizsgálatok alapján ezek a molekulák intakt módon jutnak a lumenbe és ott képesek a kórokozók semlegesítésében részt venni (BESSER et al., 1988a, BESSER, 1993). Funkcionális anyai immunglobulinokat a vékonybél szekrétuma mellett a légutak nyálkahártya szekrétumaiban is kimutattak (BELKNAP et al., 1991).

Ismert továbbá, hogy nemcsak az újszülött állatok, hanem a felnőtt kérődzők esetén is az IgG1 az IgA molekulához hasonlóan számos nyálkahártya felületre aktívan szekretálódik, és ott hozzájárul az immunvédelemhez. Ezt támasztja alá az a kísérlet, amelynek során teheneknek radioaktív IgG1 és IgG2 molekulákat adtak intravénásan. A vérplazmából származó jelölt molekulák megjelentek a légutak felületén (bronchusok), a méhben, a hüvelyben, a gyomorban, az epehólyagban és a bélben. A szervektől függően az IgG1 szelektív transzportját lehetett megfigyelni az egyes nyálkahártya szekrétumokba (CURTAIN et al., 1971). A kérődzők IgG1 molekulájának kiemelt szerepét az teszi lehetővé, hogy ez az izotípus az IgA-hoz hasonlóan

nagyfokú rezisztenciát mutat *in vitro* (pronáz enzim) és *in vivo* (a vékonybélben található gastrointestinalis enzimek) proteolízissal szemben (NEWBY és BOURNE, 1976b).

## 2.5. A neonatalis Fc receptor és szerkezeti sajátosságai

A maternalis immunglobulinok transzport receptora, – rágcsálók és az ember esetében – a **neonatalis Fc receptor (FcRn)** egy olyan heterodimer fehérje, amely szerkezetileg és filogenetikailag az MHC I molekulával szoros rokonságot mutat. A receptor  **$\alpha$ -lánc**a az MHC I osztályéhoz hasonló, három extracelluláris doménből, a sejtmembránban „horgonyzó” transzmembrán régióból és citoplazmikus farokrészből épül fel. Az  $\alpha$ -lánchoz másodlagos



kötőerőkkel  $\beta$ -**mikroglobulin** kapcsolódódik (SIMISTER és MOSTOV, 1989) (3. ábra).

3. ábra. A szarvasmarha FcRn és a hozzá kapcsolódott IgG 3D számítógépes modellje

A röntgenkristallográfiás e-

lemzés igazolta, hogy az FcRn molekula szerkezete valóban hasonlít az MHC I molekulákéhoz (BURMEISTER et al., 1994), azonban a peptidkötő zseb, amelyhez a klasszikus és nem klasszikus MHC I molekuláknál peptid vagy egyes esetekben glikolipid ligandum kapcsolódik (BJORKMAN et al., 1987b, BJORKMAN et al., 1987a, ZENG et al., 1997, JOYCE et al., 1998), sztérikusan nem hozzáférhető. A sztérikus gátlást az  $\alpha$ 2 domén helikális részében, a polipeptidlánc 165. pozíciójában lévő prolin okozza. Mindazonáltal a H-2D klasszikus MHC I molekulában, a prolin beépítése az adott pozícióba nem befolyásolja a peptid prezentációt a T-sejteknek (PLAKSIN et al., 1997). Ezért valószínű, hogy még egyéb szerkezeti sajátosságok is szükségesek a sztérikus gátlás létrejöttéhez.

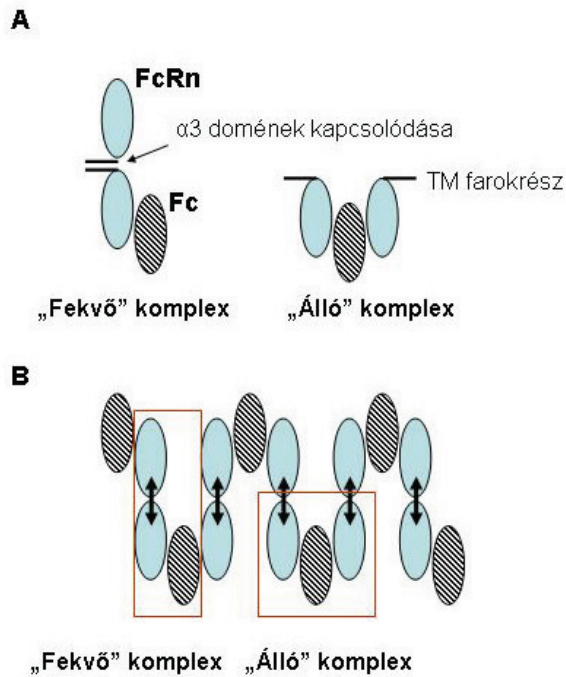
Mivel a röntgenkristallográfiás vizsgálat felbontása nem bizonyult elegendőnek az FcRn Fc-fragmentumhoz való kötődésében résztvevő aminosavak azonosítására, irányított mutagenézissel határozták meg a patkány FcRn patkány/egér IgG kötő helyeit (RAGHAVAN et al., 1994, VAUGHN et al., 1997). Kimutattak néhány  $\alpha$ 2 alegységben (Glu117, Glu132, Trp133, Glu135 és Asp137) és a  $\beta$ 2-mikroglobulinban (Ile1) található aminosavmaradékot, amelyek

közvetlenül szerepet játszanak az FcRn-IgG kölcsönhatásban. Az  $\alpha 2$  domén előbb említett aminosavmaradécai értelemszerűen konzervatív egységek a különböző fajoknál (SIMISTER és MOSTOV, 1989, AHOUSE et al., 1993, STORY et al., 1994), a  $\beta 2$ -mikroglobuliné is, de ennek szerepe kisebb az IgG kötés kialakulásánál, mint az  $\alpha 2$  domén aminosavmaradékainak (VAUGHN et al., 1997). Az FcRn-IgG kölcsönhatás a T-sejt-receptor-peptid-MHC I interakciótól eltérő módon zajlik, amennyiben a T-sejt-receptor két MHC hélixet feszít szét, és diagonális irányultságban kötődik a peptidhez (GARBOCZI et al., 1996, GARCIA et al., 1996).

*In vitro* kísérletek alátámasztják az FcRn dimerizáció szerepét a nagy affinitású IgG kötésben, ahol az ún. „fekvő” komplexben (lying-down complex, **4. ábra A**) egy FcRn dimer kötődik az IgG/Fc molekulához (RAGHAVAN et al., 1994, RAGHAVAN et al., 1995, VAUGHN és BJORKMAN, 1997, VAUGHN et al., 1997). A dimerizációban nagy jelentőséggel bír az  $\alpha 3$  doménhez kapcsolódó (Asn225) szénhidrátlánc, amelynek típusa – attól függően, hogy a receptor milyen gazdasejtben fejeződik ki – hatással van a dimerizációra és ennek következményeként az FcRn-IgG interakcióra is (VAUGHN és BJORKMAN, 1998). Megjegyzendő azonban, hogy sem emberben, sem a kócsoknál nem található meg ez a glikozilációs hely.

Az IgG molekulán található két lehetséges kötőhely arra enged következtetni, hogy az FcRn ligandumát szimmetrikus, 2:1 összetételű, „álló” komplex formájában (standing-up complex, **4. ábra A**) köti. Újabban ugyanakkor kimutatták, hogy szimmetrikus komplex nem mindig képződik (POPOV et al., 1996). Ghetie és Ward modellje szerint, ha az IgG molekula egyik kötőhelyén létrejön az FcRn-Fc kölcsönhatás, a másik kötőhely affinitása csökken. Ez összhangban áll azzal, a megfigyeléssel, amely szerint az FcRn kötés az IgG molekulában aszimmetriát indukál. Azt is leírták, hogy az FcRn-IgG interakció sztöchiometriája, vagyis a kapcsolódó molekulák anyagmennyiség aránya, a rekombináns FcRn glikoziláltsági fokától és az IgG allotípusától függően változik (GHETIE és WARD, 2000). Bjorkman és munkatársai egy olyan modellt alkottak, amelyik a „fekvő” és az „álló” komplexet is magában foglalja (RAGHAVAN és BJORKMAN, 1996). Ezen oligomer szalagok (oligomer ribbons, **4. ábra. B**) *in vivo* létét azonban eddig még nem igazolták.





4. ábra. A. „Fekvő” és „Álló” FcRn-Fc komplexek. Mindkét komplex sztöchiometriai összetétele 1 Fc: 2 FcRn molekula, de alapvető különbséget mutatnak a komplexet felépítő molekulák konfigurációjában. A „fekvő” komplexben egy Fc kötődik az FcRn-FcRn dimerhez, amelyet az  $\alpha 3$  domének és szénhidrátláncok közötti kölcsönhatások tartanak össze. Az „álló” komplex ezzel ellentétben szimmetrikus FcRn-Fc-FcRn konfigurációból áll. A „fekvő” komplexben még további kölcsönhatások alakulhatnak ki az Fc és a második, távolabb eső FcRn molekula között, de ezeket az egyszerűség kedvéért nem mutatja az ábra. B. Oligomer szalag ábrázolása, amelyben mind a fekvő, mind az álló komplexek jelen vannak. Az egyszerűség kedvéért az FcRn transzmembrán régióját (TM) nem mutatja az ábra. A nyilak az FcRn dimerizációt eredményező kapcsolódást jelzik (GHETIE és WARD, 2000).

## 2.6. Az FcRn szerepe a rágcsálók IgG transzportjában

Az FcRn-t először rágcsálókban azonosították, mint egy olyan szállító receptort, amely az anyai immunglobulinokat az újszülött állat vérkeringésébe juttatja, az újszülött bélhámsejtjein keresztül (RODEWALD és KRAEHENBUHL, 1984). Az első izolált patkány bélhámsejt membránon történt vizsgálatok azt mutatták, hogy az FcRn pH-függő módon köti az IgG molekulát. A kapcsolódás enyhén savas közegben (pH 6.0-6.5) jön létre, míg semleges-enyhén bázikus közegben (pH 7.2-7.5) disszociál az IgG/FcRn komplex (RODEWALD, 1973, RODEWALD, 1976, RODEWALD, 1980, RODEWALD és ABRAHAMSON, 1982). Az előbbi eredmények és a szövettani elemzések alapján alkották meg azt az elképzelést, amely az FcRn IgG transzportáló szerepét írja le (5.a ábra). Az IgG az epithel sejtek lumenális felszínén, enyhén savas közegben, az FcRn molekulához kötődik, és az FcRn-IgG komplexet receptor-mediált endocitózissal veszi fel a sejt. A komplexek transzcitózis útján keresztüljutnak a sejten, ezt követően exocitózissal a bazolaterális oldalra kerülnek, ahol a magasabb pH értéken szétválik a receptor és a ligandum (RODEWALD és KRAEHENBUHL, 1984).

A patkány szikzacskó belső csíralemezben expresszáldó FcRn szerepét kutatva megállapították, hogy az FcRn-IgG interakció az apikális vesiculákban zajlik, és nem a szikzacskó sejtjeinek felszínén (ROBERTS et al., 1990). Ráadásul a sejt felszínén nem tudták kimutatni a receptor expresszióját. E megállapítások ahhoz az elgondoláshoz vezettek, hogy a szikzacskóban az FcRn IgG kötés csak a nem-specifikus, folyadék fázisú pinocytosist követően alakul ki. A savas kémhatású endoszómákban megkötődik az IgG, átszállítódik a sejten a bazolaterális oldalra, és a gyengén bázikus közegben kiszabadul a komplexből. Tehát lényeges különbség van a szikzacskó és a bél IgG szállító mechanizmusában. A fennálló különbség eredményezheti, hogy a szikzacskónál a transzport kevésbé hatékony (különösen alacsony IgG koncentrációnál), mert az IgG nem kapcsolódik sejt felszíni receptorokhoz, és az FcRn csakis pH-függő módon köti a ligandumát. Érdekes *in vitro* kísérleti adat, hogy az újszülött vékonybélnél nem feltétlenül szükséges, hogy az epithel sejtek apikális része savas közegben legyen a transzcitózis létrejöttéhez (BENLOUNES et al., 1995), ami azt jelzi, hogy az IgG receptor-mediált sejt felszíni kötődése ennél a szövetnél sem előfeltétele az IgG felvételnek.

## **2.7. Az FcRn szerepe a humán transzplacentális IgG transzportban**

Az FcRn izolálása az emberi syncytiotrophoblastból azt jelezte, hogy a receptornak szerepe van az anyai IgG transzportban (STORY et al., 1994). Az embernél a magzati csíralemezek felépítése a rágcsálóktól eltér, ennek eredményeképpen főleg a placenta syncytiotrophoblastján, és nem a szikzacskón keresztül valósul meg az anyai immunglobulinok átvitele. Az FcRn receptort az IgG molekulával együtt a syncytiotrophoblast sejtek savas endoszómáiban lokalizálták (KRISTOFFERSEN és MATRE, 1996), ezért az FcRn-IgG összekapcsolódás valószínűleg az IgG felvétele után következik be a rágcsálók szikzacskójánál feltételezett folyamattal megegyezően. A legújabb ismeretek szerint az anyai IgG koncentráció a magzati vérben a második trimesztertől kezdve növekedik a szülés idejéig, a legtöbb ellenanyag a harmadik trimeszterben kerül a magzati keringésbe. Az IgG1 alosztály szállítódik a leghatékonyabban és az IgG2 alosztály a legkevésbé. A chorion bolyhok syncytiotrophoblastjában kifejeződő FcRn közvetíti a transzportot. A bolyhok sztrómájában található placentális makrofágok immunkomplexeket is felvesznek az Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII és Fc $\gamma$ RIII receptoraik révén. A magzati kapilláris endothelen keresztüli IgG transzport mechanizmusa nem ismert. A bolyhok endothel sejtjeiben expresszáldó Fc $\gamma$ RIIb receptor szerepe az IgG transzportban vagy az immunkomplexek transzportjának gátlásában szintén nem tisztázott (SIMISTER, 2003).

A rágcsálók és az ember placentája (AHOUSE et al., 1993, LEACH et al., 1996) mellett a receptort kimutatták számos, az IgG-t transzportáló epithel sejtől, így a felnőtt emberi

vékonybélből (ISRAEL et al., 1997), vesehámsejtéből (HAYMANN et al., 2000), a légutak hámsejtjeiből (SPIEKERMANN et al., 2002), valamint endothel sejtekből (GHETIE et al., 1996), monocytákból, makrofágokból és dendritikus sejtekből (ZHU et al., 2001).

## **2.8. Az FcRn részt vesz az IgG homeosztázisban**

Brambell és munkatársai már 1964-ben felvetették, hogy az anyai IgG transzportban résztvevő receptorok kapcsolatba hozhatók a szérumban IgG felezési idejét meghatározó protektív receptorokkal (BRAMBELL et al., 1964). Ezeknek a protektív receptoroknak a szerepe, javaslatuk szerint, hogy megkössék az IgG molekulákat, és megvédjék azokat a lizoszómális lebontástól. E feltételezést később alátámasztották azok az elemzések, amelyek azt mutatták, hogy az egér IgG vagy Fc-fragmentum FcRn kötő helye és a szérumban felezési idejének szabályozásáért felelős részek szorosan átfednek (KIM et al., 1994b, KIM et al., 1994a, MEDESAN et al., 1997).

Beta-2-mikroglobulin hiányos ( $\beta 2m^{-/-}$ ) egerekben, amelyek nem képesek funkcionális MHC I vagy a homológ FcRn molekulákat expresszálni, az egér IgG1 felezési ideje a vad típustól ( $\beta 2m^{+/+}$ ) eltérően jóval rövidebbnek bizonyult (GHETIE et al., 1996). A  $\beta 2$ -mikroglobulin hiányos ( $\beta 2m^{-/-}$ ) egerekben a keringésben lévő IgG koncentrációja a normálistól eltérően alacsony maradt, annak ellenére, hogy B sejt készletük normális volt (SPRIGGS et al., 1992).

Az eddigi összes tanulmányban erős korrelációt állapítottak meg az FcRn receptorhoz való kötés affinitása és a szérumban felezési idő között a mutáns Fc-fragmentumok és IgG variánsok esetén. Ennek alapján megfogalmazható, hogy minél erősebben kapcsolódik egy adott ligandum az FcRn receptorhoz, annál hosszabb a felezési ideje (KIM et al., 1994b, MEDESAN et al., 1997).

Az IgG, az előbbi adatoknak megfelelően, egyéb szérumfehérjékhez képest, amelyek nem képesek az FcRn molekulához kötődni, lényegesen hosszabb felezési idővel rendelkeznek. A különböző fajokban az IgG alosztályok eltérő felezési idejét az FcRn-IgG interakcióban szerepet játszó aminosavmaradékok alosztályok közötti eltéréseivel indokolják.

Az egérben az IgG1 és az IgG2a felezési ideje 6-8 nap, az IgG2b felezési ideje 4-6 nap. Az egér CH2-CH3 domén 435. hisztidinjének kulcsszerepe van az FcRn molekulához való kötődésben és a 436. pozícióban lévő hisztidin szerepe is jelentős (MEDESAN et al., 1997). A rövidebb felezési idővel rendelkező IgG2b 435. és 436. aminosavmaradéka hisztidin helyett tirozin.

Az emberi IgG1, IgG2 és IgG4 felezési ideje 21-23 nap, míg az IgG3 felezési ideje mindössze 7-8 nap. Az IgG3 molekulában (G3m,s,t allotípus) a CH2-CH3 domén 435. aminosavmaradéka a többi alosztálytól eltérően nem hisztidin, hanem arginin. Ez a szekvenciális különbség okozhatja az IgG3 rövidebb felezési idejét, és egyben alátámasztja a 435. aminosavmaradék szerepét az FcRn-IgG interakcióban (KIM et al., 1999).

A szarvasmarhában egyelőre csak a különböző IgG alosztályok felezési idejét határozták meg, az FcRn molekulához való kötődés erőssége nem ismert. Nansen az IgG1 felezési idejét 9.6 napban, az IgG2 felezési idejét 18 napban állapította meg (NANSEN, 1970). Ezzel szemben Nielsen sorrendben 17.4 és 22.4 napot mért (NIELSEN et al., 1978). Az IgG1 molekulára jellemző jóval alacsonyabb értéket a szekrétaumokba történő aktív transzporttal magyarázzák (BUTLER, 1983). Husband és munkatársai által számított felezési idő borjakban 16 nap az IgG1, 32 nap az IgG2, 4 nap az IgM és 2.5 nap a szekretoros IgA esetén (HUSBAND et al., 1972). A felnőtt állatok szérumában az IgM, IgA és IgE felezési ideje sorrendben 4.8, 3.4 és 1.9 nap (NIELSEN et al., 1978). Az immunglobulin metabolizmusban bekövetkező változások ismertek az ellés körüli időben (SASAKI et al., 1976) és bizonyos fertőzéseknel (NIELSEN et al., 1978).

Az FcRn expresszióját az újszülött vékonybélben, szikzacskón és a placentán kívül általánosan, felnőtt szövetekben is kimutatták. Mivel szinte minden vizsgált szövetben kifejeződött a receptor, néhány kutatócsoport arra a következtetésre jutott, hogy a vérárammal szorosan érintkező endothel sejtek az IgG homeosztázis helyszínei (WALDMANN és STROBER, 1969, GHETIE et al., 1996, JUNGHANS, 1997).

Egér IgG1 és Fc-fragmentumok valamint anti-FcRn ellenanyagok vérkeringésbeli eloszlását tanulmányozva egy munkacsoport az FcRn funkció fő helyeként felnőtt, nem vemhes egérnél a bőrt és izmot jelölte meg, míg a máj és zsírszövet kevésbé volt érintett (a vese, tüdő, lép és vékonybél, FcRn funkcióját is vizsgálták, de ez jóval kisebb jelentőségű, mint a bőr és az izom). Az egér izom és máj szövettani adatai azt mutatták, hogy az FcRn a kis arteriolák, kapillárisok endothel sejtjeiben expresszálódik, de nem lehetett detektálni a nagyobb erekben, mint a centrális vénában vagy a portális keringés ereiben (BORVAK et al., 1998).

Az endothel sejtekben a receptort elsősorban sejten belül mutatták ki, a patkány szikzacskójánál megfigyeltekkel megegyezően (ROBERTS et al., 1990). A humán FcRn szintén megtalálható az endothel sejtekben (JUNGHANS, 1997), és ezt a megállapítást alátámasztja, hogy sokféle szövetben kimutatták expresszióját (STORY et al., 1994).

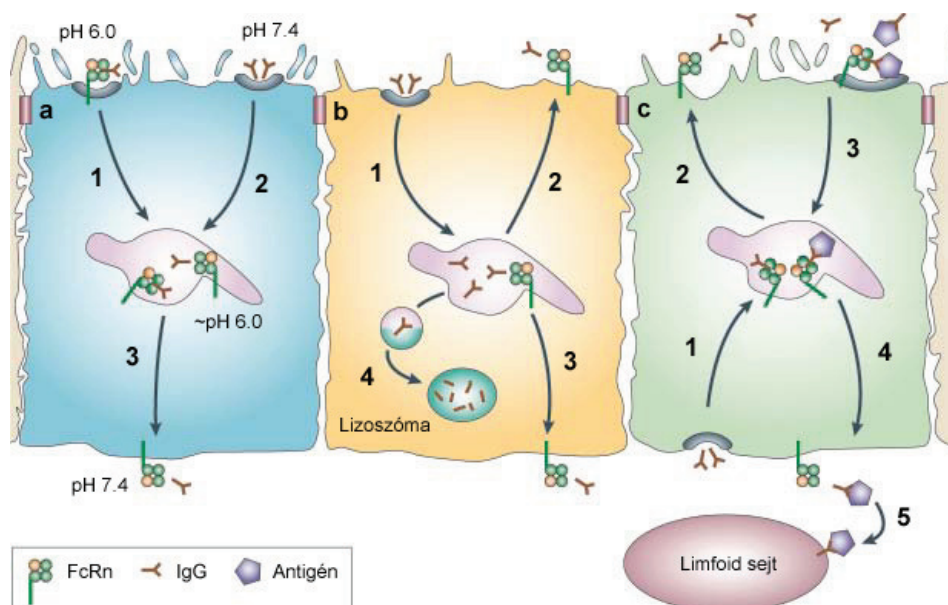
Jelenlegi feltételezések szerint a különböző szervek és szövetek kapilláris endothel sejtjeiben expresszálódó FcRn időlegesen megkötí az IgG-t, aminek hatására a katabolikus folyamatok kevésbé hatnak az immunglobulinok ezen izotípusára. Ghetie és Ward egy modellt

(2000) alkotott arról, hogyan vesz részt az FcRn az IgG homeosztázisában (**5.b ábra**). Az IgG molekulákat az endothel sejtek nem-specifikus pinocytosissal fölveszik, és azok a savas kémhatású endoszómákba kerülnek. Ha az IgG az FcRn receptorhoz kötődik, nem bontják le a lizoszómális enzimek. A receptor működhet az IgG-t visszaforgató (*recycling*) és azt a sejten keresztül szállító (*transcytotic*) módon. Valószínű, hogy a receptort expresszáló sejt típusától függően egyik, másik vagy mindkét módja jellemző az IgG szállításnak. A modell arra is magyarázattal szolgált, hogy hogyan lehetséges a szérumban IgG szintjének finom beállítása. Ha az IgG szint csökken, több FcRn áll rendelkezésre az IgG kötéshez, és nagyobb mennyiségű IgG mentesül a lebontástól. Fordítva, ha a szérumban IgG szintje emelkedik, az FcRn kötőhelyek telítette válnak, és növekszik a pinocytosissal felvett és lebontott IgG aránya. E modellt nemrég *in vitro* kísérletekkel is megerősítették (WARD et al., 2003).

