

Zárójelentés

1. Bevezetés

Monoklonális ellenanyagok előállítása transzgénikus (Tg) állatokban

A felfedező élettudományok egyik legfontosabb jelenlegi célpontjai azok a sejtmembránba ágyazott fehérje molekulák (pl. G-protein kapcsolt receptorok (GPCR), ioncsatornák), amelyek a sejt homeosztázisát külső és belső szignálok révén befolyásolják. Ugyanezen molekulák esetleges mutációja és kóros működése számos súlyos betegség okozója, illetve a terápiás kezelés aktív befolyásolója. Az eddigi eredményes kutatásoknak köszönhetően ezekből a molekulákból mára a legintenzívebben vizsgált terápiás célpontok váltak. Mind a felfedező kutatás, mind pedig a gyógyszerfejlesztés központi eleme, a nagyon specifikus célpont felismerést biztosító és sok esetben előnyös funkció-módosítást is kiváltó ellenanyagok. Ezek előállítása jórészt a hagyományos ún. hibridóma technológiával történik, amelynek kiinduló fázisában egy állatot (általában egeret) az adott fehérjével oltanak és az állatban immunválasz alakul ki, majd azt követően a lépsejteket fúzionáltatva létrehozzák a monoklonális ellenanyagot termelő hibridómát (1). Szakmai körökben ugyanakkor jól ismert, hogy pont ezek a fehérjék nagyon gyenge immunválaszt váltanak ki, azaz ellenük sok esetben rendkívül nehéz megfelelő minőségű ellenanyagot előállítani. Ennek többek között oka, hogy ezeket a fehérjéket az ellenanyag termeléshez nagyon nehéz a megfelelő mennyiségben és konformációban előállítani (membránba ágyazottságuk miatt). Egy másik probléma, hogy ezek a fehérjék nagyfokú, fajok közötti, hasonlóságot mutatnak és emiatt az immunizált egér nem, vagy csak minimális mértékben termel ellenanyagot az ember homológ fehérjéjével szemben (immuntolerancia). (2) A jelenleg forgalmazott, illetve a fázis 3. klinikai szakaszban lévő terápiás ellenanyagok 65-70%-át egérből fejlesztik, a megfelelő humanizálást követően. (3)

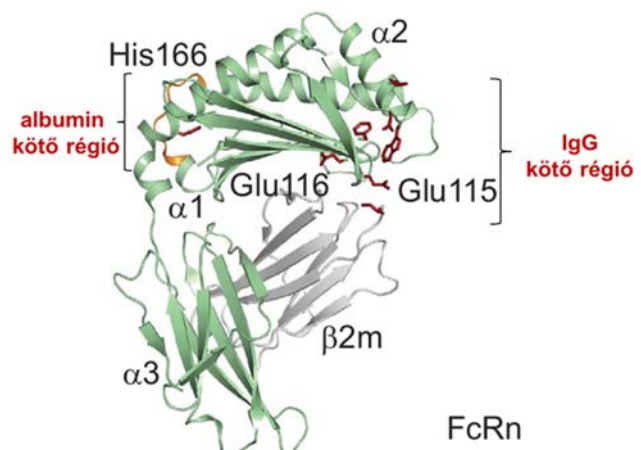
A monoklonális ellenanyagok fejlesztésének növekvő igényével már korábban előtérbe került olyan genetikailag módosított egértörzsek alkalmazásának lehetősége, melyek használata több hibridóma kialakulását eredményezi. Ilyenek azok az egértörzsek, amelyekben a B-sejt apoptózist gátolják, például az MRL/lpr egértörzs, melynek egyedei spontán kialakult Fas molekula hiánnyal jellemezhetők (4), vagy az, amelyik fokozott mértékben fejezi ki a Bcl-2 molekulát (5). Bár ezekben az állatokban fokozott mértékű az antigén-specifikus B-sejtek kialakulása, erősen autoimmun tulajdonságaik jelentősen korlátozzák használatukat. A nagy mennyiségű immunkomplex jelenlétében életbe lépő, immunválaszt szabályozó mechanizmusok blokkolása, vagyis a B-sejt aktiválást gátló FcγRIIB receptorok kiütése újabb ígéretes lehetőséget jelentett az immunválasz fokozás és nagyobb számú antigén specifikus B-sejt képződés irányába. Az FcγRIIB hiányos egerek valóban fokozott ellenanyag termeléssel, azonban egyúttal megnövekedett anafilaktikus reakcióval is jellemezhetők (6), ezenkívül spontán sejtmag ellenes ellenanyagokat (antinuclear antibodies, ANA) termelnek és végzetes glomerulonefritisz alakul ki szervezetükben (7, 8). Kiderült az is, hogy a follikuláris dendritikus sejteken kifejeződő FcγRIIB fontos szerepet tölt be az antigén prezentációjában, azaz a receptor hiánya ezt az alapvetően fontos folyamatot is károsítja (9). Mindezek alapján ez a Tg modell sem váltotta be a hatékonyabb monoklonális ellenanyag előállításához fűzött reményeket. Egy másik Tg egérmodellben a csíráközpont asszociált DNS primáz (GANP) kifejeződését fokozták és érték el nagyobb affinitású, antigén-specifikus ellenanyagok termelését (10, 11); ill. egy további modellben is a szomatikus hipermutációt fokozták a DNS polimeráz ζ expresszió fokozásával (12).