## 2.9. Az FcRn egyéb funkciói

Újabb kutatások rámutattak arra, hogy a szérumban IgG homeosztázisának biztosítása és az újszülött rágcsáló vékonybélben valamint az emberi placentán keresztüli transzport folyamatok mellett az FcRn szállító szerepe más célokat is szolgálhat. Rágcsálóknál az FcRn expressziója a bélhámsejtekben a szoptatás idejére korlátozódik (MARTIN et al., 1997), ezzel ellentétben a humán receptort mind magzati, mind felnőtt bélhámsejtekben detektálták (ISRAEL et al., 1997). Míg újszülött rágcsálóknál az FcRn az IgG-t egy irányba, azaz a vérkeringésbe szállítja, addig a felnőtt humán bélben az FcRn specifikus IgG transzport – a humán T84 sejtvonalon végzett *in vitro* kísérletek alapján – két irányban zajlik (DICKINSON et al., 1999).

Ez a kétirányú transzport felveti az FcRn további funkcióinak néhány lehetőségét. Az újszülött rágcsálók immunkomplexeket szállító bélhámsejtjeihez hasonlóan a humán FcRn antigéneket szállíthat és immunválaszt vagy toleranciát válthat ki (**5.c ábra**). A szarvasmarha bélbe történő IgG transzportjának analógiájára a humán receptor az IgG FcRn mediált klirenszéban vagy a nyálkahártyák felületének védelmét ellátó szekrécijában játszhat szerepet. Az utóbbi időben sikerült igazolni az előbbi feltételezést. A humán FcRn az IgG molekulákat az epithel sejteken keresztül a bél lumenébe szállítja, ahol azok a jelenlévő antigénekhez kötődnek. Ezt követően az immunkomplexeket a receptor visszaforgatja a lamina propriába a dendritikus sejtek számára, amelyek az immunkomplexeket feldolgozzák, és a CD4<sup>+</sup> T sejteknek bemutatják (YOSHIDA et al., 2004).



5. ábra. Az FcRn funkciói (összefoglalóan lásd: ROJAS és APODACA, 2002). a) IgG transzport. Újszülött patkányok vékonybelében – ahol a pH enyhén savas (pH 6.0-6.5) – az enterocitákon található FcRn-hez kötődik az IgG, az enterociták endocitózissal felveszik (1. lépés). Azoknál a sejteknél, ahol az extracelluláris folyadék pH-ja semleges, folyadék fázisú endocitózissal kerül a sejtekbe az IgG (2. lépés). Ebben az esetben az IgG a korai endoszómák savas környezetében kötődik az FcRn-hez. Az FcRn-IgG komplex a sejt bazolaterális oldalára szállítódik (3. lépés), ahol a semleges pH elősegíti a ligandum disszociációját és a szekréciót (RODEWALD és KRAEHENBUHL, 1984). b) Az IgG katabolizmus szabályozása. Endothel sejtekben az IgG folyadék fázisú endocitózissal kerül felvételre, és az endoszómákba szállítódik (1. lépés), ahol az FcRn-hez kapcsolódik. A receptorhoz kötött ligandum vagy visszashállítódik az apikális membránba, majd ismét a vérbe kerül (2. lépés), vagy a sejt bazolaterális oldalára szállítódik (3. lépés). Ha az IgG koncentráció magas, és az FcRn receptorok telítődnek, a szabad IgG nagymennyiségű folyadékkal együtt a lizozómába szállítódik, ahol a lizozómális enzimek lebontják (4. lépés) (GHETIE és WARD, 2000). c) FcRn-IgG immunaktiváció és tolerancia. Az IgG endocitózissal bekerül a sejtbe a bazolaterális oldalon (1. lépés), majd az apikális oldalra szállítódik és a szekrétumba jut (2. lépés). Az antigén megkötése után az IgG-antigén komplex folyadékfázisban vagy az FcRn-hez kapcsolatosan bekerül a sejtbe (3. lépés), az immunkomplex transzcitózissal a lamina propria-ba szállítódik (4. lépés), ahol aktivációt vagy toleranciát indukál (5. lépés) (YOSHIDA et al., 2004).

## 2.10. Az FcRn expressziója patkány máj- és agyszövetben

Az FcRn expresszióját felnőtt patkány májban is leírták, és azt feltételezték, hogy a májsejtekben kifejeződő receptor immunkomplexeket szállít a Kupffer sejtekhez vagy az epébe (BLUMBERG et al., 1995). Azonban később fordított korrelációt tapasztaltak egér rekombináns Fc-fragmentumok receptorhoz való kötődésének erőssége és az epébe történő transzportja között (BORVAK et al., 1998). Emellett nem találtak szignifikáns különbséget a beta-2-mikroglobulin hiányos ( $\beta 2m^{-/-}$ ) és a vad típusú egerek szérumban lévő IgG transzportjában. Az előbbi megfigyelések alapján a májsejtekben jelenlévő FcRn inkább az IgG vérkeringés felé irányuló visszaforgatásában (recycling) vesz részt (TELLEMAN és JUNGHANS, 2000).

Újabban kimutatták az FcRn molekulát a patkány agykamra plexus choroideust borító ependyma (epithel) sejtjeiből és az agyi kapillárisok endothel sejtjeiből. Ez utóbbi sejtekben feltételezések szerint az IgG agy-vér irányú reverz transzcitózisában játszik szerepet (SCHLACHETZKI et al., 2002).

## 2.11. Az FcRn expressziója humán vesében

A humán vesében a glomerulus epithel sejtjeiben és a proximális tubulusok sejtjeiben mutatták ki az FcRn expresszióját. A glomerulusok epithel sejtjeiben található FcRn valószínűleg immunkomplexek klírenszenében játszik szerepet, míg a proximális tubulusok sejtjeinek apikális részén elhelyezkedő receptor feltehetően a primer szűrletbe kis mennyiségben került IgG felvételét/visszaszívását végzi (HAYMANN et al., 2000). Az *in vitro* vizsgálatok a proximális tubulusok epithel sejtjeinek receptor mediált, kétirányú IgG transzportját mutatták (KOBAYASHI et al., 2002).

## 2.12. A légzőszervrendszerben expresszálódó FcRn funkciója

Spiekermann és munkatársai (2002) megállapították, hogy az ember, a makákó (nem-emberszabású főemlős, a cercóf-félékhez tartozó majom) és az egér légutak bronchus epithel sejtjei szintén expresszálják az FcRn gént. Kísérletükben kimutatták egy bioaktív Fc-fúziós fehérje FcRn függő *in vivo* felvételét az egér bronchus epithel sejtekben. Eredményeikből arra következtettek, hogy az FcRn IgG molekulákat vagy immunkomplexeket szállít az epithel sejteken keresztül, és így az immunfelismerésben vagy a nyálkahártyák immunvédelmében működik közre (SPIEKERMANN et al., 2002).

## 2.13. Az FcRn és a tejbe irányuló IgG transzport

Az FcRn molekulának tulajdonított további funkció az IgG izotípus tejbe irányuló transzportjának szabályozása. Cianga és munkatársai a laktáló egér tejmirigyében jelenlévő FcRn szerepét vizsgálták. Ők a receptort az acinusok epithel sejtjeiben lokalizálták, és úgy találták, hogy az IgG alosztályok tejbe történő transzportja fordított korrelációt mutat az FcRn-nel szembeni affinitásukkal. Feltételezésük szerint a laktáló tejmirigyben lévő FcRn a szekréció helyett inkább a visszaforgatásban (recycling) játszik szerepet, vagyis a tejmirigyből a keringésbe juttatja vissza a hozzákapcsolódott IgG molekulákat (CIANGA et al., 1999).

Az erszényes rókakuzunál (*Trichosurus vulpecula*) leírták a heterodimer receptort alkotó  $\beta$ 2-mikroglobulin expresszió emelkedését a tej IgG koncentrációjának emelkedésével egy időben, az  $\alpha$ -lánc kifejeződése azonban a kolosztrum képzés után csökkent. Szarvasmarha és egér tejmirigyében az  $\alpha$ -lánc expressziójában a laktáció ideje alatt nem mutattak ki jelentős eltérést (Northern blot), de a  $\beta$ 2-mikroglobulin mRNS expresszió növekedése korrelált a tejbe történő aktív IgG szállítás időtartamával (ADAMSKI et al., 2000). A sertés tejmirigyében, reverz transzkriptáz-PCR (RT-PCR) módszerrel vizsgálva, az ellés napján csökkent az FcRn nehézlánc expressziója az ellés előtti expresszió szintjéhez képest (SCHNULLE és HURLEY, 2003).

## 2.14. A bovin neonatalis Fc receptor (bFcRn) klónozása és karakterizálása

Bár az IgG1 molekulát a tőgy epithel sejteken keresztül szállító receptor eddig ismeretlen volt, néhány IgG kötő fehérjét már korábban elkülönítettek bovin myeloid sejtekből. A humán Fc $\gamma$ RI szarvasmarha homológja, amelyet egy szarvasmarha genomikus DNS könyvtárból izoláltak, a humán Fc $\gamma$ RI három extracelluláris doménjával hasonlóságot mutatott, de a kötés specificitását nem határozták meg (SYMONS és CLARKSON, 1992). Az alveoláris makrofágokból izolált bovin Fc $\gamma$ RII aggregált IgG1-et köt, az IgG2 alosztályt nem (ZHANG et al., 1994). Ellentétben a nemrégiben leírt, ugyancsak az előző sejtekből izolált új emlős Fc $\gamma$ R osztályt képviselő boFc $\gamma$ 2R receptorral, amely aggregált IgG2 molekulákat köt (ZHANG et al., 1995).

Munkacsoportunknak az elmúlt években sikerült a rágcsálók és az ember IgG kötő Fc receptorához, a neonatalis Fc receptorhoz hasonló **szarvasmarha FcRn (bFcRn)  $\alpha$ -lánc** génjét RT-PCR, 5'RACE, 3'RACE technikák segítségével klónozni, annak cDNS és az abból levezetett aminosav szekvenciáját meghatározni. *In vitro* kísérleteinkben, amelyek során az IMCD sejtbe transzfektált bFcRn géntermék pH-függő IgG kötését mutattuk ki, az általunk izolált cDNS molekulák funkcionálisan is intaktnak bizonyultak. A teljes hosszúságú szarvasmarha FcRn nehézlánc más fajok receptorának felépítésével megegyezően három extracelluláris doménből ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 2- $\alpha$ 3), egy transzmembrán régióból és a citoplazmikus farokrészből áll. A receptor alternatív hasítással létrejött formájában hiányzik a transzmembrán régió, egyébként nukleotid szekvenciája a teljes hosszúságú formával megegyezik. A rágcsáló és humán FcRn molekulától leginkább a citoplazmikus farokrész különbözik, amely tíz aminosavval rövidebb, mint az előző fajokban. Azonban ez a rövidebb citoplazmikus rész is tartalmazza a feltételezhetően az endocitózishoz szükséges dileucin motívumot. A két receptorforma expressziója – Northern blot és PCR technikákkal vizsgálva – a vizsgált szövetekben (tőgy, vékonybél, máj, vese, lép) egyaránt megtalálható. A rövidebb forma élettani szerepére vonatkozóan jelenleg semmilyen ismerettel nem rendelkezünk (KACSKOVICS et al., 2000).

## 2.15. A bovin FcRn génexpressziójának kimutatása különböző szövetekből

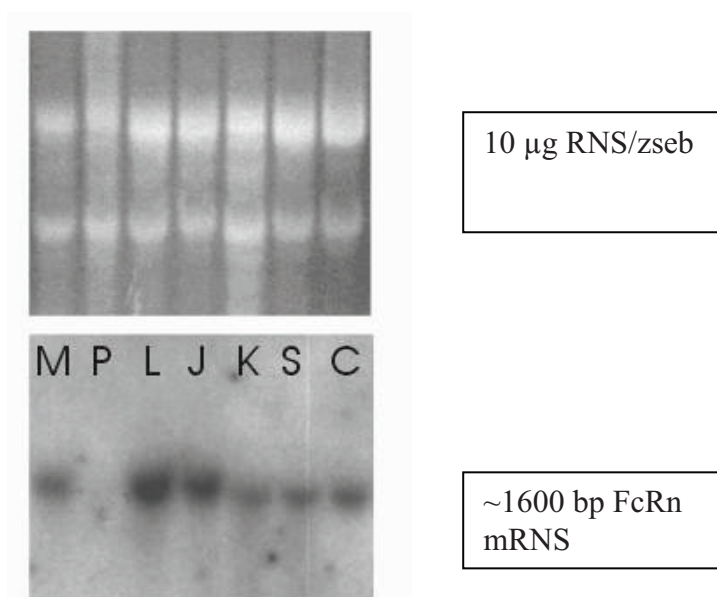
Munkacsoportunk a szarvasmarha FcRn gén expresszióját RT-PCR valamint Northern blot módszerekkel *kolosztrumot termelő, illetve laktáló tőgyszövetben, vékonybélben* és egyéb szövetekben (máj, vese, lép) is ki tudta mutatni (**6. ábra**) (KACSKOVICS et al., 2000). Pontos lokalizációjáról azonban nem voltak ismereteink. Mivel az FcRn endothel és epithel sejtekben is expresszálódik, először arra a kérdésre kerestük a választ, vajon a tőgyben milyen sejt típusokban fejeződik ki, és változik-e az expressziója az ellés körüli időben.



A 2.4. fejezetben említésre került, hogy az újszülött kérődző nem-specifikusan veszi fel az anyai immunglobulinokat, mindamellét újszülött borjak vékonybél crypta sejtjeiben leírtak specifikus IgG1 transzportot, amely a bél lumenébe irányul. Ezért figyelmünk az újszülött vékonybél FcRn expressziójának elemzése felé fordult.

Ezt követően a maternalis immunglobulin transzportban részt vevő és általunk vizsgált szervek (tőgy, vékonybél) mellett egyéb, olyan szerveket is érdemesnek találtunk elemezni, ahol a nyálkahártyafelszíneken a szekrétumot IgG dominancia jellemzi. A légutak nyálkahártya szekrétumainak Ig összetétele sajátos, mert az alsóbb légutak felé haladva nő a szekrétumban az IgG molekulák aránya. Elsőként tehát azt néztük meg, hogy a légutakban megtalálható-e az FcRn expresszió.

Kutatómunkám során az előbb vázolt kérdések mentén állítottam fel főbb célkitűzéseimet.



6. ábra. A szarvasmarha FcRn nehézlánc szöveti expressziójának kimutatása Northern blot módszerrel. Az 1.6 kb hosszú átírat detekciója bFcRn specifikus <sup>32</sup>P-jelölt próbával tőgy (M), nyálmirigy (P), máj (L) jejunum (J), vese (K), lép (S) és MDBK sejtvonala (C) RNS bloton (KACSKOVICS et al., 2000).

### 3. Célkitűzések

- Először a szarvasmarha és juh FcRn  $\alpha$ -lánc mRNS expressziójának kimutatása céljából mRNS specifikus cDNS próba készítését és *in situ* hibridizációs módszer kidolgozását kívántuk elvégezni bFcRn transzfektált, fedőlemezen fixált sejtek felhasználásával.
- A fixált sejteken optimalizált *in situ* hibridizációs módszert következő lépésként szöveti metszeteken készültünk beállítani. E módszerrel terveztük az FcRn  $\alpha$ -lánc mRNS lokalizációját szarvasmarha és juh tőgy, valamint szarvasmarha tüdő metszeteken megvizsgálni.
- A szarvasmarha FcRn nehézlánc szekvencia ismeretében a közeli rokon juh faj neonatalis Fc receptorának szekvencia-homológián alapuló klónozását és a cDNS molekula bázissorrendjéből levezetett aminosavsorrend alapján a fehérje molekula jellemzését terveztük.
- Az FcRn génextpresszió fehérje szintű kimutatásához célul tűztük ki egy specifikus poliklonális ellenanyag előállítását.
- Céljaink között szerepelt az FcRn fehérje szöveti lokalizációjára alkalmas immunhisztokémiai metodika létrehozása, amelyet paraformaldehiddel fixált szöveti metszeteken alkalmazunk.
- A kidolgozott immunhisztokémiai módszerrel a receptor nehézláncának kimutatását terveztük elvégezni szarvasmarha és juh tőgy, újszülött bárány vékonybél, valamint szarvasmarha vékonybél, tüdő és vese metszeteken.
- Az ellés körüli időben, vemhes anyajuhok tőgyéből vett bioptátumsorozat *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai elemzésével kívántuk eldönteni azt a kérdést, hogy változik-e a receptor expressziója a kolosztrogenézis, laktogenezis és az involúció idején. Elhatároztuk, hogy a mintavételt és a szövettani elemzéseket az előbbi kísérlet eredményeinek függvényében szarvasmarhán is megismételjük.
- A receptor egyik jellemző tulajdonsága, hogy az IgG molekulát pH-függő módon köti. E pH-függő IgG kötést kívántuk demonstrálni szarvasmarha tőgyszöveti metszeten.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. BFcRn transzfektált sejtek és negatív kontroll sejtek előkészítése *in situ* hibridizációhoz

Patkány vesehám sejteket (IMCD, inner medullary collecting duct) és szarvasmarha FcRn nehézlánccal transzfektált IMCD sejteket (B1) (KACSKOVICS et al., 2000) tenyésztettünk Dulbecco's Modified Eagle's tápfolyadékban (DMEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), amely 10% fetális bovin szérumot, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint és 0.1 mg/ml streptomocint tartalmazott. A sejteket 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett 10 cm átmérőjű sejttenyésztő edényekben tartottuk, és a 90%-os konfluencia elérésekor passzáltuk.

Az *in situ* hibridizációhoz a B1 és IMCD sejteket 24 lyukú sejttenyésztő edényekbe passzáltuk. A lyukakba előzőleg kerek fedőlemezeket helyeztünk. A fedőlemezekre nőtt sejteket szubkonfluens állapotban dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt PBS-sel (Phosphate Buffered Saline) mostuk 5 percig, majd 4%<sup>1</sup>-os, DEPC-es paraformaldehidben (PFA) fixáltuk 45 percen keresztül 4°C-on. A fixálás után még egyszer mostuk a sejteket PBS-sel, ezt követően az *in situ* hibridizációig 0.02% nátrium-azidot tartalmazó PBS-ben tároltuk szintén 4°C-on.

### 4.2. Szövetminták előkészítése

A Holstein-fríz szarvasmarha szövetmintákat helyi vágóhídról szereztük be. Egy 4 éves, szárazonálló tehén tőgyéből, két 4 éves tehén duodenumából, valamint egy 4 éves tehén és egy 1 éves bika veséjéből vettünk szövetmintákat. A tüdő és trachea mintákat egy egyéves bikából, a többi tüdő mintát két 4 éves tehénből vettük. RNS izolálás céljából a szövetdarabokat azonnal szárazjégre téve lefagyasztottuk vagy RNA later oldatba (Ambion, Austin, TX) helyeztük. Az *in situ* hibridizáció és immunhisztokémia céljára nyert mintákat frissen készült, 4%-os paraformaldehidben (PFA) egész éjszakán keresztül fixáltuk, ezután paraffinba ágyasztuk. A tíz hetes borjak (2 állat) tüdő paraffin blokkjait Dr. Stipkovits László (MTA Állatorvos-tudományi Kutató Intézete) bocsátotta rendelkezésünkre.

A juh tőgybiopsziátumokat (a biopsziátum hossza: 1.9 cm) egy már ismert módszert követve (COLITTI et al., 2000), 70%-os alkoholos fertőtlenítést követően, helyi érzéstelenítéssel (10%-os Lidocain spray; Egis, Budapest), 16g x 16 cm méretű Magnum biopsziás tűvel (Bard, Covington, GA) gyűjtöttük. Három anyajuhból vettünk mintákat 24 és 10 nappal az ellés előtt, valamint 1, 5, 14 és 75 nappal azt követően. A lokális fertőzések megelőzésére, mindvégig a kísérlet során, 3 naponta 3 ml Shotapen-t (Virbac Laboratories, Carros, Franciaország) adtunk. A biopsziátumokat az egyéb szövetmintákkal megegyezően kezeltük.

---

<sup>1</sup> A %-os értékeken szilárd oldott anyag esetén vegyes% (w/v%), folyadék esetén térfogat% (v/v%) értendő.

Intravénásan adott nátrium pentobarbitál injekcióval (Nembutal, Sanofi Phylaxia, Budapest) végzett eutanáziát követően újszülött bárány duodenumából szövetmintát vettünk. Az immunhisztokémiai vizsgálathoz a mintát frissen készült 4%-os paraformaldehidbe (PFA) helyeztük.

A Holstein-fríz szarvasmarhák esetében a tőgyzöveti mintavételt az Enyingi Agrár Rt. kiscsérípusztai tehenészetében Dr. Bartyik János (főágazatvezető, főállatorvos) hozzájárulásával végeztük. Az ellés környékén álló (ellés előtt 2, 1 hét, 1 nap, ellés napján, ellés után 1, 2 hét) szarvasmarhákat (tizenkettő 3 éves tehen) körmözőkalodában rögzítettük, és a juhoknál már ismertetett módon vettünk tőgybióptátumokat. Subcutan antibiotikum kezelést nem alkalmaztunk, a beavatkozás után a mintavételi területet Aureomycin Violet Spray-vel (Fort Dodge Animal Health, Overland Park, KS) kezelték, és az állatok felügyeletét a helyi állatorvos látta el.

Az állatkísérleti műveleteket a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságával (Engedély száma: 23/B/2000) engedélyeztettük.

#### **4.3. Juh FcRn nehézlánc klónozása**

Egy helyi vágóhídról gyűjtött juh májból RNS-t vontunk ki TRIzol reagenssel (Gibco BRL-Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). A teljes RNS 5 µg-ját Superscript II enzim (Gibco BRL-Life Technologies Inc.) és a (dT)17-adapter primer (5'-GAC TCG AGT CGA CAT CGA(T)<sub>17</sub>-3') segítségével cDNS-sé írtuk át. Az ismert szarvasmarha FcRn α-lánc szekvencia és a feltételezett szoros homológia alapján a juh FcRn α-láncot olyan primer párokkal amplifikáltuk, amelyeket korábban a bovin FcRn klónozásához használtunk laboratóriumunkban (KACSKOVICS et al., 2000) (B10: 5'-CTG GGG CCG CAG AGG GAA GG-3'; B4: 5'-GGC TCC TTC CAC TCC AGG TT-3'). A reverz transzkripcióban eredményül kapott cDNS-t ezenkívül még 3'RACE-PCR technikának is alávetettük egy adapter primert (5'-GAC TCG AGT CGA CAT CG-3') és a B3 FcRn specifikus primert (B3: 5'-CGC AGC ART AYC TGA SCT ACA A-3'<sup>2</sup>) alkalmazva.

A génszakaszokat pGEM-T vektorba (Promega) klónoztuk, majd automatizált fluoreszcens szekvenálást végeztettünk a Cybergene (Huddinge, Svédország) céggel.

#### **4.4. A digoxigeninnel jelölt próba készítése**

A transzmembrán, citoplazmikus és a 3'-nem-transzlálódó régió egy 367 bázispár hosszú szakaszát – amely az MHC I génekkel a legkisebb homológiát mutatja – szarvasmarha FcRn cDNS klónból hagyományos polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk (primerek: B7: 5'-GGC

---

<sup>2</sup> R: nem meghatározott purin nukleotid A+G, Y: nem meghatározott pirimidin nukleotid C+T, S: tiouridin

GAC GAG CAC CAC TAC-3', B8: 5'-GAT TCC CGG AGG TCW CAC A-3'<sup>3</sup>). A kezdeti lépést 2 percig 94°C-on végeztük, ezt követte a denaturáció 94°C-on 30 másodpercig, majd a tapadási hőmérsékletet 30 másodpercig 60°C-ra állítottuk be. A primer kiterjesztés 72°C-on történt 40 másodpercig. A PCR-terméket 1%-os agaróz gélben választottuk el, kivágtuk a gélből, és QIAquick gél extrakciós kittel (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) tisztítottuk. Ezt a tisztított B7-B8 génszakaszt körülbelül 8 ng/μl végső koncentrációban használtuk a jelölő PCR reakcióban. A digoxigenin (DIG) jelölésnél a dTTP / DIG-dUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Németország) arányt 1.9-re állítottuk be, és a lineáris PCR-t az antisense B8 primerrel végeztük egy korábban publikált standard protokoll (WILKINSON, 1992) szerint. Ellenőrzésképpen 1 μl próbát megfuttattunk 1%-os agaróz gélben, átblottoltuk Immobilon-NY nylon membránra (Millipore Corporation, Bedford, MA), UV fényben rögzítettük, és a gyártó útmutatásai alapján elvégeztük a detekciót (DIG Nucleic Acid Detection kit, Boehringer Mannheim). A színhívást sötétben, 3-12 órán keresztül nitroblue tetrazolium salt/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) szubsztrát oldattal végeztük.

A juh FcRn α-lánc specifikus próbát egy juh cDNS klónból kiindulva a szarvasmarhánál már ismertetett módon készítettük el, néhány kisebb változtatással. A PCR módszerrel, a B7-B8 primerek segítségével előállított DNS szakaszt, agaróz gélben megfuttattuk, és a gélből kivágva centrifugában használható oszlopon (Supelco, Bellefonte, PA) tisztítottuk. A próba ellenőrzését Biodyne B nylon membránon (Pall BioSupport Co., East Hills, NY) végeztük. A degenerált B8 primer használatát az indokolta, hogy a szarvasmarha FcRn klónozásánál a humán és patkány szekvencia ismeretében korábban Kacs Kovics és mtsai (2000) által tervezett B8 degenerált primer éppen az FcRn α-lánc MHC I géntől a leginkább eltérő régiójára tapad. A degenerált B8 primer segítségével a szarvasmarha és juh FcRn α-lánc specifikus cDNS próbát is el tudtuk készíteni.

#### **4.5. *In situ* hibridizáció**

Az *in situ* hibridizációs reakciót először fedőlemezre tenyésztett és 4% PFA-val fixált sejteken optimalizáltuk. A fedőlemezeket a könnyebb kezelhetőség érdekében Entellannal (Merck, Darmstadt, Németország) tárgylemezekre ragasztottuk. Pozitív kontrollként bovin FcRn nehézlánccal transzfektált IMCD sejtek (patkány vesehámsejt) egy klónját használtuk (B1), negatív kontrollként pedig a nem-transzfektált IMCD sejteket (KACSKOVICS et al., 2000). A sejteket PBS pufferrel mostuk, ezután proteináz K enzimmal (Boehringer Mannheim) emésztettük 30 percig, 37°C-on (koncentráció: 10 μg/ml PBS-ben), hogy a citoplazmában lévő mRNS a próba által hozzáférhető legyen. Az emésztés leállítására 10 percig 4%-os PFA-ban

---

<sup>3</sup> W: pszeudouridin

4°C-on utófixálást alkalmaztunk. Ezt követően a sejteket desztillált vízzel mostuk. A DIG-jelölt próbát és a lazac sperma DNS-t 99°C-on, 5 percig denaturáltuk és a “Hybridization mix A” (AUSUBEL, 1989) hibridizációs oldathoz adtuk (végső koncentrációk: lazac sperma DNS: 100 µg/ml, próba: 1 ng/µl). A “Hybridization mix A” hibridizációs oldat összetételét némileg módosítottuk: 50% ionmentes formamid, 0.3 M NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 5X Denhardt oldat, 500 µl/ml élesztő tRNS (GibcoBRL-Life Technologies Inc.), 10% PEG (MW 6000), 5 mM Vanadyl Ribonucleoside Complex (GibcoBRL-Life Technologies Inc.). A fenti módon előkészített hibridizációs oldatot a fixált sejtekre rétegeztük, és fedőlemezzel lefedtük azokat. A kezdeti, 94°C hőmérsékletre emelt, 3 percig tartó denaturációs lépés után az *in situ* hibridizációt egész éjszaka, 42°C-on *in situ* blokkon kiviteleztek. Másnap eltávolítottuk a fedőlemezeket, és a sejteket 2X SSC-vel, majd 1X SSC-vel 10 percig, szobahőmérsékleten mostuk. Végül 20 perces mosás következett 0.1X SSC-ben, 42°C-on. A detekciót a Boehringer protokoll szerint hajtottuk végre néhány módosítással. Az anti-DIG ellenanyagot 100-szoros hígításban használtuk egy órán keresztül. A színhívást 25°C-on 20 percig végeztük. Végül a sejteket desztillált vízben mostuk, levegőn szárítottuk, és a fénymikroszkópos értékeléshez Entellannal (Merck) fedtük azokat.

A módszer beállítása után az FcRn nehézlánc mRNS-t detektáltuk szöveti metszeten. Paraffinba ágyazott szarvasmarha tőgyszövetből 5 µm vastag metszeteket készítettünk, és azokat szilánózott tárgylemezekre helyeztük. A deparaffinálás után a metszeteken hasonló *in situ* hibridizációs eljárást alkalmaztunk, mint a fedőlemezen fixált sejteken. A bovin FcRn specifikus próbát 0.25 ng/µl koncentrációban használtuk, a hibridizáció hőmérséklete 45°C volt és az anti-DIG ellenanyagot 500-szorosra hígítottuk.

A juh tőgybióptátumokból származó metszetek *in situ* hibridizációs elemzéséhez juh FcRn specifikus próbát használtunk, 1 ng/µl koncentrációban. Az anti-DIG ellenanyag hígítását 200-szorosnak választottuk.

A szarvasmarha tüdő metszeteknél a bovin FcRn próbát 0.5 ng/µl koncentrációban adtuk a hibridizációs oldathoz. A hibridizáció hőmérsékletét 45°C-ra állítottuk be. Az anti-DIG ellenanyagot 500-szoros hígításban alkalmaztuk. Az *in situ* hibridizáció többi lépése megegyezett a fixált sejteken végzett módszerrel.

#### **4.6. Az FcRn specifikus antiszérum elkészítése**

Az antiszérum előállításához új-zélandi fehér nyulakat immunizáltunk a CLEWKEPPSMRLKAR szekvenciájú FcRn α-láncból származtatott oligopeptiddel (az oligopeptidet a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben állították elő), amelyet 3-maleinimid-benzoészav-N-hidroxi-szukcinimid-észterrel (MBS; Sigma Chemical Co.,

St. Louis, MO) aktivált keyhole limpet (*Megatura crenulata*, „lyukas csiga”) hemocyaninhoz (KLH; Sigma Chemical Co.) kapcsoltunk. Az oligopeptid a szarvasmarha és juh FcRn  $\alpha 2$  és  $\alpha 3$  részének (domén) erősen konzervatív 173-186 aminosavmaradékát reprezentálta, ezenkívül még egy, a konjugációhoz szükséges, *N-terminális ciszteint* tartalmazott.

A konjugációhoz dimetil-formamidban oldott MBS-t (25 mg/ml) és 10 mg/ml koncentrációjú KLH oldatot (PBS-ben oldva, pH 7.4) készítettünk, és az oldatokat összekeverve szobahőmérsékleten fél órát rázattuk. Az oldatot Microcon 50 (Millipore Corporation) szűrőn leszűrtük, és a szűrőn fennmaradó fehérjét az oligopeptid oldattal (1 mg/ml oligopeptid 0.1 M PBS-ben oldva, pH 6.8, 20 mM EDTA) keverve 4 órán keresztül rázattuk. A kész konjugátumot tartalmazó oldatot Snake Skin (10,000 MW; Pierce, Rockford, IL) dializáló membránban 0.1 M PBS-sel (pH 6.8) szemben egész éjszaka 4°C-on, ezt követően pedig 6 órán keresztül szobahőmérsékleten dializáltuk (AUSUBEL, 1989). Az immunizáláshoz egyedenként 0.3 mg konjugátumot homogenizáltunk komplett Freund adjuvánssal (Sigma Chemical Co.), és a homogenizátumot több helyre intradermalisan és subcutan adtuk. Az emlékeztető immunizálásokhoz inkomplett Freund adjuvánssal (Sigma Chemical Co.) készített homogenizátumot használtunk. Az ötödik emlékeztető immunizálás után a nyulakat elvéreztettük.

Az anti-FcRn antitesteket tartalmazó szérum affinitás-tisztítását SulfoLink kittel (Pierce), végeztük. A SulfoLink affinitásoszlop olyan gélszemcséket tartalmazott, amelyek szulfhidril csoportjaihoz a cisztein tartalmú oligopeptid diszulfid hidak kialakulásával kötődni képes. Két mg tisztított oligopeptidet TED pufferben (50 mM Tris/HCl pH 8.5, 5 mM EDTA) oldottunk, ezt követően 15 percig szobahőmérsékleten rázattuk a géluszuspenzióval összekeverve. A rázítás után további fél órát inkubáltuk a szuszpenziót. Az így előkészített gélét ötször 2 ml TED pufferrel mostuk. A gélen lévő nem-specifikus kötőhelyeket 50 mM-os cisztein oldattal (TED pufferben oldva) lekötöttük, ismét 15 perc rázattal, majd fél óra inkubálással. A kész gélét 10X 3 ml 1 M-os NaCl oldattal és 10X 3 ml fiziológiás sóoldatban (0.9% NaCl) oldott 0.05% Na-aziddal mostuk. Két ml anti-FcRn antitestet tartalmazó szérumot Snake Skin dializáló membránban 3X 200 ml foszfát pufferrel (100 mM, pH 7.2) szemben dializáltunk két órán keresztül szobahőmérsékleten, egész éjszaka 4°C-on, végül ismét két órán keresztül szobahőmérsékleten. A dializált szérumot az oligopeptiddel kapcsolt gélhez kevertük és 4 órán keresztül szobahőmérsékleten 700 rpm-en rázattuk. A leülepedett gélről eltávolítottuk a nem-kötődő frakciót, és a gélét 4X 2 ml foszfát pufferrel, 4X 2 ml PBS-sel (100 mM, pH 7.2, 1 M NaCl) és 4X 2 ml desztillált vízzel mostuk. A specifikusan kötődő antitestek eluálása céljából az oszlopot 3X 5 percig 2 ml pH 3.0 eluáló pufferrel (100 mM glicin-HCl, 100 mM glükóz) mostuk. A kapott frakciókat Tris pufferrel (1 M, pH 8.5) semlegesítettük. A fenti műveletet ugyanígy

elvégeztük pH 2.5 eluáló pufferrel (100 mM glicin-HCl, 100 mM glükóz) is. Az affinitástisztított frakciókat Western blot segítségével teszteltük.

#### 4.7. Western blot

Tíz cm átmérőjű sejtenyésző edényben tartott IMCD és B1 sejteket  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  mentes DPBS pufferrel mostunk. A sejtekre 1.5 ml Tripszin-EDTA oldatot mértünk, és az edényeket 37°C-on tartottuk, amíg a sejtek el nem váltak egymástól és a tenyésztőedény aljáról. A sejtuszpenziót Eppendorf-csőbe pipettáztuk, és 2 percig 3000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, a sejtellehez 1%-os SDS oldatot adtunk, és az oldatot 2 percig erősen kevertük (vortex). A fehérjekivonat koncentrációját Micro BCA kit (Pierce) segítségével határoztuk meg, a gyártó útmutatásai alapján.

Az előző módon nyert fehérjekivatokhoz merkapto-etanolos 6X loading puffert (0.5 M TrisCl/ 10% SDS, pH 6.8; 30% glicerin; 0.012% brómfenol-kék; 6% merkapto-etanol) adtunk, és a fehérjekivonatokat 95°C-on, 5 percig denaturáltuk. A fehérjekivatok szétválasztásához 10%-os denaturáló poliakrilamid gélt készítettünk (tömörítő gél: 0.5 M TrisCl/ 0.4% SDS, pH 6.8; szeparáló gél: 1.5 M TrisCl/ 0.4% SDS, pH 8.8) (AUSUBEL, 1989). A gélt Hoefer Minigel kádban (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) rögzítettük, és zsebenként 10 µg denaturált fehérjekivonatot futtattunk 0.5% SDS tartalmú Tris-glicin pufferben (pH 8.3), 25-35 mA áramerősség mellett. A fehérjeminták szétválasztása után a gélt 2X 15 percig transzfer-pufferben (16.67 mM Tris, 128 mM glicin, 10% metanol) mostuk, és a blottoláshoz előkészítettük a polivinil-difluorid (Immobilon-P; Millipore Corporation) membránt, amelyet 2 percig metanolban, 5 percig desztillált vízben, végül 15 percig transzfer-pufferben nedvesítettünk. A fehérjéket transzfer-pufferben, elektromos blottoló készülékkel (Hoefer Scientific Instruments) vittük át a membránra. A készülék használata során 30 percig 100 V feszültséget állítottunk be. A blottolás után a membránt 1 órán keresztül TBS-T pufferben (Tris Buffered Saline, 0.05% Tween 20 detergens) blokkoltuk, amelyben 5% zsírintes tejporthoz oldottunk fel. A membránra átvitt fehérjét az FcRn oligopeptid ellen termelt ellenanyaggal reagáltattuk egy órán keresztül ugyancsak 5% tejporthoz tartalmú TBS-T pufferben. Az inkubálást követően a membránt 4X 10 percig TBS-T oldatban mostuk. A megkötődött primer ellenanyagot peroxidázzal kapcsolt, kecskében előállított anti-nyúl antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, CA) inkubáltuk, majd ismét 3X 10 percig TBS-T pufferral mostuk a membránt. A megkötődött szekunder antitestet luminol alapú kemilumineszcenciás szubsztrát oldat (0.25 mg/ml luminol, 33 µg/ml para-kumarinsav, 0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.01 M Tris/HCl pH 8.5) hozzáadásával detektáltuk (KRICKA, 1991). A kemilumineszcens jelek előhívásához Hyperfilm (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Anglia) filmet használtunk.



## 4.8. Immunhisztokémia

A tőgybiopsziákból, a tracheából, a tüdőből, a duodenumból és a veséből származó metszeteket az *in situ* hibridizációnál leírt módon előkészítettük, és 15 percre 1%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldatba helyeztük, hogy az endogén peroxidázokat hatástalanítsuk. Desztillált vízzel (2X 10 perc) és Tris-pufferrel (TBS) történő 10 perces mosás után egy órán keresztül blokkoltunk 5%-os bovin szérum albuminnal (BSA), szintén TBS pufferben. A metszeteket affinitástisztított anti-FcRn ellenanyaggal inkubáltuk (végső koncentráció a juh tőgybiopsziátum metszeteken: 76 µg/ml, egyéb metszeteken: 120 µg/ml) 1% BSA-val kiegészítve, 4°C-on, éjszakán át, majd még egy órán keresztül, szobahőmérsékleten. Ezután biotinnel jelölt, kecskében termelt, anti-nyúl IgG-t alkalmaztunk 30 percig, szobahőmérsékleten. Az egyes lépések között a tárgylemezeket háromszor 10 percig TBS-ben mostuk. A szekunder ellenanyagot Vectastain ABC kittel (Vector Laboratories) detektáltuk. A színhívást Tris-pufferben feloldott, 0.25 mg/ml koncentrációjú 3,3'-diaminobenzidinnel (Sigma Chemical Co.) végeztük. A metszeteket ezután desztillált vízzel öblítettük, levegőn szárítottuk, és Entellannal (Merck) fedtük.

## 4.9. A pH-függő IgG kötés vizsgálata metszeteken

A szarvasmarha tőgybiopsziátumokból az *in situ* hibridizációnál leírt módon metszeteket készítettünk és deparaffináltuk azokat. A metszeteket ezután antigén előhívó oldatba helyeztük (DAKO Target Retrieval Solution; DAKO Corporation, Carpinteria, CA), és mikrohullámú kezelést alkalmaztunk. Az oldat szobahőmérsékletre való lehűlése után a metszeteket TBS-ben mostuk és egy órán keresztül 5% BSA oldatban blokkoltuk. A metszeteket ezt követően cianin 2 (Cy<sup>TM</sup>2)-vel jelölt, 20 µg/ml végső koncentrációjú bovin IgG-vel (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) inkubáltuk 4°C-on egész éjszakán át, majd 3X 10 percig TBS pufferrel mostuk. A kísérletet párhuzamosan mindig pH 6.0 és pH 7.4 értékekre beállított TBS pufferekkel végeztük. Végül levegőn szárítottuk és Entellannal (Merck) fedtük a metszeteket. A kötésvizsgálat eredményét fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük.

## 4.10. RT-PCR

Az RNA later (Ambion) oldatban tárolt szarvasmarha tőgybiopsziátumokból TRIzol reagenssel (Gibco BRL-Life Technologies Inc.) teljes RNS-t vontunk ki. Két µg RNS-ből Moloney-Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverz transzkriptáz enzim (Promega) és a (dT)17-adapter primer (lásd a 4.3. részt) segítségével cDNS-t szintetizáltunk (össztérfogat: 25 µl). Az RT PCR módszernél a 4.4. pontban említett B7 illetve a BB (5'-GTC AGG AGC AGG AAT AAG CC-3') FcRn nehézlánc specifikus primereket, a könnyűláncéhoz pedig a Bbeta2 for (5'-TCC AGC GTC CTC CAA-3') és Bbeta2 rev (5'-TCT GAC TGC TCC GAT TTA-3')

primereket használtuk. A cDNS átírás hatékonyságának ellenőrzésére két bovin aktin specifikus primert (BoAc 3: 5'-ACC ATC GGC AAT GAG C-3' és BoAc 4: (5'-CGT GTT GGC GTA GAG GTC-3') vettünk igénybe. A PCR terméket 2% agaróz gélben futtattuk és etídium bromiddal festettük.

## 5. Eredmények

### 5.1. A juh FcRn klónozása

Mivel korábban szarvasmarha (KACSKOVICS et al., 2000) és patkány májból (BLUMBERG et al., 1995, TELLEMAN és JUNGHANS, 2000) mutattak ki FcRn expressziót, máj szövetből kivont RNS-ből készítettünk cDNS-t, hogy a juh FcRn egy génszakaszát izoláljuk. A PCR amplifikáció, amelyet az 5'-nem-transzlálódó régióhoz és az  $\alpha 2$  doménhez tapadó bovin FcRn specifikus primerekkel (sorrendben B10 és B4) hajtottunk végre, egy körülbelül 600 bázispár hosszú DNS szakaszt eredményezett. A várt molekulaméret egyezés és a Southern blottal történt ellenőrzés alapján ezt a felerősített cDNS szakaszt ligáltuk pGEM-T vektorba, és a klónokból egyet szekvenáltattunk. Azután 3'-RACE technikát végeztünk a B3 és az adapter primerrel, amelynek során egy ~1.3 kilobázis nagyságú DNS szakaszt kaptunk. Néhány előállított klónt szekvenáltattunk. Utóbbiak az  $\alpha 1$  domén (exon 3) közepétől kezdődtek, és a poly(A) faroknál végződtek. A kétféle szekvenálási stratégiából származó szekvencia adatok 397 bázispár hosszúságban átfedtek, ezért lehetőség nyílt arra, hogy egy 1496 bázispár hosszú levezetett cDNS szekvenciát nyerjünk, amely magában foglalta részben az ovin FcRn nehézláncának 5'-nem-transzlálódó régióját, a teljes kódoló régiót és a 3'-nem-transzlálódó régiót (GenBank hozzáférési szám: AF421499) (7. **ábra**). Az adatokat a BLAST program segítségével összevetettük más GenBank szekvenciákkal, és magas homológiát találtunk a bovin, humán és patkány FcRn kódoló régiójával (a fenti sorrendben 96%, 78% és 65%).

A 8. **ábra** a juh FcRn (oFcRn) cDNS-ből származtatott aminosavsorrendjét mutatja, összehasonlítva a bovin (KACSKOVICS et al., 2000), humán (STORY et al., 1994) és patkány (SIMISTER és MOSTOV, 1989) szekvenciákkal. Az általunk izolált oFcRn  $\alpha$ -lánc teljes hosszúságú átírata három extracelluláris doménből ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ ), egy transzmembrán régióból és egy citoplazmikus farokrészből áll (MAYER et al., 2002b).

exon2-leader
exon3- $\alpha$ 1

GATCGCGGCTGCCAGTCTCCCACTCAGGATGCGGGCTTCCCGGCCTCAGCCCTGGGGGCTCGGTCTGTTTCTCGTCCCTGCCTGGGGCGCTGAGCGCA 100  
M R L P R P Q P W G L G L F L V L L P G A L S A  
+1

GAGAACCATCGCTCGCTCCAGTACCACCTTCAACCGCGTGTGGCCCCCGCCGGGGACCCTGCTTTCTGGGTTTCGGGCTGGCTAGGGCCCCAGCAGT 200  
E N H R S L Q Y H F T A V S A P A A G T P A F W V S G W L G P Q Q Y

ACCTGAGCTACAATAACCTGCGGGCGCAGGCTGAGCCGTATGGCGCGTGGGTCTGGGAAAGCCAGGTGTCCTGGTATTGGGAGAAAGAGACCACGGACCT 300  
L S Y N N L R A Q A E P Y G A W V W E S Q V S W Y W E K E T T D L

exon4- $\alpha$ 2

GAGGAACCAGGAGAAGCTCTTCCCTCCAAGCGCTCCAAGTTTtagggcgaagggcccttcaccctgcagggcctgttgggctgCGAGTTGGCCCTGATAAT 400  
R N Q E K L F L Q A L Q V L G E G P F T L Q G L L G C E L G P D N

GTCTCGGTGCCGGTGGCCAAGTTTGCCTGAACGGCGAGGAGTTTCATGATGTTTGACCCCAAGCTGGGCATCTGGGATGGTGACTGGCCTGAGTCCCGGA 500  
V S V P V A K F A L N G E E F M M F D P K L G I W D G D W P E S R T

CGTCACTATCCAGTGGCAAAGCAGCCAGGGCGGTCAACAAGGAGAAGACCTTCTCTACTCTGCCCACACCGGCTGCTGGGGCATCTGGAGAG 600  
V S I Q W T K Q P E A V N K E K T F L L Y S C P H R L L G H L E R

exon5- $\alpha$ 3

GGCCGAGGCAACCTGGAGTGAAGGAGCCACCCTCCATGCGCCTGAAGGCCAGACCAGCAGTCCCGCCTCTCTGTGCTCACCTGCAGCGCCTTCTCC 700  
G R G N L E W K E P P S M R L K A R P S S P G L S V L T C S A F S

TTTACCCACCTGAGCTGAAGCTGCACTTCTGCGGAACGGGCTGGCCATTGGCTCTGGTGAAGATTGACATGGGCCCAACGGTGACGGCTCCTTCTAGG 800  
F Y P P E L K L H F L R N G L A I G S G E I D M G P N G D G S F Y A

exon6-TM

CCTGGTCATCACTCACAGTCAAGAGTGGCGAGCAGCACCCTACCGCTGCGTGGTGCAGCAGCGGGGCTGGCCAGCCCTCACGGTGGAGCTGGAATC 900  
W S S L T V K S G D E H H Y R C V V Q H A G L A Q P L T V E L E S

ACCAGCCAGAACCTCGATGCCAGTGGTGGGAATCGTCATCGGCTTTTTCTGCTCCTGACAGTGGCTGCGGGCGGAGCTCTCTGTGGAGAAGGATGAGG 1000  
P A R T S M P V V G I V I G F F L L L T V A A G G A L L W R R M R

exon7-CYT

AAGGGGCTGCCAGCTTCTGGATCTTTTCCGTGGGAGGATGTAGGGCCCTCTGCCACTCCCGCCTGTCCAAGGATGGTGAATCTTAGGATAAAA 1100  
K G L P A S W I S F R G E D V G A L L P T P G L S K D G E S End