Bár nem tartozik szorosan a jelen pályázathoz, mégis fontos megemlíteni, hogy az egerben előállított monoklonális ellenanyagokat „humanizálni” kell annak érdekében, hogy az emberi szervezetben ne alakuljon ki nagymértékű eger IgG elleni immunválasz (HAMA) és az ne csökkentse a terápia hatékonyságát (eger-humán kiméra monoklonális ellenanyagok létrehozása, ill. eger CDR graftok humán IgG Fab vázba illesztése: humanizált ellenanyagok). Ennek megoldására az elmúlt több mint két évtizedben számos új, humán immunoglobulin génszekvenciákat hordozó, genetikailag módosított állatot fejlesztettek ki. Ezek közül is azok az egerek, amelyekben a nehéz-lánc konstans régiója is humán molekula (HuMab, XenoMouse, Kirin TC Mouse) viszonylag gyenge humorális immunválasszal rendelkeznek, feltehetőleg azért, mert a B-sejt receptoraként elégtelenül működő hibrid komplexet hoznak létre, amelyben a humán BCR-ek kapcsolódnak a szignalizációban részt vevő eger $Ig\alpha$ - és $Ig\beta$ -láncokkal (13). A humanizált állatok humorális immunválaszának fokozása érdekében az újabb generációjú Tg egereket, sőt újabban patkányokat úgy hozzák létre, hogy a könnyű láncot teljesen humánra cserélik, míg a nehézlánc esetén csupán annak variábilis részét helyettesítik humán genetikai elemekkel, ill. a nehézlánc konstans részét az eredeti eger, vagy patkány szekvenciák kódolják (VelocImmune Mouse, OMT rat). Ezek humorális immunválasza a beszámoló alapján megegyezik az eger immunválaszával. A hibridóma előállítását követően az eger, ill. patkány konstans régiókat a későbbiekben humánra cserélik (14, 15).

A jelen pályázatban megfogalmazott célkitűzések egy olyan Tg eger modellre vonatkoznak, amelyeket magunk állítottunk elő egy korábbi kutatási projekt kapcsán, és amelyről kiderült, hogy jelentősen fokozott humorális immunválasszal rendelkeznek anélkül, hogy autoreaktív folyamatok alakulnának ki bennük. Ezek a Tg egerek a szarvasmarha neonatális Fc receptort (FcRn) fejezik ki nagy mértékben.

Az FcRn rövid ismertetése

F. W. Rogers Brambell és munkatársai számos kísérletüket követve írták le először, hogy az anyai immunoglobulin G (IgG) molekulák utódba kerülését egy telíthető receptor biztosítja (16); majd nem sokkal később felvetették, hogy egy hasonló vagy azonos receptor védi meg az IgG molekulákat a gyors lebomlástól (17). Ezeket az anyai IgG transzportban résztvevő, illetve a szérum IgG felezési idejét meghatározó receptorokat nevezték első leírójáról Brambell receptornak (FcRB). 1972-ben Jones és Waldman újszülött patkányok vékonybeléből izolált egy fehérjét (innen kapta a neonatális receptor nevet, ám elnevezése ellenére az FcRn kifejeződése nem korlátozódik az újszülöttkori időszakra), amely az anyatejben található IgG keringésbe irányuló transzportját biztosítja (18); és amelyről ezt követően kimutatták, hogy egy 12 és egy 40-45 kD-os fehérjéből álló heterodimer (19), valamint azt, hogy az IgG erősen pH-függő módon kötődik a receptorhoz. A kötődés enyhén savas közegben (pH 6.0-6.5) jön létre, míg semleges-enyhén bázikus közegben (pH 7.0-7.5) az IgG/FcRn komplex bomlik (20, 21). A patkány FcRn-t 1989-ben klónozták és megállapították, hogy egy nehéz-láncból (α -lánc) és a β 2-mikroglobulinból (β 2m) épül fel. Az α -lánc az MHC I molekula α -



1. ábra – az FcRn két különböző régióban pH dependens kötéssel kapcsolódik az IgG, ill. albumin molekulákhoz.

láncával homológ, 3 extracelluláris doménből ($\alpha 1$, $\alpha 2$ és $\alpha 3$), a sejtmembránban „horgonyzó” transzmembrán régióból és citoplazmikus farokrészből áll (22). Az FcRn az IgG mellett, egy másik kötőhelyen az albumint is hasonló, pH-függő módon köti (23) (1. ábra).

Az FcRn számos ponton szabályozza az immunválaszt, így többek között részt vesz a maternális IgG epitelsejteken keresztüli transzportjában; megakadályozza az IgG és albumin lebomlását a kapilláris endotelsejteken és egyes fehérvérsejteken, valamint részt vesz az antigén-IgG immunkomplexek antigén prezentációs folyamataiban (24). Ez utóbbi folyamatot részletesebben is ismertetem, tekintettel arra, hogy a jelen pályázatban ennek a folyamatnak az egyes elemeit elemeztük.

Bár az FcRn önmaga nem képes antigént prezentálni (25), expressziója mégis kimutatható az összes hivatásos antigénprezentáló sejtben (APC), azaz a monocitákban, makrofágokban, dendritikus sejtekben (26), illetve a lép egy speciális B populációjában is (27, 28). Qiao és mtsai egér dendritikus sejtekhez OVA-IgG-t tartalmazó multimer immunkomplexet adva erős, dózis-függő OVA-specifikus T-sejt proliferációt figyeltek meg. Ugyanakkor kimutatták azt is, hogy a monomer IgG-vel ellentétben, ami egy reciklizációs útvonalat követ (azaz az internalizálódott IgG újra a sejtfelszínre kerül), a multimer immunkomplexek a dendritikus sejtekben, az FcRn közvetítésével a lizozómába kerülnek és ott lebomlanak, ami az MHC II molekulák antigénnel való feltöltődéséhez, majd intenzív T-sejt proliferációhoz vezet (29, 30). Legújabban azt is kimutatták, hogy a dendritikus sejtekben kifejeződő FcRn részt vesz az antigén-IgG kereszt-prezentációjában is, amellyel a citotoxikus T-sejteket ($CD8^+$) aktivál (31).

Megjegyzendő, hogy az FcRn antigén-prezentációban és a humorális immunválaszban betöltött szerepének fentiekben történő pontos karakterizálását saját eredményeink megelőzték, amelyekben az FcRn fokozott kifejeződését mutató Tg egerekben lényegesen nagyobb számú antigén-specifikus B-sejtet és jelentősen magasabb antigén-specifikus ellenanyag títert mértünk már a 2006-2007-es években (részletesen ld. később). Ezek szabadalmi bejelentése is ekkor történt (32) és ennek megfelelően kaptunk erre az eljárásra szabadalmi védettséget (33, 34).

Saját eredmények a pályázat megkezdése előtt:

A 2000-es években Dr. Bősze Zsuzsanna munkacsoportjával (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont) együttműködve olyan Tg egereket hoztunk létre, amelyek az endogén egér FcRn (mFcRn) mellett, további öt kópia szarvasmarha FcRn-t (bovin FcRn, bFcRn) fejeztek ki (35). Munkacsoportunk kimutatta, hogy ezek a bFcRn Tg egerek immunizálás hatására fokozott mértékben termelnek antigén-specifikus IgM és IgG izotípusú ellenanyagokat, valamint nagyobb méretű lépük több antigén-specifikus IgM és IgG típusú B-sejtet és plazmasejtet, továbbá neutrofil granulocitát és dendritikus sejtet tartalmaz, mint a vad típusú (vt) kontroll állatoké (36). Mindezek hatására több antigén-specifikus monoklonális ellenanyagot termelő hibridómát tudtunk az immunizált Tg egerek lépsejtjeiből előállítani, anélkül, hogy ezek a Tg állatok spontán autoimmunitást mutatnának (37); valamint gyengén immunogén antigének ellen is megfelelő immunválasz alakult ki (38).

Mindezek alapján szerettünk volna további információkhoz jutni arra vonatkozóan, hogy a bFcRn kifejeződés fokozódása milyen mechanizmusokon keresztül befolyásolja a bFcRn Tg egerek humorális immunválaszát. Bízunk abban, hogy a tervezett alapkutatói kísérletek eredményei hozzájárulnak ezeknek a mechanizmusoknak a pontosabb értelmezéséhez, amelyek egyfelől segíthetnek abban, hogy ezt az eljárást hatékonyan bemutassuk a terápiás ellenanyagokat fejlesztő cégek kutatóinak, illetve alkalmasak arra, hogy az eljárásunkkal kapcsolatos szabadalmi eljárásokat hatékonyabban lefolytassuk, és a szabadalmakat megszerezhessük.