ATGCGTTCCAGCAACTGCCGATCATCCCCATCTGGCTGTTACCAGCTAATGTCCTCAGGTCCTTTTCATGCTGTGAGACCTCCGGGAATCCTGGTAT 1200

TTTTGAGCCTCCGAAGGAGCCCAATGTCTCCCTCTGGATTTCTCTCCTGTGATCTGCCTCAGTTCCCCCTCTGATATATATGGTTCTTTTCCAGCT 1300

CCACATATAACATGGGTTTAGGCCGAATCGTTGTGTTCTCATCGTTTCAACTTTTTTAGGAATTGTGAGGGGGATAAATGGTGAAGCCTTGGGCTT 1400

CAAATCTCTCTGAGGCTAACTTGTGCCATGGTGAATTTGCCAACTTTATATACCAAGTCATGTATTTTAAATGAATAAATTTTCAAAATATTTAAAA 1500

**7. ábra. A juh neonatalis Fc receptor (FcRn)  $\alpha$ -lánc nukleotid és cDNS-ből származtatott aminosavszekvenciája. A feltételezett ATG indítóhely vastag betűvel, a konszenzus iniciációs hely aláhúzással jelölt. A szignál peptidet követő lehetséges N-terminális a +1 jelzi az Ala alatt. A hidrofób transzmembrán szakaszt dőlt betűvel szedtük, a 3' nem-transzlálódó régió „AATAAA” poliadenilációs helyét aláhúztuk. CYT, citoplazmikus; TM, transzmembrán**

## Leader

```
bFcRn : MRLPRPQPWG-LGLLLVLLPGALS
oFcRn : MRLPRPQPWG-LGLFLVLLPGALS
hFcRn : MGVPRPQPWA-LGLLLVLLPGSLG
rFcRn : MGM--SOPCVLLSLLLVLPLQTWG
```

## $\alpha 1$

```
bFcRn : AENYRSLQYHFTAVSAPAAGTPAFWVSGWLGPOQYLSYNNLRAQAEPYGAWVWESQVSWYWEKETMDLRNQEITLFLLEALQALG---EGP-- : 86
oFcRn : AENHRSLOYHFTAVSAPAAGTPAFWVSGWLGPOQYLSYNNLRAQAEPYGAWVWESQVSWYWEKETMDLRNQEKLFLQALQVLG---EGP-- : 86
hFcRn : AESHLSLLYHLLTAVSSPAEGTPAFWVSGWLGPOQYLSYNSLRCEAEPGAWVWENQVSWYWEKETDRLRITKEKLFLEAFKALG---GKGP-- : 87
rFcRn : AEPRLPLMYHLAAVSDLSLGLPSFWATGWLGAQQYLTYNNLRQEAEPGAWIWNQVSWYWEKETDRLSKKEQLFLEAIRITLLENQINGT--- : 89
```

## $\alpha 2$

```
bFcRn : FTMQGLLGCCELGPDNVSVPAKFAFNNGEEFMMFDPKLGIDWDWPESTRVSIKWTQOPEAVNKEKTFLLYSCPHRLLGHLERGRGNLEWK--- : 176
oFcRn : FTLQGLLGCCELGPDNVSVPAKFAFNNGEEFMMFDPKLGIDWDWPESTRVSIQWTKOPEAVNKEKTFLLYSCPHRLLGHLERGRGNLEWK--- : 176
hFcRn : YTLQGLLGCCELGPDNTSVPTAKFAFNNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALATSORWQQQDKAANKETLFLLSCPHRLREHLERGRGNLEWK--- : 177
rFcRn : FTLQGLLGCCELAPDNSSLPATAVFAFNNGEEFMRFNPRTCNWSGEWPETDIVGNLWVKOPEAARKESHFLLTSCPERLLGHLERGRGNLEWK--- : 179
```

## $\alpha 3$

```
bFcRn : EPPSMRLKARPGSPGFSVLTCSAFSAFYPPELKLRFRLNGLAIGSGEIDMGPNGDGSFYAWSSLTVKSGDEHHYRCVVQHAGLAQPLTVEL--- : 266
oFcRn : EPPSMRLKARPSSPGISVLTCSAFSAFYPPELKLRFRLNGLAIGSGEIDMGPNGDGSFYAWSSLTVKSGDEHHYRCVVQHAGLAQPLTVEL--- : 266
hFcRn : EPPSMRLKARPSSPGFVSVLTCSAFSAFYPPELQLRFRLNGLAAGTGGGDFGPNSDGSFHASSLTVKSGDEHHYCCVVQHAGLAQPLTVEL--- : 267
rFcRn : EPPSMRLKARPGNSGSSVLTCAAFSFYPPELKLRFRLNGLASGSGNCSTGPNGDGSFHAWSLLEVKRGDEHHYCCQVEHEGLAQPLTVDL--- : 269
```

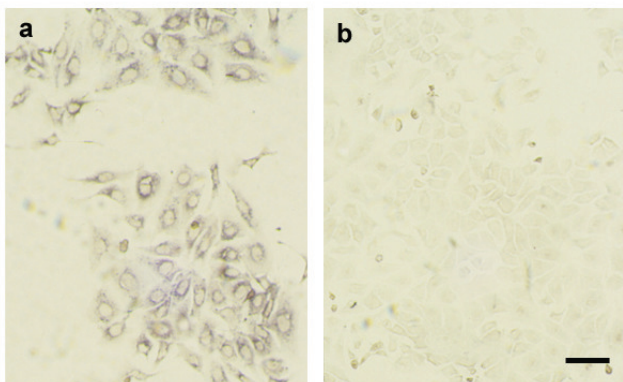
## TM CYT

```
bFcRn : ESPARTISVPVVGIVIGLFLLLTVAAGGALLWRRMRKGLPAPWISFRGEDVGGALLPTPGLSKDGES----- : 331
oFcRn : ESPARTISMPVVGIVIGLFLLLTVAAGGALLWRRMRKGLPASWISFRGEDVGGALLPTPGLSKDGES----- : 331
hFcRn : ESPAKSSVIVVGIVIGVLLTAAAVGGALLWRRMRSGLPAPWISIRGDDIGVLLPTPGEAQDADLKDVNVIIPATA----- : 342
rFcRn : DSPARSSVPVVGITLGLLVVVAIAGGVLLWRRMRSGLPAPWISLSGDDSGDLLPGGNLPPPEAEPOGVNAFPATS----- : 344
```

8. ábra. A szarvasmarha (b), juh (o), humán (h) és patkány (r), neonatalis Fc receptor (FcRn)  $\alpha$ -lánc cDNS-ből származtatott aminosavszekvenciáinak domén szerinti összevetése. Az N-kapcsolt, minden szekvenciában előforduló glikozilációs helyet fekete háromszög jelzi, a patkány szekvencia további kötőhelyeit pedig fehér háromszögek. A szürke sáv mutatja a hidrofób transzmembrán régiót. Az egyes aminosavmaradékok konzerváltsági fokát az egy oszlopban előforduló azonos aminosavmaradékok száma alapján becsültük. Minél magasabb a konzerváltság foka, annál sötétebb az adott betűjel hátere. CYT, citoplazmikus; TM, transzmembrán

## 5.2. *In situ* hibridizáció (ISH)

Az FcRn mRNS transzfektált sejtekből, tőgybioptátumokból és a tüdő szöveti metszeteiből történő kimutatásához a cDNS szekvenciából kiindulva olyan digoxigenin-jelölt DNS próbát készítettünk, amely a transzmembrán régiót, a citoplazmikus régiót és a 3'-nem-transzlálódó régió egy részét fedte le. *In situ* hibridizációval először a pozitív kontrollként használt bovin FcRn nehézlánccal transzfektált IMCD (B1) sejtekből mutattuk ki az FcRn expressziót. Az elemzés specifikusságára utal továbbá, hogy a sejtek magvai nem festődtek (9.a ábra). Negatív



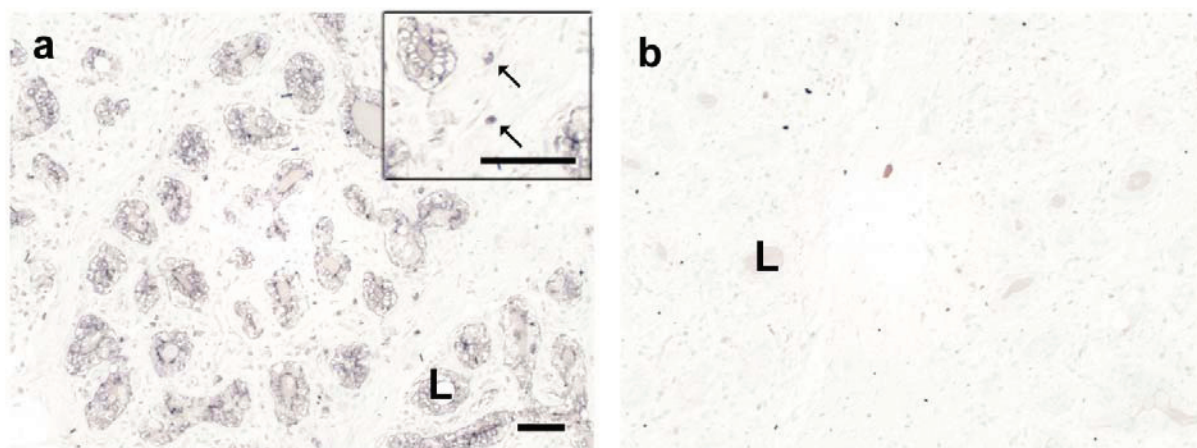
kontrollként a nem-transzfektált IMCD sejtek szolgáltak (9.b ábra).

9. ábra. A bovin neonatalis Fc receptor (bFcRn)  $\alpha$ -lánc mRNS kimutatása *in situ* hibridizációval. a) bFcRn nehézlánc cDNS-sel transzfektált IMCD sejtek (B1), b) nem-transzfektált IMCD sejtek (negatív kontroll), léptékvonal 20  $\mu$ m.

Következő lépésként az *in situ*

hibridizációs módszert szárazonálló tehén

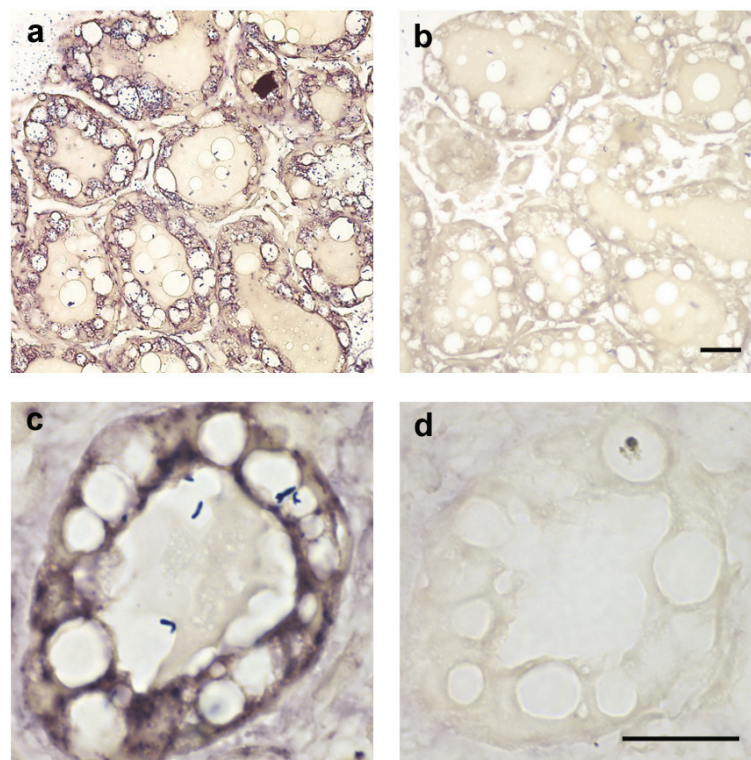
tőgy szöveti metszeten optimalizáltuk. Az FcRn nehézlánc mRNS jelenlétét az acinus és ductus epithel sejtekből mutattuk ki. Az interstitiumban pontozott festődést figyeltünk meg. Az FcRn nehézlánc mRNS-hez kötődni nem képes, sense próbával (negatív kontroll) hibridizált metszeteken gyenge, nem specifikus jelet tapasztaltunk (10. ábra).



10. ábra. *In situ* hibridizáció szárazonálló tehéntőgy metszeteken. a) Hibridizáció bovin FcRn nehézlánc specifikus anti-sense próbával, a képben látható nyilak az interstitium pontozott jelölődésére mutatnak, b) hibridizáció sense próbával (negatív kontroll), L, lumen; a léptékvonalak 50  $\mu$ m-t jelölnek.

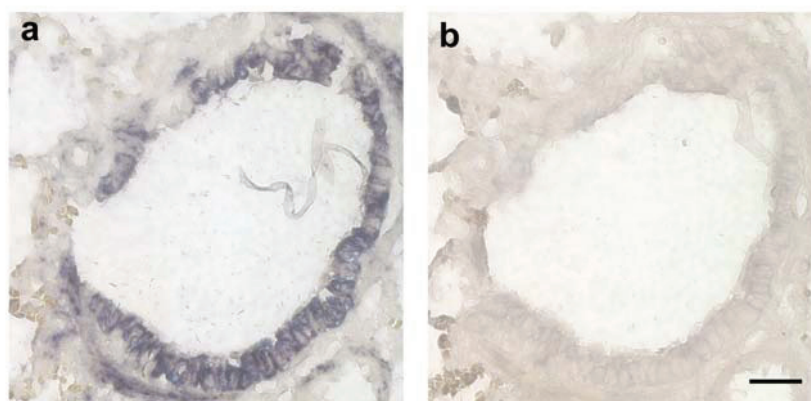
Az FcRn expresszió lokalizációját a szarvasmarha tőgyben megfigyelt lokalizációval azonosnak találtuk azokban a tőgybioptátumokban is, amelyeket vemhes anyajuhoktól vettünk ellés előtt 24 és 10 nappal, valamint ellés után 1, 5 (11.a és 11.c ábra) és 14 nappal. Az FcRn

nehézlánc mRNS jelenlétét itt is az acinus és ductus epithel sejtekből mutattuk ki, az ellést megelőzően és ellés után. Az FcRn-ből levezetett sense próbával hibridizált kontroll metszetek gyenge, diffúz, nem-specifikus jelet adtak (11.b és 11.d ábra).



11. ábra. *In situ* hibridizációs vizsgálat ellés környéki juh tőgybioptátumából (ellés után 5 nappal). a) anti-sense, juh FcRn  $\alpha$ -lánc specifikus próba, b) sense próba (negatív kontroll), c), d) egyetlen acinus képe nagyobb nagyításon, sorrend szerint pozitív és negatív minták, a léptékvonalak 20  $\mu$ m-t jelölnek.

A szarvasmarha tüdő metszeteken erős FcRn  $\alpha$ -lánc expressziót detektáltunk a bronchiolus epithel sejtekben. Az alveolusok szintén pozitívnak bizonyultak, de nem lehetett pontosan meghatározni, hogy az endothel vagy epithel sejtek festődtek. Ezen felül elszórt, pontozott festődést figyeltünk meg az egész szöveten. A sense próbával hibridizált kontroll metszetek gyenge, nem-specifikus festődést mutattak (12. ábra).

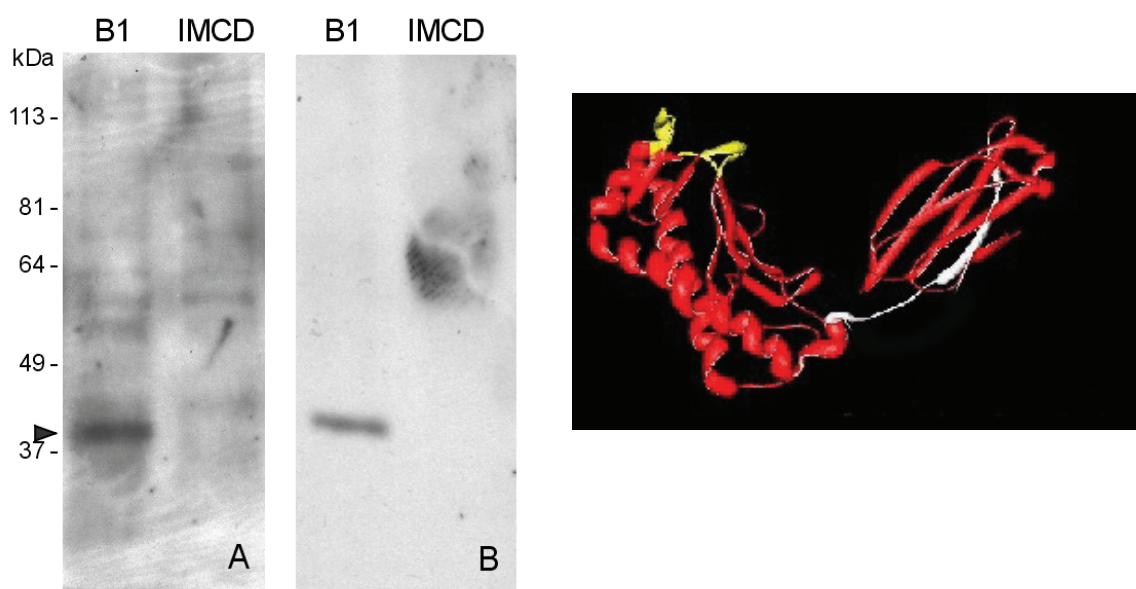


12. ábra. Digoxigeninnel jelölt, bFcRn  $\alpha$ -lánc specifikus DNS próbával végzett *in situ* hibridizáció bika tüdő metszeteken. a) anti-sense próbával hibridizált bronchiolus a tüdő metszeten, b) ugyanarról a területről

készített metszet hibridizációja sense próbával, mint negatív kontrollal. A tehenek és borjak metszetei hasonló eredményekkel szolgáltak (a képeket nem mutatjuk). Léptékvonal 20  $\mu\text{m}$ .

### 5.3. Western blot és immunhisztokémia

Az immunizáláshoz használt oligopeptid, amely az  $\alpha 2$  és  $\alpha 3$  domén egy részéből származott, azonos a szarvasmarha és a juh FcRn fehérjénél (173-186 aminosav). Az oligopeptid ellen termeltetett antiszérumot bovin FcRn plazmiddal transzfektált IMCD sejteket (B1, (KACSKOVICS et al., 2000)) felhasználva elemeztük. A B1 sejtek kivonata az FcRn  $\alpha$ -láncának megfelelő méretű, körülbelül 40 kDa moláris tömegű fehérjét tartalmazott, amelyet az anti-FcRn szérum a Western blottokon felismert. FcRn  $\alpha$ -láncot nem detektáltunk a nem-transzfektált IMCD sejteknél. Az affinitástisztítás eltávolította az összes nem-specifikus antitestet, és az FcRn molekulára nagymértékben specifikus reagenst eredményezett, amelyet az immunhisztokémiai vizsgálatokban használtunk (13. ábra).

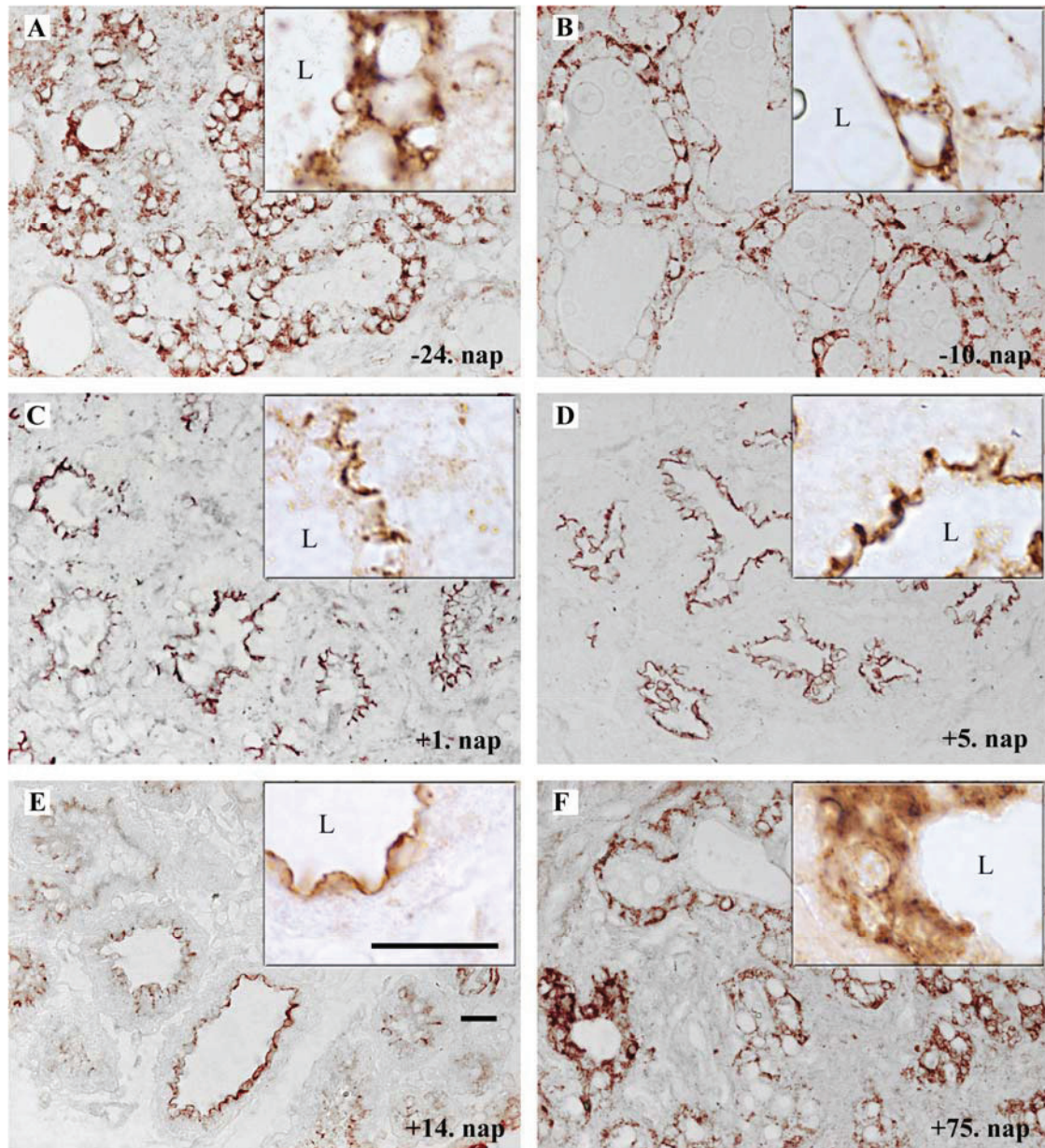


13. ábra. A neonatalis Fc receptor (FcRn) specifikus ellenanyag elemzése Western blot módszerrel. A) A CLEWKEPPSMRLKAR szekvenciájú oligopeptid (amely az  $\alpha 2$  és  $\alpha 3$  domén 173-186 aminosavának felel meg, a színes ábrán a *fehér kiemelés* mutatja) ellen termelődött antiszérum vizsgálata 500x hígításban, és B) affinitástisztítást követően, 50x hígításban. A bovin FcRn nehézlánc cDNS-sel transzfektált IMCD sejtekből (B1), és a nem-transzfektált IMCD sejtekből 1% SDS-sel készült fehérjekivonat. A nyíl a bovin FcRn nehézláncot jelzi (körülbelül 40 kDa).