2. A pályázat legfontosabb célkitűzései:

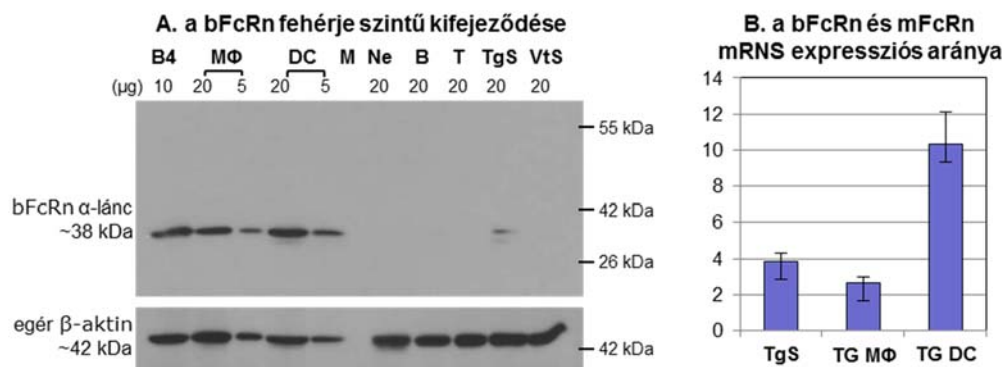
- 2.1. *Hogyan befolyásolja a professzionális antigén-prezentáló sejtek (pl. dendritikus sejtek) FcRn kifejeződésének fokozódása az antigén prezentációt?*
- 2.2. *Megváltozik-e a lép és/vagy más másodlagos nyirokszerv szöveti szerkezete, immunizálás előtt, ill. azt követően a bFcRn Tg egerekben, nem gén-módosított kontroll egerekkel összehasonlítva?*
- 2.3. *Befolyásolja-e az FcRn - az antigén prezentáción keresztül - a humorális immunválasz diverzitását? Az FcRn kifejeződés fokozódása növeli-e az immunglobulin készletet a bFcRn Tg egerekben normál, nem gén-módosított egerekkel összehasonlítva?*

3. Eredmények és értelmezésük

1.1. A bFcRn kifejeződik a bFcRn Tg egér APC sejtjeiben és hatékonyabb antigén prezentációt eredményez

In vitro vizsgálatok - A hatékonyabb humorális immunválasz, a nagyobb lép, és a több lépsejt, ill. a fokozott mértékű antigén(Ag)-specifikus B-sejt aktiválódás az immunizált Tg állatokban (36) meglepő eredmény volt, mivel ilyen változásokat korábban nem mutattak ki a vad típusú és FcRn-t nem expresszáló (knock-out; KO) egerek összehasonlítása kapcsán (39).

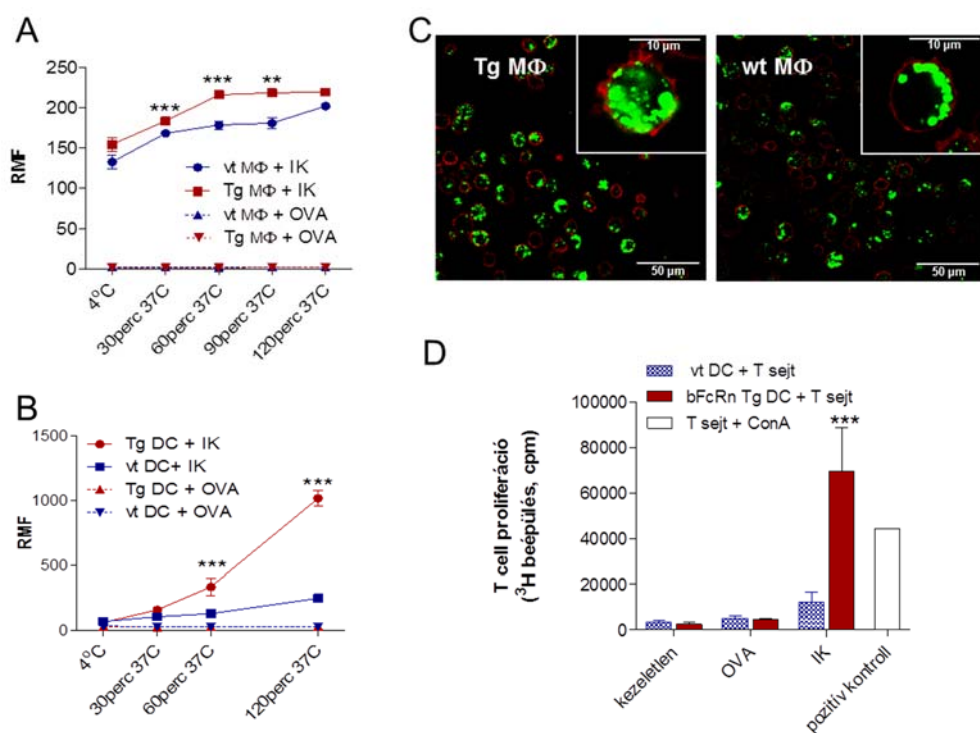
Az általunk tapasztalt jelenségek pontosabb értelmezéséhez vizsgáltuk az immunválaszban kitüntetett szerepet játszó egyes immunsejtek – lépből izolált B- és T-sejtek, hasüregből izolált neutrofil granulociták, és makrofágok (MΦ), illetve a csontvelőből érlelt dendritikus sejtek (DC) – bFcRn expresszióját. Mivel a Tg egerek a bFcRn α-lánc mellett az egér FcRn α-láncot is kifejezik, kifejlesztettünk egy olyan monoklonális ellenanyagot, amely



2. ábra – **A.** Western blot: a vizsgált immunsejt populációk közül a hasüregi makrofágok (MΦ), és csontvelői eredetű dendritikus sejtek (DC) nagyon erősen kifejezik a bFcRn α-láncot, míg a hasüregi neutrofil granulocitákban (Ne), a lépből izolált B- és T-sejtekben (B, T) nem tudtuk a transzgén kimutatni. A Tg lépben (TgS) vélhetően a MΦ és DC jelenlétét detektáltuk. Az ellenanyag bFcRn α-lánc specifikusságát a vt egerek lépének (VtS) elemzése mutatta. A mintákból azonos mennyiséget töltöttünk be (illetve a MΦ és DC esetén egy kisebb mennyiséget is), amelyet a blot újbóli hibridizációjával, az egér β-actin kifejeződésének elemzésével kontrolláltunk. **B.** Q-PCR elemzéssel kimutattuk, hogy a bFcRn és egér FcRn (mFcRn) α-lánc mRNS kifejeződés aránya a TgS és MΦ mintákban 3,8 és 2,6-szoros volt, míg a DC mintában 10-szeres értéket mutatott.

csak a bFcRn α-láncot ismeri fel (1E5/2). Megállapítottuk, hogy a vizsgált immunsejt populációk közül a hasüregi makrofágok (MΦ), és csontvelői eredetű dendritikus sejtek (DC) jelentős mértékben kifejezik a bFcRn α-láncot, míg a hasüregi neutrofil granulocitákban, a lépből izolált B- és T-sejtekben (B, T) nem tudtuk a transzgén kifejeződését kimutatni; ill. a Tg lépben (TgS) vélhetően a MΦ és DC által kifejezett bFcRn-t detektáltuk (**2A. ábra**). A

monociták, makrofágok és dendritikus sejtek FcRn expresszióját már korábban kimutatták, bár funkcióját akkoriban nem sikerült azonosítani (26). Megállapítható tehát, hogy a bFcRn kifejeződése a Tg egerek MΦ és DC sejtjeiben nem minősül ektopikusnak, és vélhetően hozzájárul ezekben a sejtekben kifejeződő mFcRn molekulák funkciójához. Kvantitatív PCR (Q-PCR) elemzéssel kimutattuk, hogy a bFcRn és mFcRn α -lánc mRNS kifejeződésének aránya a TgS és MΦ mintákban 3.8- és 2.6-szoros volt, míg a DC mintában 10-szeres értéket mutatott (**2B. ábra**). Ez arra utal, hogy a bFcRn sejtípustól függően, de sokkal nagyobb mértékben fejeződik ki, mint az egér FcRn (mFcRn), azaz az 5 kópia bFCGRT hatékonyan expresszálódik a Tg állat sejtjeiben (40). A DC-ben tapasztalt sokkal intenzívebb bFcRn kifejeződés hátterében az állhat, hogy a DC érlelése során alkalmazott citokin stimulus (IL-4, GM-CSF) és következményes NF- κ B transzkripciós faktor aktiválódás hatására a bFCGRT promotere intenzívebb transzkripciót mutat (41) (ill. ld. később részletesen), mint az egér FCGRT promotor, amelyről NF- κ B függőséget nem mutattak ki (42).



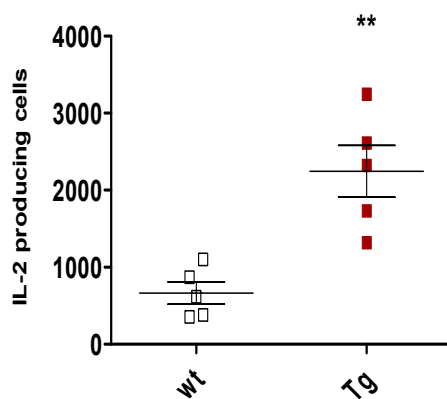
3. ábra – Tg és vt egerekből izolált **A.** hasúri MΦ és **B.** csontvelői DC ^{Alexa}OVA-IgG IK és ^{Alexa}OVA időfüggő felvétele (a felvétel mértékét citofluoriméterrel határoztuk meg; az eredményeket a relatív átlagos fluoreszcencia intenzitásában - RMF - fejeztük ki). **C.** MΦ ^{Alexa}OVA-IgG IK felvételének konfokális mikroszkópos elemzése. **D.** Tg és vt csontvelői DC sejtekhez jelöletlen OVA-IgG IK-t, vagy OVA-t adtunk, majd később olyan CD4⁺ T-sejteket, amelyeket OVA TCR (DO11.10) Tg egerekből izoláltunk; ill. pozitív kontrollként a T-sejteket ConA-val stimuláltattuk. A T-sejt proliferáció mértékét ³H-timidin beépülésének mértékével értékeltük. Az egyes adatpontok 3-3 mérés átlagát mutatják \pm SEM (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Kutatásainkkal egy időben több tanulmány is beszámolt arról, hogy a professzionális antigén prezentáló sejtekben kifejeződő FcRn fontos szerepet tölt be az antigén-IgG immunkomplexek (Ag-IgG IK) lizoszómába juttatásában és ezáltal hozzájárulnak az ilyen antigénekből képződő epitópok prezentációjában (28-31, 43). Mindezek alapján azt elemeztük, hogy a fokozott bFcRn kifejeződés milyen mértékben befolyásolja az antigén prezentációt a DC sejtekben. Vizsgálatainkhoz Alexa Fluor 488 konjugált OVA-IgG immunkomplexet (^{Alexa}OVA-IgG IK) készítettünk és elsőként azt vizsgáltuk, hogy a Tg és vt állatokból származó