Az affinitástisztított anti-FcRn nyúl szérummal kivitelezett immunhisztokémia megerősítette *in situ* hibridizációs eredményeinket. Az ellés környékén vett juh tőgybioptátumok acinus epithel sejtei jelölődtek (14. ábra), azonban jelentős különbség mutatkozott az ellés előtti és utáni festődési mintázatban. Ellés előtt 24 és 10 nappal a festődés, az FcRn  $\alpha$ -lánc egyenletes eloszlását jelezve, diffúz volt az acinus epithel sejtekben (14.A-B ábra). Ellés után 1, 5 és 14 nappal az epithel sejtek lumen felőli, apikális része festődött (14.C-D-E ábra). Az ellés után 14 nappal vett mintákat elemezve az FcRn expresszióban csökkenő tendenciát figyeltünk meg (14.E



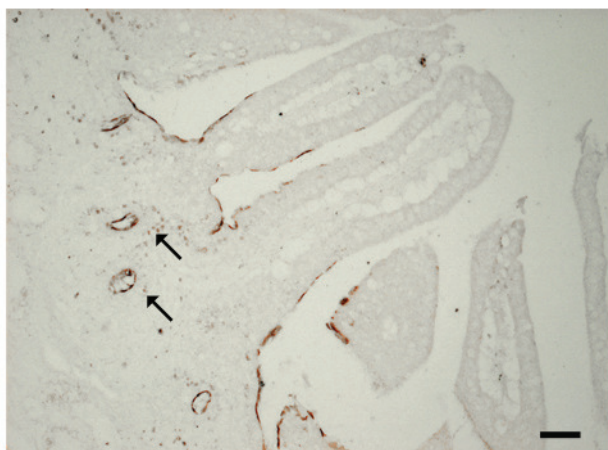
**ábra).** Ezek a metszetek gyengébb jelet mutattak néhány epithel sejt apikális részén, és olyan területekkel is bírtak, ahol az FcRn jelenlét alig volt kimutatható. Az *in situ* hibridizációval megegyezően a lamina propria endothel sejtjei vagy az izomrostok nem festődtek. Az ellés után 75 nappal (az involúció kezdetén) a citoplazmában a diffúz elrendeződés ismét megjelent (**14.F ábra**).



**14. ábra.** Az ellés körül vett juh tőgy biopátumok immunhisztokémiai elemzése. Erős diffúz FcRn expressziót detektáltunk az ellés előtt 24 (A) és 10 (B) nappal az acinus és ductus sejtekben. Az ellés után vett mintáknál – ellés után 1 nappal (C), 5 nappal (D) és 14 nappal (E) – az FcRn főleg az előbbi sejtek apikális oldalán jelent meg. 75 nappal az ellés után (F) ismét diffúz lokalizációt figyeltünk meg a citoplazmában. Az acinusok lumenét “L” betű jelöli. A léptékvonalak 20  $\mu\text{m}$ -t jelölnek (E).

Az FcRn expresszióját és lokalizációját újszülött bárány duodenumából származó mintán is vizsgáltuk. Az affinitástisztított FcRn specifikus ellenanyagot használva erős jelölődést láttunk a crypta epithel sejtek apikális részén. Ezekben a sejtekben a bazális oldalon gyengébb jelet, míg a

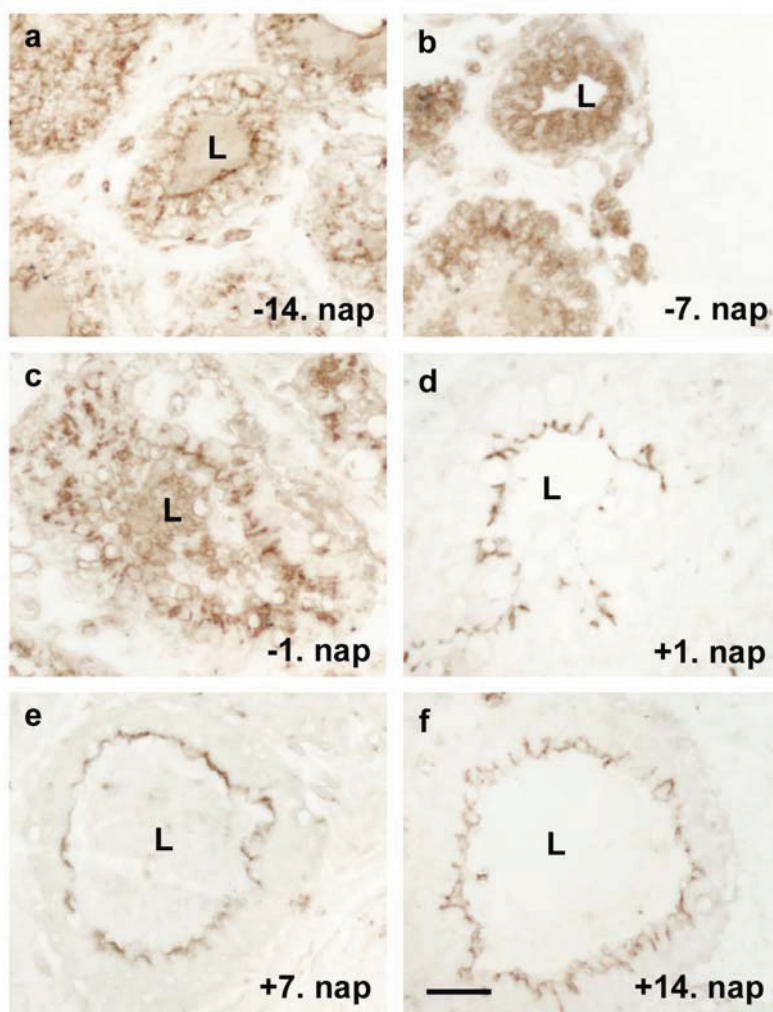
citoplazmában pontozott festődést figyelhettünk meg. Az előbbiekkal szemben az enterociták nem festődtek (15. ábra). A lamina propriában elszórt festődést tapasztaltunk.



**15. ábra.** Immunhisztokémiai elemzés. Erős apikális és gyenge bazális (nyilak) FcRn jelenlét az újszülött bárány duodenumának cryptasejtjeiben. A duodenalis enterocytákban azonban nem detektáltuk a receptort. Léptékvonal 20  $\mu$ m.

Az FcRn nehéz és könnyűlánc mRNS szintű kifejeződését a szarvasmarha tőgybiopptátumokból először RT-PCR segítségével igazoltuk az ellés előtt és az ellés után is, végig a vizsgált időszakban (ellés előtt 2 héttől az ellés után 2 hétig). Ezt követően a tőgybiopptátumok FcRn nehézlánc expresszióját immunhisztokémiai módszerrel elemeztük,

amelynek során a juhnál kapott eredményekhez hasonló festődést láttunk a metszeteken.



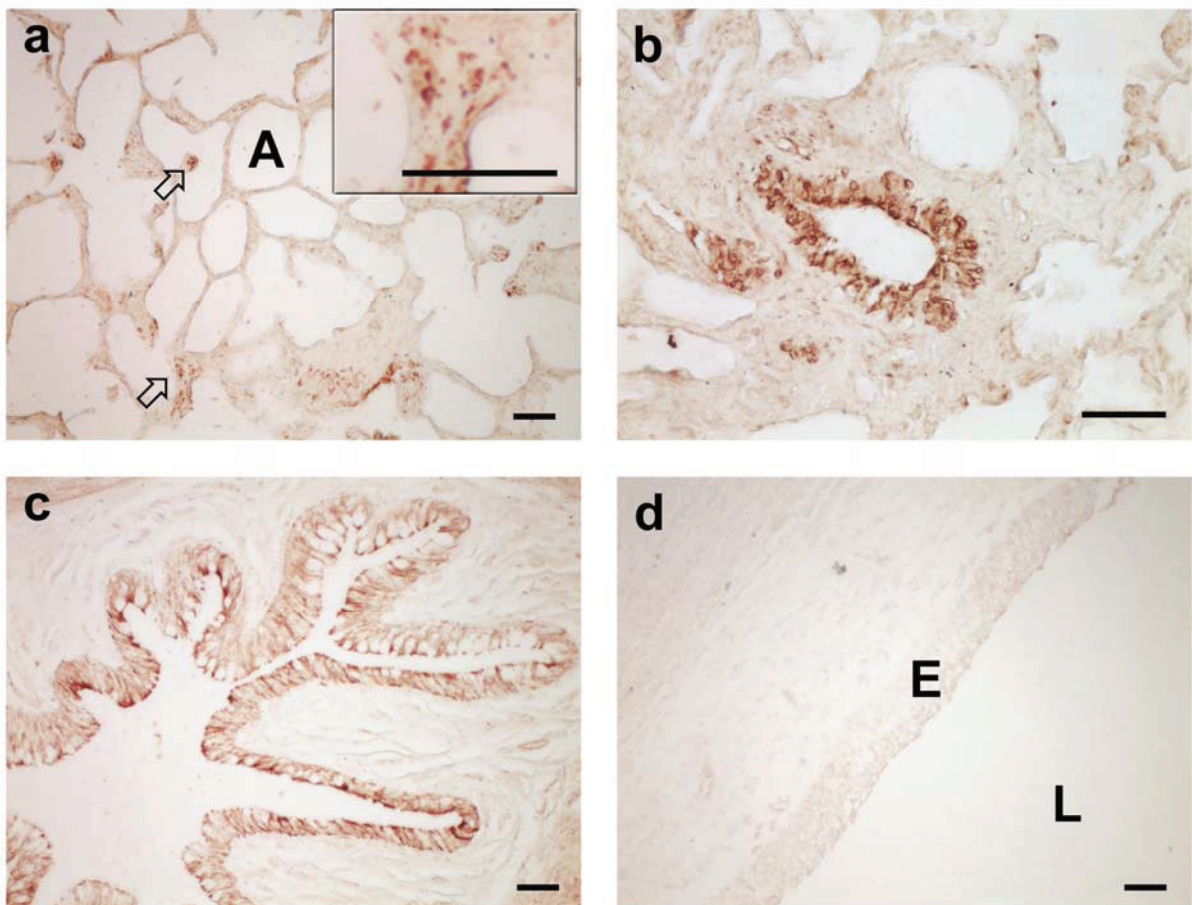
**16. ábra.** Az ellés körüli időben vett szarvasmarha tőgybiopptátumok immunhisztokémiai elemzése. Diffúz neonatalis Fc receptor expressziót detektáltunk a tőgy acinus epithel sejtjeiben ellés előtt 14 (a) és 7 (b) nappal. A diffúz és apikális festődés közötti átmeneti állapotot figyeltünk meg az ellés előtt 1 nappal (c). Apikális festődés mutatkozott az acinus epithel sejtekben az ellés napján, ellés után (d), valamint 7 (e) és 14 (f) nappal az ellés után. L, az acinusok lumene. Léptékvonal 20  $\mu$ m.

Az ellés előtti mintáknál az FcRn fehérje diffúz megoszlást mutatott az acinus epithel sejtekben (16.a-b ábra), az ellést követően (ellés napján, ellés után 1 hét és 2 hét) pedig az acinus epithel sejtek apikális

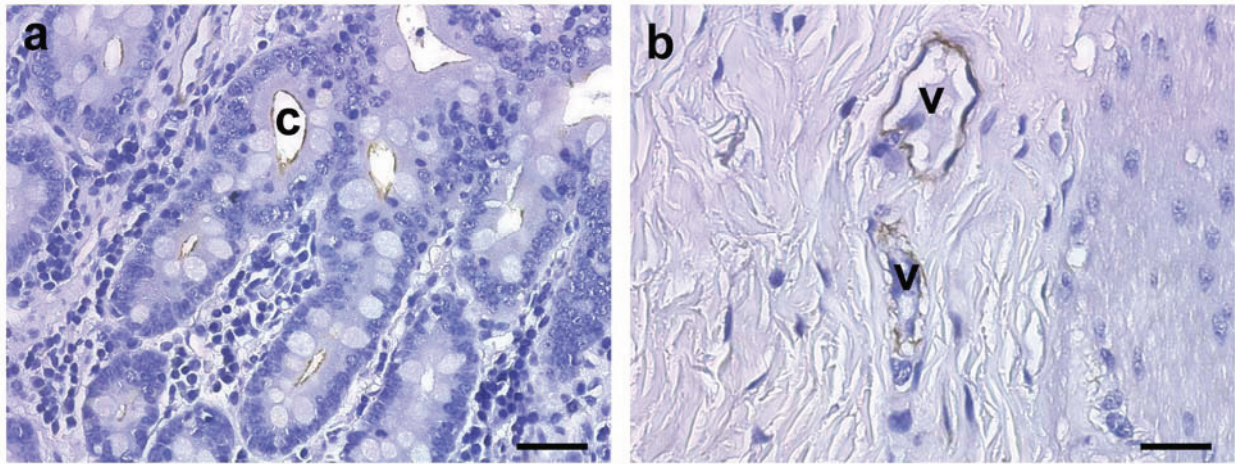
része festődött (16.d-f ábra). Involúcióban lévő tőgyet nem vizsgáltunk, de a szárazonálló vágóhídi minta szintén diffúz festődést adott az acinus epithel sejtekben.

Az ellés előtt 1 nappal a két festődési mintázat (diffúz és apikális) közötti átmeneti állapotot figyeltünk meg (**16.c ábra**). Az ellés előtti tőgymintákban az endothel sejtek gyengén jelölődtek, ellés után az endothel sejtekben nem detektáltuk a receptorfehérjét.

Az *in situ* hibridizációs eredményekkel megegyezően véletlenszerű pontozott festődést kaptunk a szarvasmarha tüdő alveolusokban (**17.a ábra**), erős jelet a bronchiolus epithelben (**17.b ábra**) és valamivel gyengébb festődést a bronchus epithel sejtekben (**17.c ábra**). A tracheát borító epithel sejtekben sem *in situ* hibridizációval, sem immunhisztokémiai módszerrel nem tudtuk FcRn expressziót kimutatni (**17.d ábra**) (MAYER et al., 2004).



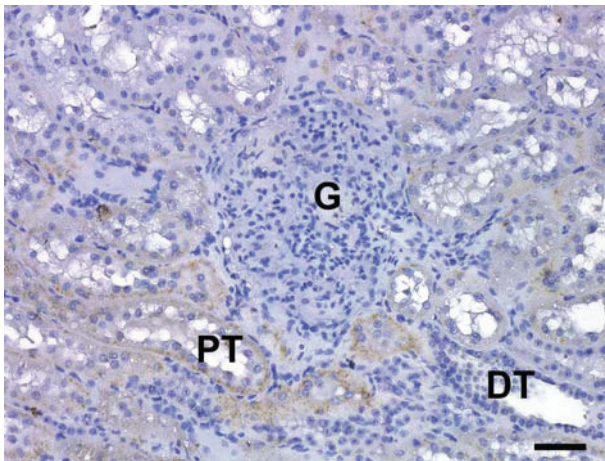
**17. ábra.** Az FcRn expresszió immunhisztokémiai lokalizációja tehén tüdő metszeteken. a) az alveolaris terület immunfestése, „A” az alveolus lumenét jelöli, a nyilak és a képzetét az alveolusok pontozott festődését mutatják; b) bronchiolus; c) bronchus; d) trachea (bikából származó metszet), „E” az epitheliális sejtréteget jelöli, „L” pedig a trachea lumenét, a léptékvonalak 20  $\mu\text{m}$ -t jelölnek.



**18. ábra.** Az FcRn nehézlánc expresszó immunhisztokémiai elemzése felnőtt szarvasmarha duodenumban. a) A duodenalis crypta (c) sejtekben apikális lokalizációt detektáltunk, b) a lamina propria kapillárisok (v) endothel rétege is festődött, a léptékvonalak 20  $\mu\text{m}$ -t jelölnek, Mayer féle hematoxylin kontrasztfestés.

A felnőtt szarvasmarha duodenum metszeteinek anti-FcRn tisztított szérummal történő immunreakciója a crypta epithel sejtek apikális festődését mutatta, a crypta különféle sejtjei nem különböztek az immunfestődés szempontjából (**18.a ábra**). Az enterociták nem festődtek. A lamina propriában található kapillárisok endothel sejtjeiben azonban kimutattuk a receptort (**18.b ábra**).

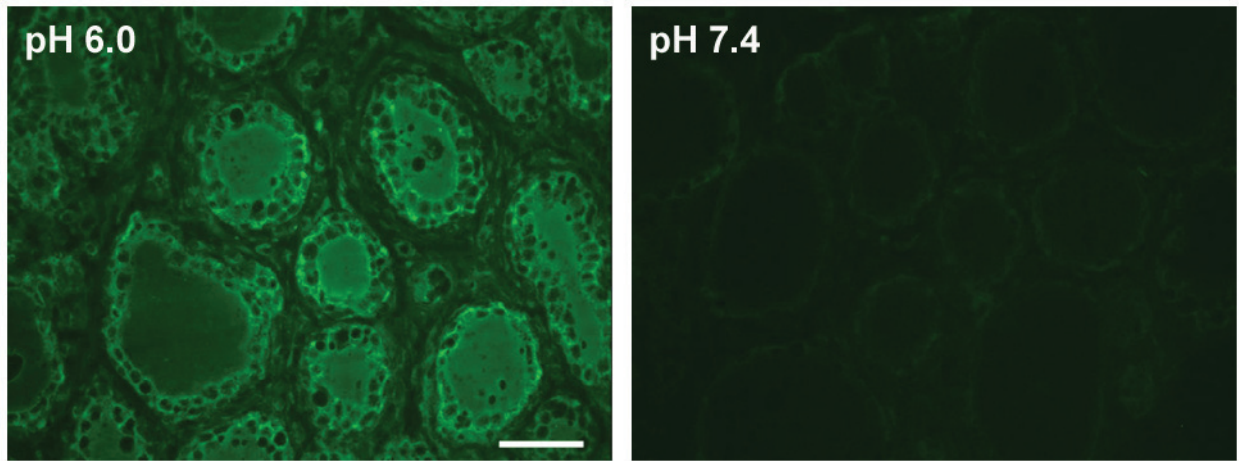
A bovin vesemintákban, a proximális tubulusok epithel sejtjeinek bazális oldalán granuláris festődés jelentkezett, tehát a sejtek bazális részén lokalizáltuk az FcRn molekulát. A glomerulusokban elszórtan gyenge nem-specifikus jelet tapasztaltunk, a medulla, az interstitium és a distális tubulusok epithel sejtjei nem festődtek (**19. ábra**).



**19. ábra.** Az FcRn  $\alpha$ -lánc immunhisztokémiai detekciója szarvasmarha vesében. A proximális tubulusok (PT) bazális részén lokalizálódott a receptor, a glomerulus (G) és a distális tubulusok (DT) nem festődtek. Mayer féle kontrasztfestés, léptékvonal 50  $\mu\text{m}$ .

#### **5.4. Az FcRn pH-függő IgG kötés vizsgálata szöveti metszeteken**

Ellés előtt egy héttel álló szarvasmarha tőgybioptátumából készítettünk paraffinos metszeteket, majd ezeken végeztük el, a mikrohullámú kezelés után a Cy<sup>TM</sup>2-vel jelölt bovin IgG kötésvizsgálatát. A kísérlet során párhuzamosan pH 6.0 és pH 7.4 értékre beállított puffereket használtunk. A tőgybioptátum acinus epithel sejtjei pH 6.0 környezetben megkötötték a jelölt bovin IgG-t, míg pH 7.4 értéken az epithel sejtek IgG kötése alig volt kimutatható (**20. ábra**) (KIS et al., 2004).



20. ábra. Cy<sup>TM</sup>2-vel jelölt bovin IgG pH-függő kötődése egy héttel az ellés előtt álló szarvasmarha tőgy metszethez. Az acinus epithel sejtek pH 6.0 kémhatáson kötik a jelölt bovin IgG molekulákat, pH 7.4 kémhatáson alig kimutatható az epithel sejtek IgG kötése, léptékvonal 50  $\mu$ m.

## 6. Megvitatás

### 6.1. A maternalis IgG transzport és a bovin FcRn $\alpha$ -lánc expressziója a tőgyben

A kérődzők nyálkahártyáinak immunvédelméhez a nyálkahártya váladékában megtalálható IgA molekulákon kívül az IgG izotípus is hozzájárul. Az IgG az IgA-hoz hasonlóan számos nyálkahártya felületre aktívan szekretálódik. A két szekretált immunglobulin osztály által meghatározott védelmi rendszerben a tőgynek kiemelt szerep jut, mert egyben a maternalis ellenanyagok (főként az IgG) kolosztrumba jutását, az anyai immunitás átadását is biztosítja. A kérődzőkben a maternalis immunitást kizárólag a kolosztrális immunglobulinok közvetítik (összefoglalóan lásd: BUTLER, 1999).

Az IgG1 és az IgG2 körülbelül azonos koncentrációban van jelen a kérődzők vérében, ennek ellenére – jelentős mennyiségben – csak az IgG1 alosztály szállítódik a vérből az alveoláris epithel sejteken keresztül a tejmirigy szekrétumába (LARSON et al., 1980). Az IgG1 alveoláris transzportja az ellés előtt hozzávetőlegesen két-három héttel válik intenzívvé, ugyanabban az időben, amikor az IgG1 koncentráció a vérben lecsökken (SASAKI et al., 1976). A tőgy epithel sejtek immunglobulin transzportját jelen munka megjelenéséig részletesen tanulmányozták. Az IgG1 transzportért felelős receptort azonban tőgyszövetben eddig még nem azonosították, bár korábbi közlemények az ellés körüli időben specifikus kötőhelyek meglétét jelezték a tőgy epithel sejteken. Azt is megállapították, hogy ellés előtt álló és laktáló tehén tőgyszövetében az IgG1 és IgG2 szöveti eloszlása eltérő. Az ellés előtt álló tőgyben az IgG1 főleg az alveoláris epithel sejtekben és a lumenben található, míg az IgG2 nagyrészt az alveolust körülvevő alapállományban. A laktáló szövetben mindkét alosztály jelenléte túlnyomóan az alapállományra korlátozódik (KEMLER et al., 1975, LEARY et al., 1982). Tőgyszövetből nyert, emésztés útján szétválasztott sejteken szintén végeztek kötés vizsgálatokat, és ezek a mirigysejtek ellés előtt inkább az IgG1 molekulát kötötték meg (SASAKI et al., 1977).

Kacskovics és munkatársai az utóbbi időben klónozták a bovin FcRn gént és Northern blottal több szövetből, köztük a tőgyből és a vékonybélből is kimutatták e gén expresszióját (KACSKOVICS et al., 2000). Annak ellenére, hogy a szarvasmarha tőgy FcRn expressziója már ismert, pontos lokalizációját eddig még nem vizsgálták.

### 6.2. A bovin FcRn $\alpha$ -lánc mRNS tőgyszöveti lokalizációja *in situ* hibridizációval

Mivel az FcRn  $\alpha$ -lánc génje epithel és endothel sejtekben is kifejeződhet, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a receptor milyen sejtekben fejeződik ki, és a sejtek melyik részén

lokalizálható. A kérdés eldöntésére először *in situ* hibridizációs módszert fejlesztettünk ki fedőlemezen fixált bFcRn transzfektált (pozitív kontroll) és nem-transzfektált IMCD sejteken (negatív kontroll) (**9. ábra**). A fenti eredmények alapján meggyőződünk arról, hogy *in situ* hibridizációs módszerünk specifikusan képes kimutatni a bovin FcRn  $\alpha$ -lánc mRNS-t. A továbbiakban optimalizáltuk a módszert szarvasmarha tőgyszöveti metszetekre, és elemeztük az FcRn génexpresszió lokalizációját. Szárazonálló tehén tőgyszöveten az FcRn  $\alpha$ -lánc mRNS expressziót az acinus és ductus epithel sejtekből mutattuk ki (**10. ábra**). Tehát megállapítottuk, hogy az FcRn a korábban már leírt, feltételezett IgG1 receptorral (SASAKI et al., 1977) megegyezően szintén a tőgy epithel sejtekben expresszálódik. A szárazonálló tőgyszövet interstitiumának pontozott jelölődése valószínűleg makrofágok festődésének köszönhető. Ezekről a sejtekről az embernél kimutatták, hogy expresszálják az FcRn gént (ZHU et al., 2001).