hasüregi MΦ és csontvelői eredetű DC sejtek milyen mértékben veszik fel ezt az immunkomplexet. Vizsgálataink kimutatták, hogy a bFcRn fokozott kifejeződése a Tg MΦ (CD11b⁺Gr1⁻) és DC (MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺) sejtekben jelentősen növelte az OVA-IgG IK felvételét (a fokozott mértékű felvételt konfokális mikroszkóppal erősítettük meg), míg az OVA felvételében nem tudtunk különbséget kimutatni a Tg és vt sejtek között (**3A-C. ábra**) (40).

A Tg és vt sejtek FcγR, MHC II, B7.1 és B7.2 kifejeződésében nem találtunk különbséget, amely megegyezik egy másik elemzéssel, amelyben vt és mFcRn KO egerek MΦ és DC sejtjeinek MHC II és kostimulátor molekuláit vizsgálták (30). Mivel az Ag-IgG IK a sejtek felszínén lévő Fcγ receptorokhoz kapcsolódik először és ezek számában nem találtunk különbséget a Tg és vt sejtek esetén, a fokozott Tg IK felvétel alapján feltételezzük, hogy az Fcγ receptorok által közvetített endocitózis, illetve az IK intracelluláris felhalmozódása az FcRn-től is függő folyamat lehet. Ismert ugyan, hogy az FcRn kis mennyiségben a sejt felszínén is kifejeződik, ám az extracelluláris tér (vagy esetünkben a médium) kémhatása neutrális, ami nem kedvez az FcRn-IgG kapcsolat kialakulásának. E kérdés tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Ezt követően azt elemeztük, hogy a Tg és vt egerekből származó csontvelői eredetű DC sejtek milyen mértékben stimulálják a CD4⁺ T-sejtek proliferációját. Ehhez a DC sejtekhez jelöletlen OVA-IgG IK-t adtunk, majd később olyan CD4⁺ T-sejteket, amelyeket OVA-specifikus TCR (DO11.10) Tg egerekből izoláltunk. A T-sejtek sejtosztódását jelző ³H-timidin beépülés mértéke alapján megállapítottuk, hogy Tg DC sejtek sokkal nagyobb mértékben aktiválták a CD4⁺ T-sejteket, mint a vt egerekből származó DC sejtek (**3D. ábra**). A Tg és vt sejtek FcγR, MHC II, B7.1 és B7.2 kifejeződésében ebben a kísérletben sem találtunk különbséget (40).

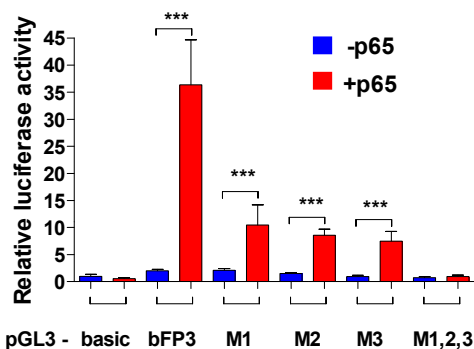


4. ábra – bFcRn Tg egerekből származó lépsejtek háromszor annyi aktivált, antigén-specifikus Thelper sejtet tartalmaznak immunizálás és ex vivo stimulást követően.

Az antigén prezentáció ex vivo vizsgálata - A Tg DC sejtek fokozott antigén-prezentációját, ill. T-sejt aktiválását *ex vivo* vizsgálattal is igazoltuk. Az állatokat ovalbuminnal immunizáltuk, majd az immunizálás 35. napján lépsejtjeiket izoláltuk és ovalbuminnal *ex vivo* restimuláltuk. 22 órával ezt követően az aktivált (ovalbumin specifikus) T-sejtek számát IL-2 specifikus ELISPOT elemzéssel meghatároztuk. A Tg állatok lépében mintegy háromszor annyi aktivált, antigén-specifikus Thelper-sejtet tudtunk kimutatni, mint a vt kontrollok esetén, ami megerősítette *in vitro* megfigyeléseinket (**4. ábra**) (44, 45).

A bFcRn kifejeződését fokozza az NFκB szignalizáció, különös tekintettel az APC sejtekben

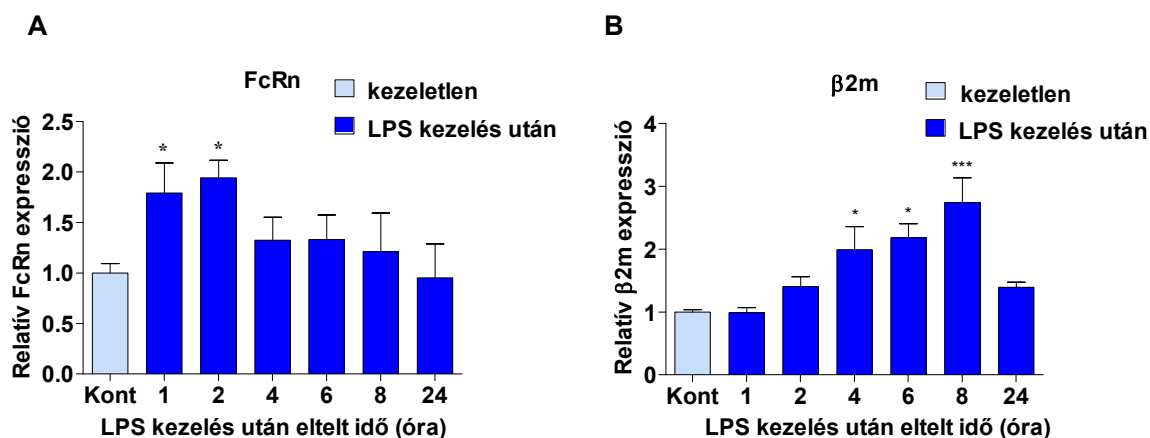
Munkacsoportunk korábban izolálta és meghatározta a bFcRn α-lánc 5'-végét határoló 1800 nukleotid hosszúságú szakaszának szekvenciáját (35). A promoter szakasz *in silico* elemzése azt mutatta, hogy az egér és humán homológokhoz hasonlóan, a bFcRn α-lánc 5'-végét határoló régió sem tartalmaz TATA boxot, de Sp1, C/EBPβ, prolactin response factor MGF/STAT5, interferon response elements IRF1/IRF2 és AP-1 TF kötő helyek mellett, 3 NF-κB kötő helyet mutat (46). Közülük a legígéretesebb transzkripciós faktor kötőhelyek - NF-κB - funkcionális elemzéséhez már korábban különböző hosszúságú bFcRn promoter-luciferáz riportergén expressziós vektort állítottunk elő, és kimutattuk, hogy a humán p65 vektor kotranszfekciója aktivitást vált ki a bFcRn promoter konstrukciókat is tartalmazó sejtekben. A promoter szakaszok rövidítésével meghatároztuk a lehetséges NF-κB kötőhelyeket, amelyeknek kötőképességét PCR alapú mutagenézissel töröltük. Ennek hatására a promoterek indukálhatósága csökkent. Ha mindhárom kötőhelyet egyszerre mutáltuk, az indukálhatóság megszűnt (5. ábra). Az *in vitro* luciferáz riportergén kísérleteket EMSA (electromobility shift assay) vizsgálatokkal is megerősítettük és igazoltuk, hogy mind a három NF-κB kötőhely érzékeny az NF-κB-aktivációra (47). Ezeket a vizsgálatokat ezt követően az általunk izolált és karakterizált szarvasmarha p65 transzkripciós faktorról (48) is elvégeztük és hasonló eredményt kaptunk.



5. ábra - Normál (bFP3) és mutált (M1, M2 és M3) bFcRn promoter luciferáz riportergén konstrukciók indukálhatósága humán p65 overexpresszióval HC11 sejtekben. Ha mindhárom NF-κB kötőhelyet egy konstrukción belül töröljük, a promoter indukálhatósága megszűnik.

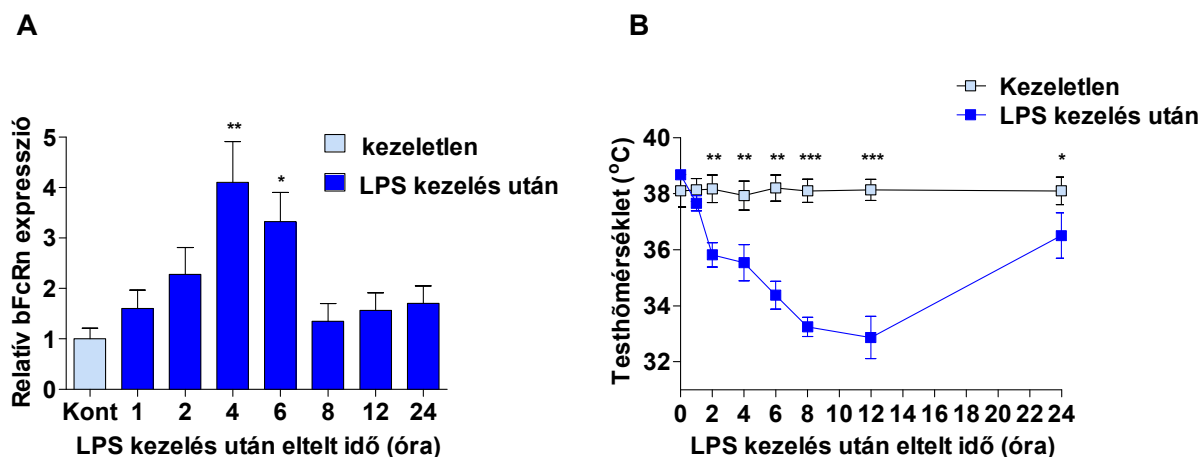
Bár ez a kutatási irány nem szerepelt pályázati terveink között, az időközben kifejlesztett kvantitatív PCR beállításával és a bFcRn specifikus monoklonális ellenanyagok kifejlesztésével a korábbi – promoter szintű – megfigyeléseinket funkcionális vizsgálatokkal egészíthettük ki, és ezáltal az NFκB bFcRn indukáló hatását validálhattuk. Jelen pályázat kapcsán a bFCGRT NF-κB indukálhatóságát egy primer szarvasmarha