### **6.3. A juh FcRn $\alpha$ -lánc cDNS klónozása és az FcRn $\alpha$ -lánc mRNS tőgyszöveti lokalizációja az ellés körüli időben**

Tekintettel arra, hogy a tőgyszöveti IgG1 szekréció szorosan összefügg az elléssel, megvizsgáltuk a receptor kifejeződését az ellés környékén mRNS és fehérje szinten is. Biopsziás vizsgálataink kezdetén elsősorban gazdasági megfontolásból a kiskérődző juh fajt választottuk. Annak érdekében, hogy az *in situ* hibridizációs technikához szükséges juh FcRn nehézlánc specifikus próbát elkészítsük, klónoztuk a juh FcRn (oFcRn) nehézláncot (**7. ábra**). A várakozásnak megfelelően a receptor  $\alpha$ -lánc cDNS-ből levezetett aminosavszekvenciája magas homológiát mutatott a szarvasmarha nehézlánccal. A szarvasmarha FcRn nehézlánchoz hasonlóan az oFcRn molekulának is rövidebb citoplazmikus doménje van a patkány és humán receptorhoz viszonyítva (**8. ábra**). A juh FcRn azoknak az aminosavmaradékoknak többségével rendelkezik, amelyekről ismert, hogy a patkánynál részt vesznek az Fc-fragmentumhoz való kötődésben (MARTIN et al., 2001).

A juh tőgy *in situ* hibridizációs elemzésénél kapott előzetes eredmények alapján feltételeztük, hogy a receptor expressziója az acinus sejtekben időben változik (MAYER et al., 2002a). Ezért előzetes eredményeinket további ellés körüli időben vett tőgybiopsziák elemzésével támasztottuk alá. A juh tőgybiopsziák vizsgálatában minden mintánál, az ellés előtt és az ellés után is az FcRn nehézlánc mRNS-t kizárólag az acinus és ductus sejtekben detektáltuk, és az expresszió szintjében nem tapasztaltunk jelentős különbségeket (**11. ábra**).

#### **6.4. Az FcRn $\alpha$ -lánc fehérje szintű lokalizációja a tőgybioptátumokban az ellés körüli időben és a tőgyzövet pH-függő IgG kötése**

Az FcRn génexpresszió fehérjeszintű tanulmányozásához az FcRn nehézlánc egy konzervatív szakasza (173-186 aminosav) ellen nyúlban ellenanyagot termeltettünk. A konzervatív szakasz aminosavsorrendje a szarvasmarhánál és a juhnál megegyezett, így az antiszérum mindkét állat FcRn nehézláncát felismerte. A szérumban lévő nem-specifikus antitesteket affinitás-tisztítással távolítottuk el, és a további immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a tisztított szérumot használtuk (**13. ábra**).

A juh tőgybioptátumokon végzett immunhisztokémiai elemzés azt mutatta, hogy az acinusok és ductusok epithel sejteinek citoplazmája az ellés előtt egyöntetűen festődött, azonban az ellés után határozott különbséget figyeltünk meg a jel mintázatában. A jelölődés az FcRn  $\alpha$ -lánc egyenlőtlen eloszlását jelezte az epithel sejtekben 1 és 5 nappal az ellés után, mivel az epithel sejtek apikális része festődött. Az ellés után 14 nappal a jel gyenge volt, mindazonáltal még mindig a sejtek apikális szélén helyezkedett el (**14. ábra**) (MAYER et al., 2002b).

A juhnál kapott eredményekkel megegyezően a receptorfehérje acinus epithel sejten belüli eloszlásának megváltozását tapasztaltuk az ellés napján (ellést követően) és az ellés után 1 és 2 héttel vett szarvasmarha tőgybioptátumokból készített metszeteken is. Az ellés előtt 1 és 2 héttel gyenge immunfestődést figyeltünk meg a szarvasmarha tőgy kapilláris endothel sejteiben (**16. ábra**). Az FcRn jelenléte az endothel sejtekben kismértékben hozzájárulhat a vérből az epithel sejtek felé irányuló, ellés előtti IgG transzferhez, azonban a receptor hiánya nem jelenthet korlátozó tényezőt az IgG transzport szempontjából, mert az interstitiumban kimutatták mindkét IgG alosztályt (IgG1 és IgG2) a laktáció idején (LEARY et al., 1982), amikor nem találtunk FcRn expressziót a kapillárisokban.

A lokalizációs vizsgálatokon felül szarvasmarha tőgyzöveti metszeten sikerült kimutatnunk a Cy2-vel jelölt szarvasmarha IgG pH-dependens kötődését, vagyis a jelölt IgG pH 6.0 kémhatáson kötődött az acinus epithel sejtekhez, pH 7.4 kémhatáson azonban nem kötődött (**20. ábra**). A pH-függő IgG kötés az FcRn molekulára jellemző (GHETIE és WARD, 2000). A kötés az ellés előtt detektált FcRn lokalizációhoz hasonlóan diffúz volt, vagyis az IgG vélhetően az FcRn molekulához kötődött.

#### **6.5. Az FcRn feltételezett szerepe a tőgyben**

Ezen adatok alapján azt feltételezzük, hogy a kérődzők tőgyében lévő FcRn szelektíven megköti az IgG1-et az acinus epithel sejt bazális oldalán, és azt a lumenális oldalra szállítja biztosítván a kolosztrum, és később, ugyan jóval kisebb mértékben, de a tej IgG1 tartalmát is. Hipotézisünk azonban ellentétben áll a laktáló egér tejmirigyben jelenlévő egér FcRn



feltételezett szerepével. Cianga és munkatársai a receptort szintén az acinusok epithel sejtjeiben lokalizálták, de az FcRn-hez nagyobb affinitással kötődő IgG alosztályok kisebb mértékben szállítottak a tejbe. Ez a megállapítás azt sugallja, hogy a laktáló tejmirigyben lévő FcRn a szekréció helyett inkább a visszaforgatásban (recycling) játszik szerepet, a tejmirigyből a keringésbe visszajuttatva az IgG-t (CIANGA et al., 1999).

Az egér modellel szemben mi azt feltételezzük, hogy a kérődző FcRn az IgG1-et a lumenbe transzportálja, és valószínűleg nem érintett az IgG2 keringésbe történő visszaforgatásában. A receptornak az előbbieket szerint legalább két feltételnek kell eleget tennie: 1) a transzportban és/vagy a kötési folyamatban az IgG1-hez kell nagyobb affinitást mutatnia, és 2) bazolaterális-apikális irányú IgG transzportot kell közvetítenie az előbb említett sejtekben. Mivel a korábbi közlemények az IgG1-et és nem az IgG2-t jelzik a tőgy acinus sejtekben (SASAKI et al., 1977, LEARY et al., 1982), ahol az FcRn jelenlétét kimutattuk, azt feltételezzük, hogy a kérődző FcRn minden valószínűség szerint inkább az IgG1-et köti meg. Eme indirekt bizonyíték mellett, nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt sem, hogy a probléma megoldása szempontjából döntő fontosságú lenne a receptor IgG1 és IgG2 alosztályokhoz való affinitásának elemzése. Laboratóriumunkban jelenleg a fenti kérdés megválaszolására *in vitro* IgG1 és IgG2 kötés és transzport kísérleteket végzünk bFcRn transzfektált MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney, szarvasmarha vesehámsejtvonal) sejteken.

Ami a második feltételt illeti, néhány közleményben számottevő bazolaterális-apikális irányú transzportról számoltak be humán bélhámsejtekben (DICKINSON et al., 1999, SCHLACHETZKI et al., 2002), a vese proximális tubulus epithel sejtjeiben (KOBAYASHI et al., 2002) vagy patkány vesehám sejtekben (MCCARTHY et al., 2001). Ezenkívül a kérődző FcRn citoplazmikus régiója a patkány és emberi homológhoz képest tíz aminosavval rövidebb (**8. ábra**), amiből arra lehetne következtetni, hogy a kérődzőknél ennek a szakasznak a hiánya vezet a transzport jellemzően bazolaterális-apikális irányultságához, ezt azonban kísérletekkel még nem igazolták. A kérődzők FcRn molekulája tartalmazza a patkány FcRn elemzése során leírt 313. foszforilálható szerint (a szarvasmarha FcRn nehézlánc szekvenciájában ez a 310. aminosavmaradéknak felel meg), amelynek azonban a patkány vesehámsejt modellben az ellenkező irányú apikális-bazolaterális transzcitózisban van szerepe. A patkány FcRn endocitózishoz szükséges dileucin (DXXXLL<sup>4</sup>) és triptofán motívuma (WU és SIMISTER, 2001) kérődzőkben is megtalálható, azonban a triptofán motívum második és negyedik aminosava eltérő (szarvasmarha, juh: WISF<sup>5</sup>, **8. ábra**), és a korábban már leírt WXXF szekvenciának felel meg. A patkány triptofán motívum (WLSL) funkcionálisan különbözik a

---

<sup>4</sup> D: aszparaginsav, X: bármely aminosav, L: leucin

<sup>5</sup> W: triptofán, I: izoleucin, S: szerin, F: fenilalanin

WXXF motívumtól, mert az AP-2 (adaptor protein-2) adaptor komplex  $\mu 2$  alegységéhez kötődik szemben a WXXF motívummal, amely az AP-2  $\alpha$ -adaptin és  $\mu 2$  alegységéhez egyaránt kötődik.

*Megjegyzendő, hogy az AP-2 egy tetramer komplex, amely a citoplazmában található vezikulák külső klatrin fehérjéihez kapcsolja az endocitózis során a vezikulába került endocitózis szignállal rendelkező transzmembrán molekulák külső, a membránból kifelé „néző”, citoplazmikus részét.*

Mivel a plazmamembránban lévő FcRn közvetett módon, endocitózissal is bekerülhet a korai endoszómákba (emellett létezhet közvetlen út is a transz-Golgi hálózaton keresztül), ahol az IgG molekulát köti, ezért a triptofán alapú és dileucin endocitózis szignálok feltehetően valamennyi FcRn-t kifejező sejtben fontos szerepet játszanak, nemcsak azokban, amelyek a sejtfelszínen kötik az IgG molekulát (WERNICK et al., 2004). A kérődzők FcRn receptorának citoplazmikus részén található triptofán tartalmú motívum tehát különbözik a patkány FcRn megfelelő szekvenciájától. Ezért a motívum és a szintén eltérő rövidebb citoplazmikus domén pontos szerepének tisztázása a transzport folyamatban vagy az endocitózisban további vizsgálatokat igényel.

Adataink azt is mutatják, hogy a növekvő laktogénikus aktivitással és a csökkenő IgG1 szekrécióval párhuzamosan az FcRn nehézlánc transzkripciója, ha egyáltalán csökken, nem csökken le jelentősen. Adataink összhangban állnak azzal a tanulmánnyal, amely az FcRn mRNS konstans szintjét állapítja meg a szarvasmarha tőgyben végig a laktáció során, amíg a növekvő  $\beta 2$ -mikroglobulin mRNS szint a tőgyben a tejbe irányuló aktív IgG transzfer idejével korrelál (ADAMSKI et al., 2000). Immunhisztokémiai eredményeink az ellés után, a tőgyepithel sejtek citoplazmájában nem mutatták ki a receptor nehézláncának jelenlétét. Annak ismeretében, hogy az *in situ* hibridizáció nem mutatott lényeges eltérést az mRNS szintben, feltételezhető, hogy a tőgyben az FcRn nehézlánc génextpresszió elsősorban a transláció szintjén szabályzott, és a translálódó fehérje mennyisége az ellés után a citoplazmában lecsökken. Ezenkívül a receptor működése szempontjából valószínűleg meghatározó lehet a  $\beta 2$ -mikroglobulin expresszió emelkedése az IgG transzfer idején, mert a humán FcRn-nel kapcsolatban kimutatták, hogy az  $\alpha$ -láncal együtt a  $\beta 2$ -mikroglobulin ko-expressziója is szükséges a receptor megfelelő éréséhez és a funkciójának biztosításához (PRAETOR és HUNZIKER, 2002).

## **6.6. Az FcRn $\alpha$ -lánc expressziója a vékonybélben**

A kolosztrum felvételével az immunglobulinok a bélhámon keresztül az újszülött vérébe kerülnek. Az újszülött állatok vékonybeléből valamennyi makromolekula nem-specifikusan abszorbeálódik a születés után az első 12 órában. Az enterociták azon képessége, hogy az immunglobulinokat pinocytosissal fölvegyék 12 óra elteltével gyorsan lecsökken, és a 18-24

órában teljesen megszűnik (“gut closure”). Az ehhez a folyamathoz vezető pontos mechanizmus ismeretlen, valószínűleg a lizoszómális rendszer érése a felelős (BUTLER, 1999). A bélben lezajló, nem-specifikus folyamattal szemben, a felvett IgG1 nagy része specifikus módon, visszakerül a fiatal kérődzők vékonybél lumenébe (NEWBY és BOURNE, 1976a, BESSER et al., 1988b). Ez a crypta epithel sejtek által közvetített transzport hozzájárul a bél nyálkahártya fertőzés elleni immunvédelméhez (BESSER et al., 1988a).

Az IgG1 dominanciája a nyálkahártya váladékban alátámasztja azt az elképzelést, amely szerint kérődzőkben az IgG1 speciális szerepet tölt be a nyálkahártya immunvédelmében (BUTLER, 1983). Magyarozatképpen szolgálhat az a tény, hogy az IgG1, az IgA-hoz hasonlóan jobban ellenáll a proteolízisnek, mint az IgG2 (NEWBY és BOURNE, 1976b). Borjak vékonybelének immunglobulinjait vizsgálva, az IgG1 meghaladta az IgA mennyiségét a szekrétumban. A crypta epithel sejteken keresztül zajló IgG1 transzportot már korábban igazolták, mivel az IgG1-et a crypta sejtek apikális részén detektálták (NEWBY és BOURNE, 1976a). Az újszülött báránnyal kapcsolatos vizsgálatainkban azt találtuk, hogy az FcRn a crypta sejtekben expresszálódik, és főleg az apikális részen lokalizálódik (**15. ábra**). Feltételezésünk szerint ez az a receptor, amely a transzport folyamatban részt vesz. A korábbi elképzelésnek megfelelően, amely nem-specifikusnak jellemzi a kolosztrális IgG felszívódást, nem tudtuk kimutatni az FcRn jelenlétét az enterocitákban. A vékonybél lamina propria elszórt festődését valószínűleg intestinalis makrofágok FcRn expressziója okozta (ZHU et al., 2001).

Az előbbi eredményeket alátámasztja felnőtt szarvasmarha vékonybél metszeteinek immunhisztológiai elemzése, amely során a crypta epithel sejtekből kimutattuk az FcRn expressziót (**18.a ábra**), de az enterociták nem festődtek.

Az FcRn szerepe szopós egerek és patkányok vékonybelében jól ismert (JUNGHANS, 1997). Rágcsálókban az intestinalis epithel sejtekben (enterocitákban) az FcRn expressziós szintje magas, és a géntermék a kolosztrális IgG receptor mediált transzcitózisában vesz részt. A bélben az FcRn expresszió az újszülött rágcsáló fejlődése során lecsökken, majd az elválasztás idejére majdnem teljesen eltűnik (BERRYMAN és RODEWALD, 1995, GHETIE et al., 1996, MARTIN et al., 1997). Az FcRn-t humán intestinalis epithel sejteken immunhisztokémiával detektálták, amely erős jelet mutatott a sejtek apikális (lumenális) részén (ISRAEL et al., 1997). Újabban Dickinson és munkatársai leírták, hogy az FcRn felnőtt vékonybélben nemcsak az enterocitákban, hanem crypta epithel sejtekben is kifejeződik. Mindkét sejtípusban az apikális részen fordult elő a receptor. Azt is kimutatták, hogy az FcRn a polarizált humán intestinalis T84 sejtvonalnál kétirányú IgG transzportot közvetít, uralkodóan bazolaterális-apikális irányú transzporttal (DICKINSON et al., 1999). Az előbbi megállapítások felvetették a lehetőségét annak, hogy az FcRn a felnőtt vékonybél epitheliumon keresztül IgG-t szállít, és fontos szerepet

tölt be az immunfelismerésben. Az utóbbi időben igazolták, hogy a humán FcRn az IgG molekulákat az epithel sejteken keresztül a bél lumenébe szállítja, ahol azok a jelenlévő antigénekhez kötődnek. Ezt követően az immunkomplexeket a receptor visszaforgatja a lamina propriába a dendritikus sejtek számára, amelyek az immunkomplexeket feldolgozzák, és a CD4+ T sejteknek bemutatják (YOSHIDA et al., 2004).

Az FcRn jelenléte a tőgy acinus és ductus epithel sejtjeiben és az eloszlásában bekövetkező nyilvánvaló változás az ellés előtt és után azt sejteti, hogy az FcRn fontos szerepet játszik az IgG transzportban a kolosztrumképzés idején. Hipotézisünket az a tény is alátámasztja, hogy FcRn expressziót találtunk az újszülött bárány és felnőtt szarvasmarha duodenum crypta sejtjeiben, amelyekről már újszülött borjak esetén leírtak IgG1 szekréción.

### **6.7. Az FcRn $\alpha$ -lánc expressziója az alsó légutakban**

A vékonybél mellett, az újszülött borjakban az anyai immunglobulinok a légutakban is megjelennek, és hozzájárulnak a nyálkahártya helyi immunvédelméhez (BELKNAP et al., 1991). Az IgG1 aránya az életkorral fokozatosan csökken a szekrétumban az IgA javára, de még a kifejlett állatoknál is az IgG1 a meghatározó az alsó bronchoalveoláris régióban (WILKIE, 1982). Vizsgálatainkban más fajoknál tapasztaltakhoz (SPIEKERMANN et al., 2002) hasonlóan megállapítottuk, hogy az FcRn az alsó légutak és a tüdő alveolusok hámsejtjeiben expresszálódik, ahol a szekrétumban IgG túlsúly jellemző. Az alveoláris régióban tapasztalt pontozott festődés valószínűleg makrofágok FcRn expressziójától eredeztethető (ZHU et al., 2001). A légutak felső szakaszában az IgA a meghatározó izotípus, és ennek megfelelően a trachea epithel rétegéből nem tudtunk FcRn expressziót kimutatni (**17. ábra**). A bronchoalveoláris rendszerben kifejeződő FcRn szerepére vonatkozóan Spiekermann és munkatársai újabban kimutatták egy bioaktív Fc-fúziós fehérje FcRn függő *in vivo* felvételét egérben. Bár nem vizsgálták az FcRn szerepét az IgG lumen irányú szekréción, azt feltételezték, hogy az FcRn dinamikus egyensúlyt tart fenn a nyálkahártyát határoló sejtrétegen keresztüli IgG transzportban (SPIEKERMANN et al., 2002). A legújabb kutatások igazolták az FcRn expresszióját patkány alveoláris epithel sejtekben, és a sejteken keresztül biotinilált patkány IgG kétirányú transzportját írták le, amely telíthető és jelöletlen Fc felesleg hozzáadásával gátolható volt. Eredményeikből arra következtettek, hogy az alveoláris epithel sejteken keresztüli IgG transzcitózist az FcRn közvetíti. Feltételezésük szerint az IgG sejtek melletti passzív diffúziója fiziológias körülmények között nem az elsődleges útja az IgG szekrétumba jutásának (KIM és MALIK, 2003).

Feltételezésünk szerint a szarvasmarha FcRn biztosítja az alsó bronchoalveoláris régióban az IgG dominanciáját. Szállító receptorként szerepe lehet az immunvédelemben vagy az immunfelismerésben, esetleg mindkettőben.

### **6.8. A kérődzők epithel sejtjeiben kifejeződő FcRn feltételezett szerepe**

A kérődzők epithel sejtjeiben kifejeződő FcRn a tejmirigyre (10., 11., 14. és 16. ábra), a vékonybélre (15. és 18.a ábra) és a tüdőre (12. és 17. ábra) vonatkozó adataink alapján tehát szelektíven köti és/vagy transzportálja a lumenbe az IgG1-et, amely a nyálkahártya helyi immunvédelméhez járul hozzá. Szarvasmarhánál az IgG1 általánosan megtalálható a nyál- és könnymirigy váladékában, valamint a vékonybelet, vastagbelet, tüdőt és az ivari- és kiválasztószerveket bélelő nyálkahártya szekrétumában (összefoglalóan lásd: BUTLER, 1983). Az előbb említett nyálkahártya felszínre történő IgG transzport mechanizmusa jelenleg nem ismert, mi azonban, az itt leírtak alapján, azt feltételezzük, hogy a folyamat FcRn által közvetített.

### **6.9. Az FcRn $\alpha$ -lánc expressziója szarvasmarha endothel sejtekben**

Az FcRn receptor nemcsak az IgG epithel sejteken keresztül történő transzportjában, hanem az IgG katabolizmusában is szerepet játszik, a katabolizmus helyszíne az egerben végzett vizsgálatok szerint elsősorban, de nem kizárólagosan a bőr-, az izom-, valamint a máj- és zsírszövet kapillárisainak endothel rétege (BORVAK et al., 1998). Mivel az FcRn expresszió eger és emberi endothel sejtekben is igazolt (BORVAK et al., 1998, WARD et al., 2003), immunhisztokémiai módszerrel megvizsgáltuk a szarvasmarha endothel sejteket, és a vékonybél lamina propria kapilláris endothel sejtjeiből kimutattuk a receptor expresszióját (a szarvasmarha bőr kapilláris endothel sejtjeinek elemzése folyamatban van).

Jelenleg *in vivo* funkcionális elemzéseket végzünk szarvasmarhában, amelyekben azt vizsgáljuk, hogy az endothel sejtekben jelen lévő FcRn-nek mi a szerepe.

### **6.10. Az FcRn $\alpha$ -lánc expressziója szarvasmarha vesében**

Az IgG metabolizmus szempontjából fontos szerepet tölthet be a vesében zajló reabszorpciós folyamat, mert a glomeruláris filtrátumba a többi fehérje mellett az IgG, viszonylag nagy molekula tömege (150 kDa) ellenére, is bekerülhet. A filtrátum napi jelentős mennyiségét tekintve (emberben körülbelül 180 liter/nap) ez számottevő IgG veszteséget jelentene, amennyiben az IgG a vizelettel távozna. A filtrált fehérjék visszaszívódása általánosan a proximális tubulushám kefeszegélyén, pinocytosissal történik. A humán vese glomeruláris epithel sejtjeiben és a proximális tubulusok epithel sejtjeinek kefeszegélyében kimutatták az FcRn expressziót. Proximális tubulus eredetű hámsejtvonalon az IgG transzcelluláris

transzportját is leírták. Következtetések szerint a vesében expresszálódó FcRn a szűrletbe kis mennyiségben bekerülő IgG molekulákat megköti, és visszajuttatja azokat a vérkeringésbe, megakadályozva a szervezetből való kiürülést (HAYMANN et al., 2000, KOBAYASHI et al., 2002). Korábban, Northern blottal már kimutatták az FcRn expressziót MDBK (szarvasmarha vesehámsejt) sejtekből (KACSKOVICS et al., 2000), ennek megfelelően a proximális tubulus epithel sejtek bazális oldalán detektáltuk a receptort, a glomerulusok azonban az immunfestődés szempontjából negatívnak bizonyultak. Annak ellenére, hogy a proximális tubulus epithel sejteken belül a receptor lokalizációja a humán sejtektől eltérő, a funkciója feltehetően a humán FcRn-nel megegyezően az IgG szűrletből a keringésbe történő visszaforgatása, mivel a szarvasmarha vizelet is csak nyomokban tartalmaz IgG molekulákat (**I. táblázat**).

### **6.11. Az FcRn génexpresszió szabályozásának elméleti lehetősége és jelentősége**

Eredményeink mellett az FcRn expresszió különböző szövetekben jellemző lokalizációját számos publikációban ismertették (lásd a **2.6.-2.15.** fejezeteket). A génexpresszió lokalizációját leíró morfológiai adatokból csak megfelelő körültekintéssel lehet az FcRn funkciójára vonatkozó következtetéseket levonni, de ezek a közlemények kiindulópontul szolgálhatnak a későbbi funkcionális vagy az expresszió szintjének változását, illetve az expresszió szabályozását vizsgáló kutatásokban.

PhD dolgozatom zárásaként a génexpresszió szabályozásával kapcsolatos legújabb eredményeket foglalom össze röviden, és némi kitekintést nyújtok e szabályozás befolyásolásának jelentőségére a gyógyászatban.

Az FcRn expresszió szabályozásáról eddig viszonylag kevés ismeretanyag áll rendelkezésre. Az egér FcRn nehézlánc proximális promoter elemzésénél egy Sp1 (GT box)<sup>6</sup> és egy Ets<sup>7</sup> kötőhelyet találtak, amelyekhez kötődve a transzkripciós faktorok a promoter alapaktivitását szabályozzák. Ezekon kívül az NF-1<sup>8</sup> motívumhoz kapcsolódó transzkripciós faktor felnőtt állatok enterocitáiban az NF-1, de újszülöttekben egy ettől eltérő fehérje, amely vélhetően az újszülött egér bélhámsejtek magas FcRn génexpressziós aktivitásáért felelős (TIWARI és JUNGHANS, 2005). A patkány FcRn  $\alpha$ -lánc gén előtt található rövid szakaszon (minimál promoter) öt Sp családba tartozó fehérjét kötő hely található, ez a szakasz bélhámsejtekbe transzfektálva promoter aktivitást mutat (JIANG et al., 2004).

A humán és az erszényes rókakuzu FcRn nehézlánc promoter elemzésénél is találtak transzkripciós faktor (a fenti sorrendben Sp1, AP1<sup>9</sup> és Sp1, AP1, NF-IL-6<sup>10</sup>, STAT5<sup>11</sup>) kötő

---

<sup>6</sup> konstitutív transzkripciót biztosító transzkripciós faktor

<sup>7</sup> az ets gén terméke, transzkripciós faktor

<sup>8</sup> nuclear factor-1

<sup>9</sup> activator protein 1

<sup>10</sup> nuclear factor-interleukin-6

helyeket (MIKULSKA és SIMISTER, 2000, WESTERN et al., 2003). Munkacsoportunk szintén elkezdte a bovin FcRn nehézlánc promotorszakaszának elemzését. A transzkripció faktor kötő hely adatbázisok segítségével végzett elemzések során az előbbi kötő helyekhez hasonló, a felsoroltakkal egyező, illetve néhány esetben attól eltérő kötő helyeket találtunk.

Az FcRn génexpresszió szabályozásának pontosabb ismerete és befolyásolása nemcsak az alap kutatás szempontjából érdekes, hanem az emberi gyógyászat számára is sokféle lehetőséget adhat. Például a humán FcRn IgG homeosztázisban betöltött szerepének gátlásával, és ezzel a patogén IgG szint csökkentésével autoimmun betegségeket lehetne kezelni. Ellenkező esetben antitumor antitestek felezési idejének meghosszabbításával hatékonyabb tumorölő hatást lehetne elérni. Az FcRn epithel sejteken keresztüli transzport funkcióját vakcina antigének (immunkomplexek) felvételére lehetne használni az epithel sejtrétegen keresztül, amely egyébként makromolekulák számára átjárhatatlan.

Amennyiben a szarvasmarha FcRn ténylegesen az IgG1 szekréción működik közre, az expresszió szabályozásának megértésével lehetőség nyílna az IgG szekréció befolyásolására a nyálkahártya szekrétumokba. Különösen a kolosztrumba irányuló IgG1 szekréció idejének megnyújtása lenne előnyös a borjak egészségvédelme szempontjából. Egy folyamatosan kolosztrumot termelő, „immunglobulin gyárként” működő genetikailag módosított tehén immunizálását követően a kolosztrumban nagy mennyiségben megjelenő antigénspecifikus bovin immunglobulinokat a humán per os gyógykezelésben (gyomor- és bélfertőzések ellen) lehetne alkalmazni. Újabban egy japán kutatócsoport transzkromoszómális szarvasmarhákat állított elő, amelyek genetikai állománya humán Ig géneket tartalmaz. A transzkromoszómális klónozott borjak véréből sikerült kimutatni a termelődő humán Ig-t. Ez az első lépés a nagy mennyiségű humán poliklonális ellenanyag előállítására vezető úton (KUROIWA et al., 2002). Saját még nem publikált vizsgálataink szerint a humán IgG erősebben kötődik a bovin FcRn-hez, mint a bovin IgG. A normál és transzkromoszómális borjak vérkeringésébe fecskendezett humán IgG felezési ideje pedig hosszabb, mint a szarvasmarha IgG felezési ideje. Jelenleg nem ismert, hogy a transzkromoszómális szarvasmarhában expresszálandó humán Ig-ok megjelennek-e a kolosztrumban, de vizsgálatuk feltétlenül indokolt.

Az FcRn génexpressziójának és a receptor sejten belüli lokalizációjának szabályozása feltételezhetően bonyolult, összetett folyamat. A jövőbeli kutatások során, a részletek pontos megismerése és az Ig transzport befolyásolása révén elképzelhető nagy mennyiségű állati eredetű Ig vagy transzgenikus állatban termelt humán Ig előállítása állatorvoslási célból, illetve az immunhiányos betegek gyógyítása céljából.

---

<sup>11</sup> signal transducer and activator of transcription 5

## 7. Új tudományos eredmények

1. *In situ* hibridizációs módszerrel szárazonálló tehén tőgy acinus és ductus sejtjeiből mutattuk ki az FcRn  $\alpha$ -lánc mRNS-t.
2. Klónoztuk és karakterizáltuk a juh FcRn  $\alpha$ -lánc cDNS-t.
3. Vemhes anyajuhokból tőgybióptátumokat vettünk az ellés körüli időben, és az előkészített metszeteken *in situ* hibridizációt végeztünk a juh FcRn-re specifikus cDNS próbával. Az FcRn  $\alpha$ -lánc mRNS-t kizárólag az IgG1 transzportért felelős acinus és ductus sejtjeiből tudtuk kimutatni. Az expressziós szintben nem tapasztaltunk lényeges eltérést az ellés előtti és ellés utáni mintáknál.
4. *In situ* hibridizációs eredményeinket immunhisztokémiával erősítettük meg, a receptor fehérjét szintén az acinus és ductus sejtjeiben 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 sejtjeiből is, amelyekről újszülött borjakban leírták, hogy IgG1-et szekretálnak a vékonybél lumenébe.
6. Egy újabb biopsziás vizsgálatsorozattal igazoltuk, hogy szarvasmarhában a tőgy acinus sejtjeiben jelen lévő FcRn szintén a juhnál megfigyelt sejten belüli lokalizáció-változást mutatja az ellés körüli időben.
7. Az ellés előtt gyűjtött szöveti metszeten igazoltuk a tehén tőgy acinus sejtek pH-függő IgG kötését.
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 sejtjeiben sem *in situ* hibridizációval sem immunhisztokémiával nem tudtuk a receptor jelenlétét detektálni.
9. Immunhisztokémiai módszerrel kimutattuk a szarvasmarha vékonybél lamina propria kapilláris endothel sejtjeiben és a vese proximális tubulus epithel sejtjeiben az FcRn nehézlánc expresszióját.



## 8. Irodalom

- ADAMSKI, F. M., KING, A. T., DEMMER, J.: Expression of the Fc receptor in the mammary gland during lactation in the marsupial *Trichosurus vulpecula* (brush-tail possum). In: *Mol Immunol*, 2000. 37. p. 435-444.
- AHOUSE, J. J., HAGERMAN, C. L., MITTAL, P., GILBERT, D. J., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., SIMISTER, N. E.: Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC. In: *J Immunol*, 1993. 151. p. 6076-6088.
- ALLEN, W. D., PORTER, P.: Localization of immunoglobulins in intestinal mucosa and the production of secretory antibodies in response to intraluminal administration of bacterial antigens in the preruminant calf. In: *Clin Exp Immunol*, 1975. 21. p. 407-418.
- ANDERSON, M., ANDREWS, A. T.: Progressive changes in individual milk protein concentrations associated with high somatic cell counts. In: *J Dairy Res*, 1977. 44. p. 223-235.
- ARUN, S. S., BREUER, W., HERMANN, W.: Immunohistochemical examination of light-chain expression ( $\lambda/\kappa$  ratio) in canine, feline, equine, bovine and porcine plasma cells. In: *Zentralbl Veterinarmed A*, 1996. 43. p. 573-576.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. 1989. Current protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley, New York.
- BAILEY, L. F., MCLENNAN, M. W., MCLEAN, D. M., HARTFORD, P. R., MUNRO, G. L.: The use of dexamethasone trimethylacetate to advance parturition in dairy cows. In: *Aust Vet J*, 1973. 49. p. 567-573.
- BARRINGTON, G. M., BESSER, T. E., DAVIS, W. C., GAY, C. C., REEVES, J. J., MCFADDEN, T. B.: Expression of immunoglobulin G1 receptors by bovine mammary epithelial cells and mammary leukocytes. In: *J Dairy Sci*, 1997. 80. p. 86-93.
- BARRINGTON, G. M., BESSER, T. E., GAY, C. C., DAVIS, W. C., REEVES, J. J., MCFADDEN, T. B., AKERS, R. M.: Regulation of the immunoglobulin G1 receptor: effect of prolactin on in vivo expression of the bovine mammary immunoglobulin G1 receptor. In: *J Endocrinol*, 1999. 163. p. 25-31.
- BARRINGTON, G. M., MCFADDEN, T. B., HUYLER, M. T., BESSER, T. E.: Regulation of colostroneogenesis in cattle. In: *Livestock Production Science*, 2001. 70. p. 95-104.
- BASTIDA-CORCUERA, F. D., BUTLER, J. E., YAHIRO, S., CORBEIL, L. B.: Differential complement activation by bovine IgG2 allotypes. In: *Vet Immunol Immunopathol*, 1999. 71. p. 115-123.
- BELKNAP, E. B., BAKER, J. C., PATTERSON, J. S., WALKER, R. D., HAINES, D. M., CLARK, E. G.: The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves. In: *J Infect Dis*, 1991. 163. p. 470-476.
- BENLOUNES, N., CHEDID, R., THUILLIER, F., DESJEUX, J. F., ROUSSELET, F., HEYMAN, M.: Intestinal transport and processing of immunoglobulin G in the neonatal and adult rat. In: *Biol Neonate*, 1995. 67. p. 254-263.
- BERRYMAN, M., RODEWALD, R.: Beta 2-microglobulin co-distributes with the heavy chain of the intestinal IgG-Fc receptor throughout the transepithelial transport pathway of the neonatal rat. In: *J Cell Sci*, 1995. 108 ( Pt 6). p. 2347-2360.
- BESSER, T. E.: Concentrations of passively acquired IgG1 antibodies in the intestinal lumen of the neonatal calf. In: *Vet Immunol Immunopathol*, 1993. 38. p. 103-112.
- BESSER, T. E., GAY, C. C., MCGUIRE, T. C., EVERMANN, J. F.: Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. In: *J Virol*, 1988a. 62. p. 2238-2242.
- BESSER, T. E., MCGUIRE, T. C., GAY, C. C., PRITCHETT, L. C.: Transfer of functional immunoglobulin G (IgG) antibody into the gastrointestinal tract accounts for IgG clearance in calves. In: *J Virol*, 1988b. 62. p. 2234-2237.

- BJORKMAN, P. J., SAPER, M. A., SAMRAOUI, B., BENNETT, W. S., STROMINGER, J. L., WILEY, D. C.: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. In: *Nature*, 1987a. 329. p. 512-518.
- BJORKMAN, P. J., SAPER, M. A., SAMRAOUI, B., BENNETT, W. S., STROMINGER, J. L., WILEY, D. C.: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. In: *Nature*, 1987b. 329. p. 506-512.
- BLUMBERG, R. S., KOSS, T., STORY, C. M., BARISANI, D., POLISCHUK, J., LIPIN, A., PABLO, L., GREEN, R., SIMISTER, N. E.: A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes. In: *J Clin Invest*, 1995. 95. p. 2397-2402.
- BORVAK, J., RICHARDSON, J., MEDESAN, C., ANTOHE, F., RADU, C., SIMIONESCU, M., GHETIE, V., WARD, E. S.: Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. In: *Int Immunol*, 1998. 10. p. 1289-1298.
- BRAMBELL, F. W., HEMMINGS, W. A., MORRIS, I. G.: A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. In: *Nature*, 1964. 203. p. 1352-1354.
- BRANDON, M. R., HUSBAND, A. J., LASCELLES, A. K.: The effect of glucocorticoid on immunoglobulin secretion into colostrum in cows. In: *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1975. 53. p. 43-48.
- BRANDON, M. R., LASCELLES, A. K.: The effect of pre-partum milking on the transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. In: *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1975. 53. p. 197-204.
- BRANDON, M. R., WATSON, D. L., LASCELLES, A. K.: The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. In: *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1971. 49. p. 613-623.
- BROWN, W. R., RABBANI, H., BUTLER, J. E., HAMMARSTROM, L.: Characterization of the bovine C alpha gene. In: *Immunology*, 1997. 91. p. 1-6.
- BURMEISTER, W. P., GASTINEL, L. N., SIMISTER, N. E., BLUM, M. L., BJORKMAN, P. J.: Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. In: *Nature*, 1994. 372. p. 336-343.
- BUTLER, J. E.: Bovine immunoglobulins: an augmented review. In: *Vet Immunol Immunopathol*, 1983. 4. p. 43-152.
- BUTLER, J. E.: Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. In: *Rev Sci Tech*, 1998. 17. p. 43-70.
- BUTLER, J. E.: Immunoglobulins and immunocytes in animal milks. In: *Mucosal Immunology*. Szerk.: P. L. OGRA. New York: Academic Press, 1999. p. 1531-1554.
- BUTLER, J. E., FRENYO, V. L., WHIPP, S. C., WILSON, R. A., KOERTGE, T. E.: The metabolism and transport of bovine serum SIgA. In: *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1986. 9. p. 303-315.
- BUTLER, J. E., HEYERMANN, H., FRENYO, L. V., KIERNAN, J.: The heterogeneity of bovine IgG2. II. The identification of IgG2b. In: *Immunol Lett*, 1987. 16. p. 31-38.
- BUTLER, J. E., MAXWELL, C. F., PIERCE, C. S., HYLTON, M. B., ASOFSKY, R., KIDDY, C. A.: Studies on the relative synthesis and distribution of IgA and IgG1 in various tissues and body fluids of the cow. In: *J Immunol*, 1972. 109. p. 38-46.
- BUTLER, J. E., NAVARRO, P., HEYERMANN, H.: Heterogeneity of bovine IgG2. VI. Comparative specificity of monoclonal and polyclonal capture antibodies for IgG2a (A1) and IgG2a (A2). In: *Vet Immunol Immunopathol*, 1994. 40. p. 119-133.
- CHOWDHARY, B. P., FRONICKE, L., GUSTAVSSON, I., SCHERTHAN, H.: Comparative analysis of the cattle and human genomes: detection of ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. In: *Mamm Genome*, 1996. 7. p. 297-302.
- CIANGA, P., MEDESAN, C., RICHARDSON, J. A., GHETIE, V., WARD, E. S.: Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. In: *Eur J Immunol*, 1999. 29. p. 2515-2523.

- COLITTI, M., STRADAIOLI, G., STEFANON, B.: Effect of alpha-tocopherol deprivation on the involution of mammary gland in sheep. In: *J Dairy Sci*, 2000. 83. p. 345-350.
- CORBEIL, L. B., GOGOLEWSKI, R. P., KACSKOVICS, I., NIELSEN, K. H., CORBEIL, R. R., MORRILL, J. L., GREENWOOD, R., BUTLER, J. E.: Bovine IgG2a antibodies to *Haemophilus somnus* and allotype expression. In: *Can J Vet Res*, 1997. 61. p. 207-213.
- CORBEIL, L. B., HALL, C. E., LEIN, D., CORBEIL, R. R., DUNCAN, J. R.: Immunoglobulin classes in genital secretions of mycoplasma-infected and normal heifers. In: *Infect Immun*, 1976. 13. p. 1595-1600.
- CURTAIN, C. C., CLARK, B. L., DUFTY, J. H.: The origins of the immunoglobulins in the mucous secretions of cattle. In: *Clin Exp Immunol*, 1971. 8. p. 335-344.
- DARTON, P. J., MCDOWELL, G. H.: Selective transfer of IgG1 into milk of ewes following inhibition of milk secretion or acute inflammation. In: *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1980. 58. p. 149-157.
- DE BENEDICTIS, G., CAPALBO, P., DRAGONE, A.: Identification of an allotypic IgA in cattle serum. In: *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1984. 7. p. 35-42.
- DICKINSON, B. L., BADIZADEGAN, K., WU, Z., AHOUSE, J. C., ZHU, X., SIMISTER, N. E., BLUMBERG, R. S., LENCER, W. I.: Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. In: *J Clin Invest*, 1999. 104. p. 903-911.
- DIXON, F. J., WEIGLE, W. O., VAZQUEZ, J. J.: Metabolism and mammary secretion of serum protein in the cow. In: *Lab. Invest.*, 1961. 10. p. 216-237.
- DUNCAN, J. R., WILKIE, B. N., HIESTAND, F., WINTER, A. J.: The serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterization and quantitation. In: *J Immunol*, 1972. 108. p. 965-976.
- EHRlich, P.: Ueber Immunistaet durch Verbung und Saugung. In: *Hyg. Infect. Krankh.*, 1892. 12. p. 183-203.
- ENGWERDA, C. R., SANDEMAN, R. A., STUART, S. J., SANDEMAN, R. M.: Isolation and sequence of sheep immunoglobulin E heavy-chain complementary DNA. In: *Vet Immunol Immunopathol*, 1992. 34. p. 115-126.
- FOLEY, R. C., BEH, K. J.: Isolation and sequence of sheep Ig H and L chain cDNA. In: *J Immunol*, 1989. 142. p. 708-711.
- FRENYO, V. L., BUTLER, J. E., GUIDRY, A. J.: The association of extrinsic bovine IgG1, IgG2, SIgA and IgM with the major fractions and cells of milk. In: *Vet Immunol Immunopathol*, 1986. 13. p. 239-254.
- GARBOCZI, D. N., GHOSH, P., UTZ, U., FAN, Q. R., BIDDISON, W. E., WILEY, D. C.: Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. In: *Nature*, 1996. 384. p. 134-141.
- GARCIA, K. C., DEGANNO, M., STANFIELD, R. L., BRUNMARK, A., JACKSON, M. R., PETERSON, P. A., TEYTON, L., WILSON, I. A.: An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. In: *Science*, 1996. 274. p. 209-219.
- GHETIE, V., HUBBARD, J. G., KIM, J. K., TSEN, M. F., LEE, Y., WARD, E. S.: Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. In: *Eur J Immunol*, 1996. 26. p. 690-696.
- GHETIE, V., WARD, E. S.: Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. In: *Annu Rev Immunol*, 2000. 18. p. 739-766.
- GROVES, M. L., GORDON, W. G.: Isolation of a new glycoprotein-a and a gamma-G-globulin from individual cow milks. In: *Biochemistry*, 1967. 6. p. 2388-2394.
- GUIDRY, A. J., PAAPE, M. J., PEARSON, R. E.: Effect of udder inflammation on milk immunoglobulins and phagocytosis. In: *Am J Vet Res*, 1980. 41. p. 751-753.
- GUY, M. A., MCFADDEN, T. B., COCKRELL, D. C., BESSER, T. E.: Effects of unilateral prepartum milking on concentrations of immunoglobulin G1 and prolactin in colostrum. In: *J Dairy Sci*, 1994a. 77. p. 3584-3591.

- GUY, M. A., MCFADDEN, T. B., COCKRELL, D. C., BESSER, T. E.: Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. In: *J Dairy Sci*, 1994b. 77. p. 3002-3007.
- HAMERS-CASTERMAN, C., ATARHOUCHE, T., MUYLDERMANS, S., ROBINSON, G., HAMERS, C., SONGA, E. B., BENDAHMAN, N., HAMERS, R.: Naturally occurring antibodies devoid of light chains. In: *Nature*, 1993. 363. p. 446-448.
- HAYMANN, J. P., LEVRAUD, J. P., BOUET, S., KAPPES, V., HAGEGE, J., NGUYEN, G., XU, Y., RONDEAU, E., SRAER, J. D.: Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult human kidney. In: *J Am Soc Nephrol*, 2000. 11. p. 632-639.
- HEIN, W. R., DUDLER, L.: Nucleotide sequence of the membrane form of sheep IgM and identification of two C mu allotypes. In: *Mol Immunol*, 1993. 30. p. 783-784.
- HEYERMANN, H., BUTLER, J. E., FRANGIONE, B.: The heterogeneity of bovine IgG2--V. Differences in the primary structure of bovine IgG2 allotypes. In: *Mol Immunol*, 1992. 29. p. 1147-1152.
- HUSBAND, A. J., BRANDON, M. R., LASCELLES, A. K.: Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. In: *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1972. 50. p. 491-498.
- ISRAEL, E. J., TAYLOR, S., WU, Z., MIZOGUCHI, E., BLUMBERG, R. S., BHAN, A., SIMISTER, N. E.: Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. In: *Immunology*, 1997. 92. p. 69-74.
- JIANG, L., WANG, J., SOLORZANO-VARGAS, R. S., TSAI, H. V., GUTIERREZ, E. M., ONTIVEROS, L. O., KIELA, P. R., WU, S. V., MARTIN, M. G.: Characterization of the rat intestinal Fc receptor (FcRn) promoter: transcriptional regulation of FcRn gene by the Sp family of transcription factors. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. 286. p. G922-931.
- JOYCE, S., WOODS, A. S., YEWDELL, J. W., BENNINK, J. R., DE SILVA, A. D., BOESTEANU, A., BALK, S. P., COTTER, R. J., BRUTKIEWICZ, R. R.: Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. In: *Science*, 1998. 279. p. 1541-1544.
- JUNGHANS, R. P.: Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. In: *Immunol Res*, 1997. 16. p. 29-57.
- KACSKOVICS, I.: A tehéntej immunglobulinja - a jövő precíziós fegyvere a bélfertőzések ellen. In: *Magyar Tudomány*, 2003. p. 461-469.
- KACSKOVICS, I., BUTLER, J. E.: The heterogeneity of bovine IgG2--VIII. The complete cDNA sequence of bovine IgG2a (A2) and an IgG1. In: *Mol Immunol*, 1996. 33. p. 189-195.
- KACSKOVICS, I., WU, Z., SIMISTER, N. E., FRENYO, L. V., HAMMARSTROM, L.: Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc receptor. In: *J Immunol*, 2000. 164. p. 1889-1897.
- KEMLER, R., MOSSMANN, H., STROHMAIER, U., KICKHOFEN, B., HAMMER, D. K.: In vitro studies on the selective binding of IgG from different species to tissue sections of the bovine mammary gland. In: *Eur J Immunol*, 1975. 5. p. 603-608.
- KIM, J. K., FIRAN, M., RADU, C. G., KIM, C. H., GHETIE, V., WARD, E. S.: Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn. In: *Eur J Immunol*, 1999. 29. p. 2819-2825.
- KIM, J. K., TSEN, M. F., GHETIE, V., WARD, E. S.: Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. In: *Eur J Immunol*, 1994a. 24. p. 542-548.
- KIM, J. K., TSEN, M. F., GHETIE, V., WARD, E. S.: Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor. In: *Eur J Immunol*, 1994b. 24. p. 2429-2434.
- KIM, K. J., MALIK, A. B.: Protein transport across the lung epithelial barrier. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. 284. p. L247-259.

- KIS, Z., MAYER, B., JUHÁSZ, V., DOLESCHALL, M., FRENYÓ, V. L., KACSKOVICS, I.: A szarvasmarha neonatalis Fc-receptorának (bFcRn) tőgybeli expressziója és IgG-kötő képessége. In: *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2004. 126. p. 598-605.
- KNIGHT, K. L., SUTER, M., BECKER, R. S.: Genetic engineering of bovine Ig. Construction and characterization of hapten-binding bovine/murine chimeric IgE, IgA, IgG1, IgG2, and IgG3 molecules. In: *J Immunol*, 1988. 140. p. 3654-3659.
- KOBAYASHI, N., SUZUKI, Y., TSUGE, T., OKUMURA, K., RA, C., TOMINO, Y.: FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. In: *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. 282. p. F358-365.
- KRICKA, L. J.: Chemiluminescent and bioluminescent techniques. In: *Clin Chem*, 1991. 37. p. 1472-1481.
- KRISTOFFERSEN, E. K., MATRE, R.: Co-localization of the neonatal Fc gamma receptor and IgG in human placental term syncytiotrophoblasts. In: *Eur J Immunol*, 1996. 26. p. 1668-1671.
- KULSETH, M. A., KRAJCI, P., MYKLEBOST, O., ROGNE, S.: Cloning and characterization of two forms of bovine polymeric immunoglobulin receptor cDNA. In: *DNA Cell Biol*, 1995. 14. p. 251-256.
- KUROIWA, Y., 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.: Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. In: *Nat Biotechnol*, 2002. 20. p. 889-894.
- LARSON, B. L., HEARY, H. L., JR., DEVERY, J. E.: Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. In: *J Dairy Sci*, 1980. 63. p. 665-671.
- LEACH, J. L., SEDMAK, D. D., OSBORNE, J. M., RAHILL, B., LAIRMORE, M. D., ANDERSON, C. L.: Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. In: *J Immunol*, 1996. 157. p. 3317-3322.
- LEARY, H. L., JR., LARSON, B. L., NELSON, D. R.: Immunohistochemical localization of IgG1 and IgG2 in prepartum and lactating bovine mammary tissue. In: *Vet Immunol Immunopathol*, 1982. 3. p. 509-514.
- MACH, J. P., PAHUD, J. J.: Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. In: *J Immunol*, 1971. 106. p. 552-563.
- MACH, J. P., PAHUD, J. J., ISLIKER, H.: IgA with "secretory piece" in bovine colostrum and saliva. In: *Nature*, 1969. 223. p. 952-955.
- MARTIN, M. G., WU, S. V., WALSH, J. H.: Ontogenetic development and distribution of antibody transport and Fc receptor mRNA expression in rat intestine. In: *Dig Dis Sci*, 1997. 42. p. 1062-1069.
- MARTIN, W. L., WEST, A. P., JR., GAN, L., BJORKMAN, P. J.: Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. In: *Mol Cell*, 2001. 7. p. 867-877.
- MAYER, B., KIS, Z., KAJAN, G., FRENYO, L. V., HAMMARSTROM, L., KACSKOVICS, I.: The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. In: *Vet Immunol Immunopathol*, 2004. 98. p. 85-89.
- MAYER, B., ZOLNAI, A., FRENYO, L. V., JANCSIK, V., SZENTIRMAY, Z., HAMMARSTROM, L., KACSKOVICS, I.: Localization of the sheep FcRn in the mammary gland. In: *Vet Immunol Immunopathol*, 2002a. 87. p. 327-330.
- MAYER, B., ZOLNAI, A., FRENYO, L. V., JANCSIK, V., SZENTIRMAY, Z., HAMMARSTROM, L., KACSKOVICS, I.: 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. In: *Immunology*, 2002b. 107. p. 288-296.

- MCCARTHY, K. M., LAM, M., SUBRAMANIAN, L., SHAKYA, R., WU, Z., NEWTON, E. E., SIMISTER, N. E.: Effects of mutations in potential phosphorylation sites on transcytosis of FcRn. In: *J Cell Sci*, 2001. 114. p. 1591-1598.
- MEDESAN, C., MATESOI, D., RADU, C., GHETIE, V., WARD, E. S.: Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1. In: *J Immunol*, 1997. 158. p. 2211-2217.
- MIKULSKA, J. E., SIMISTER, N. E.: Analysis of the promoter region of the human FcRn gene. In: *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1492. p. 180-184.
- MORGAN, K. L., BOURNE, F. J., NEWBY, T. J., BRADLEY, P. A.: Humoral factors in the secretory immune system of ruminants. In: *Adv Exp Med Biol*, 1981. 137. p. 391-411.
- MOUSAVI, M., RABBANI, H., HAMMARSTROM, L.: Characterization of the bovine epsilon gene. In: *Immunology*, 1997. 92. p. 369-373.
- MOUSAVI, M., RABBANI, H., PILSTROM, L., HAMMARSTROM, L.: Characterization of the gene for the membrane and secretory form of the IgM heavy-chain constant region gene (C mu) of the cow (*Bos taurus*). In: *Immunology*, 1998. 93. p. 581-588.
- NAESSENS, J., NEWSON, J., WILLIAMS, D. J., LUTJE, V.: Identification of isotypes and allotypes of bovine immunoglobulin M with monoclonal antibodies. In: *Immunology*, 1988. 63. p. 569-574.
- NANSEN, P. 1970. Metabolism of bovine immunoglobulin-G. Roy. Vet. and Agricultural Univ., Munksgard, Copenhagen.
- NEWBY, F. J., BOURNE, J.: The nature of the local immune system of the bovine mammary gland. In: *The Journal of Immunology*, 1977. 31. p. 475-480.
- NEWBY, T. J., BOURNE, F. J.: The nature of the local immune system of the bovine small intestine. In: *Immunology*, 1976a. 31. p. 475-480.
- NEWBY, T. J., BOURNE, F. J.: Relative resistance of bovine and porcine immunoglobulins to proteolysis. In: *Immunol Commun*, 1976b. 5. p. 631-635.
- NIELSEN, K., SHEPPARD, J., HOLMES, W., TIZARD, I.: Experimental bovine trypanosomiasis. Changes in the catabolism of serum immunoglobulins and complement components in infected cattle. In: *Immunology*, 1978. 35. p. 811-816.
- PEDERSEN, K. B.: The origin of immunoglobulin-G in bovine tears. In: *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol*, 1973. 81. p. 245-252.
- PLAKSIN, D., POLAKOVA, K., MAGE, M. G., MARGULIES, D. H.: Rigidification of the alpha2 helix of an MHC class I molecule by a valine to proline mutation in position 165 does not prevent peptide-specific antigen presentation. In: *J Immunol*, 1997. 159. p. 4408-4414.
- POPOV, S., HUBBARD, J. G., KIM, J., OBER, B., GHETIE, V., WARD, E. S.: The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn. In: *Mol Immunol*, 1996. 33. p. 521-530.
- PRAETOR, A., HUNZIKER, W.: beta(2)-Microglobulin is important for cell surface expression and pH-dependent IgG binding of human FcRn. In: *J Cell Sci*, 2002. 115. p. 2389-2397.
- RABBANI, H., BROWN, W. R., BUTLER, J. E., HAMMARSTROM, L.: Polymorphism of the IGHG3 gene in cattle. In: *Immunogenetics*, 1997. 46. p. 326-331.
- RAGHAVAN, M., BJORKMAN, P. J.: Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. In: *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996. 12. p. 181-220.
- RAGHAVAN, M., CHEN, M. Y., GASTINEL, L. N., BJORKMAN, P. J.: Investigation of the interaction between the class I MHC-related Fc receptor and its immunoglobulin G ligand. In: *Immunity*, 1994. 1. p. 303-315.
- RAGHAVAN, M., WANG, Y., BJORKMAN, P. J.: Effects of receptor dimerization on the interaction between the class I major histocompatibility complex-related Fc receptor and IgG. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92. p. 11200-11204.
- ROBERTS, D. M., GUENTHER, M., RODEWALD, R.: Isolation and characterization of the Fc receptor from the fetal yolk sac of the rat. In: *J Cell Biol*, 1990. 111. p. 1867-1876.

- RODEWALD, R.: Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. In: *J Cell Biol*, 1973. 58. p. 189-211.
- RODEWALD, R.: pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. In: *J Cell Biol*, 1976. 71. p. 666-669.
- RODEWALD, R.: Distribution of immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rat. In: *J Cell Biol*, 1980. 85. p. 18-32.
- RODEWALD, R., ABRAHAMSON, D. R.: Receptor-mediated transport of IgG across the intestinal epithelium of the neonatal rat. In: *Ciba Found Symp*, 1982. p. 209-232.
- RODEWALD, R., KRAEHENBUHL, J. P.: Receptor-mediated transport of IgG. In: *J Cell Biol*, 1984. 99. p. 159s-164s.
- ROJAS, R., APODACA, G.: Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. In: *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3. p. 944-955.
- SASAKI, M., DAVIS, C. L., LARSON, B. L.: Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. In: *J Dairy Sci*, 1976. 59. p. 2046-2055.
- SASAKI, M., LARSON, B. L., NELSON, D. R.: Kinetic analysis of the binding of immunoglobulins IgG1 and IgG2 to bovine mammary cells. In: *Biochim Biophys Acta*, 1977. 497. p. 160-170.
- SCHLACHETZKI, F., ZHU, C., PARDRIDGE, W. M.: Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. In: *J Neurochem*, 2002. 81. p. 203-206.
- SCHNULLE, P. M., HURLEY, W. L.: Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland. In: *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. 91. p. 227-231.
- SCICCHITANO, R., SHELDRAKE, R. F., HUSBAND, A. J.: Origin of immunoglobulins in respiratory tract secretion and saliva of sheep. In: *Immunology*, 1986. 58. p. 315-321.
- SIMISTER, N. E.: Placental transport of immunoglobulin G. In: *Vaccine*, 2003. 21. p. 3365-3369.
- SIMISTER, N. E., MOSTOV, K. E.: An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. In: *Nature*, 1989. 337. p. 184-187.
- SMITH, E. L.: The immune proteins of bovine colostrum and plasma. In: *J Biol Chem*, 1946. 164. p. 345-358.
- SMITH, K. L., MUIR, L. A., FERGUSON, L. C., CONRAD, H. R.: Selective transport of IgG1 into the mammary gland: role of estrogen and progesterone. In: *J Dairy Sci*, 1971. 54. p. 1886-1894.
- SPIEKERMANN, G. M., FINN, P. W., WARD, E. S., DUMONT, J., DICKINSON, B. L., BLUMBERG, R. S., LENCER, W. I.: Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. In: *J Exp Med*, 2002. 196. p. 303-310.
- SPRIGGS, M. K., KOLLER, B. H., SATO, T., MORRISSEY, P. J., FANSLAW, W. C., SMITHIES, O., VOICE, R. F., WIDMER, M. B., MALISZEWSKI, C. R.: Beta 2-microglobulin-, CD8+ T-cell-deficient mice survive inoculation with high doses of vaccinia virus and exhibit altered IgG responses. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89. p. 6070-6074.
- STORY, C. M., MIKULSKA, J. E., SIMISTER, N. E.: A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. In: *J Exp Med*, 1994. 180. p. 2377-2381.
- SYMONS, D. B., CLARKSON, C. A.: Genomic organisation and sequence of the extracellular domain exons of the bovine Fc gamma RI receptor, and evidence for restricted binding of ruminant IgG to U937 cells. In: *Mol Immunol*, 1992. 29. p. 1407-1413.
- SYMONS, D. B., CLARKSON, C. A., BEALE, D.: Structure of bovine immunoglobulin constant region heavy chain gamma 1 and gamma 2 genes. In: *Mol Immunol*, 1989. 26. p. 841-850.

- TELLEMAN, P., JUNGHANS, R. P.: The role of the Brambell receptor (FcRB) in liver: protection of endocytosed immunoglobulin G (IgG) from catabolism in hepatocytes rather than transport of IgG to bile. In: *Immunology*, 2000. 100. p. 245-251.
- TIWARI, B., JUNGHANS, R. P.: Functional analysis of the mouse Fcgrt 5' proximal promoter. In: *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1681. p. 88-98.
- TOBIN-JANZEN, T. C., WOMACK, J. E.: Comparative mapping of IGHG1, IGHM, FES, and FOS in domestic cattle. In: *Immunogenetics*, 1992. 36. p. 157-165.
- TUCKER, H. A.: Lactation and its hormonal control. In: *The Physiology of Reproduction*. Szerk.: E. KNOBIL, NEILL, J. ET. AL. New York: Raven Press Ltd., 1988. p. 2235-2263.
- VAUGHN, D. E., BJORKMAN, P. J.: High-affinity binding of the neonatal Fc receptor to its IgG ligand requires receptor immobilization. In: *Biochemistry*, 1997. 36. p. 9374-9380.
- VAUGHN, D. E., BJORKMAN, P. J.: Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. In: *Structure*, 1998. 6. p. 63-73.
- VAUGHN, D. E., MILBURN, C. M., PENNY, D. M., MARTIN, W. L., JOHNSON, J. L., BJORKMAN, P. J.: Identification of critical IgG binding epitopes on the neonatal Fc receptor. In: *J Mol Biol*, 1997. 274. p. 597-607.
- VERBEET, M. P., VERMEER, H., WARMERDAM, G. C., DE BOER, H. A., LEE, S. H.: Cloning and characterization of the bovine polymeric immunoglobulin receptor-encoding cDNA. In: *Gene*, 1995. 164. p. 329-333.
- WALDMANN, T. A., STROBER, W.: Metabolism of immunoglobulins. In: *Prog Allergy*, 1969. 13. p. 1-110.
- WALDMANN, T. A., STROBER, W., BLAESE, R. M.: Variations in the metabolism of immunoglobulins measured by turnover rates. In: *Immunoglobulins*. Szerk.: M. E. Washington: Natl. Acad. Sci., 1970. p. 33-51.
- WARD, E. S., ZHOU, J., GHETIE, V., OBER, R. J.: Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. In: *Int Immunol*, 2003. 15. p. 187-195.
- WATSON, D. L., BRANDON, M. R., LASCELLES, A. K.: Concentrations of immunoglobulin in mammary secretion of ruminants during involution with particular reference to selective transfer of IgG. In: *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1972. 50. p. 535-539.
- WELLS, P. W., DAWSON, A. M., SMITH, W. D., SMITH, B. S.: The transfer of circulating 131I IgG1 and 125I IgG2 to the nasal secretions of sheep. In: *Res Vet Sci*, 1977. 22. p. 201-204.
- WERNICK, N. L., HAUCKE, V., SIMISTER, N. E.: Recognition of the tryptophan-based endocytosis signal in the neonatal Fc receptor by the mu subunit of AP-2. In: *J Biol Chem*, 2004.
- WESTERN, A. H., ECKERY, D. C., DEMMER, J., JUENGEL, J. L., MCNATTY, K. P., FIDLER, A. E.: Expression of the FcRn receptor (alpha and beta) gene homologues in the intestine of suckling brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) pouch young. In: *Mol Immunol*, 2003. 39. p. 707-717.
- WHITE, G. P., ROCHE, P., BRANDON, M. R., NEWTON, S. E., MEEUSEN, E. N.: Cloning and characterization of sheep (*Ovis aries*) immunoglobulin alpha chain. In: *Immunogenetics*, 1998. 48. p. 359-362.
- WILKIE, B. N.: Respiratory tract immune response to microbial pathogens. In: *J Am Vet Med Assoc*, 1982. 181. p. 1074-1079.
- WILKINSON, D. G. 1992. In situ hybridization. Oxford University Press, New York.
- WU, Z., SIMISTER, N. E.: Tryptophan- and dileucine-based endocytosis signals in the neonatal Fc receptor. In: *J Biol Chem*, 2001. 276. p. 5240-5247.
- YOSHIDA, M., CLAYPOOL, S. M., WAGNER, J. S., MIZOGUCHI, E., MIZOGUCHI, A., ROOPENIAN, D. C., LENCER, W. I., BLUMBERG, R. S.: Human neonatal Fc receptor



- mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. In: *Immunity*, 2004. 20. p. 769-783.
- YURCHAK, A. M., BUTLER, J. E., TOMASI, T. B., JR.: Fluorescent localization of immunoglobulins in the tissues of the cow. In: *J Dairy Sci*, 1971. 54. p. 1324-1325.
- ZENG, Z., CASTANO, A. R., SEGELKE, B. W., STURA, E. A., PETERSON, P. A., WILSON, I. A.: Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. In: *Science*, 1997. 277. p. 339-345.
- ZHANG, G., YOUNG, J. R., TREGASKES, C. A., SOPP, P., HOWARD, C. J.: Identification of a novel class of mammalian Fc gamma receptor. In: *J Immunol*, 1995. 155. p. 1534-1541.
- ZHANG, G., YOUNG, J. R., TREGASKES, C. R., HOWARD, C. J.: Cattle Fc gamma RII: molecular cloning and ligand specificity. In: *Immunogenetics*, 1994. 39. p. 423-427.
- ZHAO, Y., KACSKOVICS, I., PAN, Q., LIBERLES, D. A., GELI, J., DAVIS, S. K., RABBANI, H., HAMMARSTROM, L.: Artiodactyl IgD: the missing link. In: *J Immunol*, 2002. 169. p. 4408-4416.
- ZHU, X., MENG, G., DICKINSON, B. L., LI, X., MIZOGUCHI, E., MIAO, L., WANG, Y., ROBERT, C., WU, B., SMITH, P. D., LENCER, W. I., BLUMBERG, R. S.: MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. In: *J Immunol*, 2001. 166. p. 3266-3276.
- ZOU, S., HURLEY, W. L., HEGARTY, H. M., LARSON, B. L., NELSON, D. R.: Immunohistological localization of IgG1, IgA and secretory component in the bovine mammary gland during involution. In: *Cell Tissue Res*, 1988. 251. p. 81-86.

## 9. A kutatási témában megjelent közlemények

### 9.1. Referált angol nyelvű folyóiratokban megjelent közlemények

Mayer, B., A. Zolnai, L. V. Frenyo, V. Jancsik, Z. Szentirmay, L. Hammarstrom and I. Kacskovics. 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. Kacskovics. 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. Kacskovics. 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. Kacskovics. Expression of neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland around the time of parturition. *J Dairy Res. (in press)*

## **9.2. Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények**

Kacskovics Imre, Mayer Balázs, Zolnai Anna, Frenyó V. László, Neil Simister és Lennart Hammarström. A szarvasmarha MHC I típusú Fc receptorának *in vivo* és *in vitro* expressziós vizsgálata (Poszter, P 28). A Magyar Immunológiai Társaság XXIX. Kongresszusa, Bük 1999. október 27-29.

Kacskovics Imre, Mayer Balázs, Zolnai Anna, Frenyó V. László, Neil Simister és Lennart Hammarström. 2000. MTA Állatorvos-tudományi Bizottság, Akadémiai Beszámoló: A szarvasmarha MHC I típusú Fc receptorának *in vivo* és *in vitro* expressziós vizsgálata

Mayer Balázs, Frenyó V. László és Kacskovics Imre. 2000. MTA Állatorvos-tudományi Bizottság, Akadémiai Beszámoló: A bovin FcRn expressziójának szöveti lokalizációja I. (*In situ* hibridizációs előkísérletek)

Mayer Balázs, Frenyó V. László, Zolnai Anna, Kacskovics Imre. A szarvasmarha és juh FcRn génexpressziójának vizsgálata *in situ* hibridizációval, tejmirigy bioptátumokon (Poszter/23). A Magyar Immunológiai Társaság Jubileumi (XXX.) Kongresszusa, Budapest 2000. október 25-27.

Mayer Balázs, Zolnai Anna, Jancsik Veronika, Frenyó V. László és Kacskovics Imre. 2001. MTA Állatorvos-tudományi Bizottság, Akadémiai Beszámoló: A szarvasmarha és juh FcRn génexpressziójának vizsgálata *in situ* hibridizációval és immunhisztokémiával

Mayer Balázs, Zolnai Anna, Frenyó V. László, Jancsik Veronika, Szentirmay Zoltán, Lennart Hammarström, Kacskovics Imre. A juh neonatalis Fc receptor szerepe a maternalis IgG transzportban (Előadás, E 47). A Magyar Immunológiai Társaság XXXI. Kongresszusa, Eger 2001. október 17-19.

Mayer Balázs, Zolnai Anna, Jancsik Veronika, Frenyó V. László, Szentirmay Zoltán, Lennart Hammarström és Kacs Kovics Imre. 2002. MTA Állatorvos-tudományi Bizottság, Akadémiai Beszámoló: A kérődzők neonatalis Fc receptorának szerepe az IgG transzportban

Mayer Balázs, Kis Zsuzsanna, Kaján Győző, Frenyó V. László, Lennart Hammarström és Kacs Kovics Imre. 2003. MTA Állatorvos-tudományi Bizottság, Akadémiai Beszámoló: A szarvasmarha neonatalis Fc receptor lokalizációja tüdőben és az ellés környékén vett tőgybiopptátumokban

Mayer B, Kis Zs, Kajan Gy, Frenyo LV, Hammarstrom L, Kacs Kovics I. The FcRn is expressed in the lung of adult cows (poster) 15th European Immunology Congress, Rhodes, Greece, June 8-12. 2003

Mayer Balázs, Kis Zsuzsanna, Kaján Győző, Frenyó V. László, Lennart Hammarström, Kacs Kovics Imre. A neonatalis Fc receptor (FcRn) expressziója szarvasmarhatüdőben. Poszter (P28) A MIT XXXIII. Vándorgyűlése, Győr, 2003. október 15-17.

Mayer Balázs, Kalmár Lajos, Frenyó V. László, Lennart Hammarström, Kacs Kovics Imre. 2004. MTA Állatorvos-tudományi Bizottság, Akadémiai Beszámoló: A szarvasmarha neonatalis Fc receptor expressziójának elemzése real-time PCR módszerrel I.

Mayer Balázs, Cervenak László, Schneider Zita, Szenci Ottó, Frenyó V. László, Lennart Hammarström, Kacs Kovics Imre. 2005. MTA Állatorvos-tudományi Bizottság, Akadémiai Beszámoló: A szarvasmarha neonatalis Fc receptor szerepének vizsgálata az IgG felezési idejének meghosszabbításában.

### **9.3. 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.

## 10. Egyéb közlemények

### 10.1. Referált angol nyelvű folyóiratokban megjelent közlemények

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

## 11. Köszönetnyilvánítás

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

Különösen hálás vagyok konzulenseimnek, **Dr. Kacs Kovics Imrének** és **Dr. Jancsik Veronikának**, akik bevezettek a molekuláris-biológiai illetve szövettani vizsgálati módszerek világába. A kísérlettervezés, a laboratóriumi munka és a publikációk írása során szintén sokat tanultam tőlük. Köszönöm a sokrétű segítséget kolléganőimnek, **Dr. Zolnai Annának** és **Dr. Kis Zsuzsannának**, valamint kollégámnak **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 Ágnes**t (Országos Állategészségügyi Intézet), aki a paraffinos szövettani metszeteket készítette. 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.