endothel sejtvonalon (BAEC) teszteltük, amelynek bFcRn kifejezését előzőleg reverz-transzkriptáz PCR módszerrel ellenőriztük. A sejtekben az NF-κB hatását lipopoliszacharid (LPS) stimulussal váltottuk ki, majd a bFcRn és β2m gének expresszióját valós idejű (real-time) PCR technikával határoztuk meg 1, 2, 4, 6, 8 és 24 óra elteltével. Míg a bFcRn esetében a mRNS expresszió az alapszinthez képest kétszeres emelkedéssel a kezelést követő második órában érte el maximumát, a β2m mRNS expresszió a kezelést követő 8. óráig fokozatosan emelkedett és ekkor az alapszinthez képest 2.8-szoros emelkedést mutatott. A kezelést követő 24. órára mindkét gén mRNS expressziója alapszintre tért vissza (6. ábra) (41).



6. ábra - LPS kezelés hatása a bFcRn, szarvasmarha β 2-mikroglobulin (β 2m) génexpresszióra BAEC sejtekben. A mRNS szinteket real-time PCR segítségével határoztuk meg kezeletlen és LPS-sel kezelt BAEC sejtekből származó mRNS kivonatokból. Az LPS kezelést 1, 2, 4, 6, 8 illetve 24 óráig alkalmaztuk. (A) A bFcRn expresszió a kezelést követő második, a (B) β 2m gén expresszió pedig a 8. órában érte el maximumát. Ezekben az időpontokban a bFcRn esetében 2-szeres, a β 2m esetében 2,8-szoros expressziós szint emelkedést tapasztaltunk. A grafikonokon a ubiquitin génre normalizált és a kezeletlen sejtek mintáiban mért értékekhez viszonyított relatív génexpressziót ábrázoltuk. Az oszlopok három párhuzamos minta átlagát mutatják \pm SEM (*, $p < 0.5$; **, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

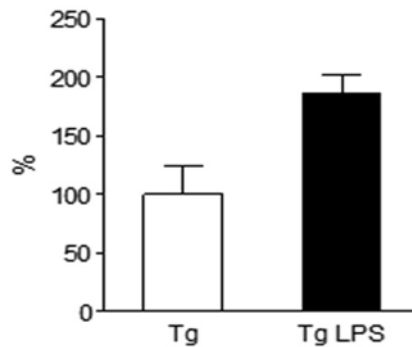
Következő kísérleteinkben arra kerestük a választ, vajon LPS kezelés hatására fokozódik-e a bFcRn expresszió *in vivo*, a bFcRn Tg egerekben. Az egerek hasüregébe LPS-t fecskendeztünk, majd a lépükből és a májükből kivont mRNS-ből, bFcRn specifikus Northern blot segítségével meghatároztuk a bFcRn gén expresszió mértékét. Az LPS-sel kezelt Tg egerek lépében a bFcRn gén gyors indukcióját figyeltük meg, amely a kezelést követő 4. órában érte el maximumát és mintegy 4-szeres emelkedést mutatott az alapállapothoz képest, majd a 8. órában visszaállt a kiindulási értéket megközelítő szintre (**6. ábra**).



7. ábra - A bFcRn gén expressziója LPS hatására fokozódik a bFcRn tg egerek lépsejtjeiben. - mFcRn^{-/-}/bFcRn^{+/+} transzgenikus egereket 250 μ g/100 g LPS-sel oltottunk i.p. (A) 1, 2, 4, 6, 8, 12 és 24 órával az LPS oltás után Northern blottal meghatároztuk a bFcRn gén expressziós szinteket az állatok lépsejtjeiből nyert mRNS kivonatokból. A legmagasabb bFcRn expressziót (4x) a kezelést követő 4. órában tapasztaltunk. A grafikonon a mRNS betöltési mennyiségre normalizált és a kezeletlen egerek mintáiban mért értékekhez viszonyított relatív génexpressziót ábrázoltuk. Az oszlopok három párhuzamos minta átlagát mutatják \pm SEM (*, $p < 0.5$; **, $p < 0.01$). (B) Minden mintagyűjtési időpontban mértük a kontroll és LPS-sel kezelt állatok testhőmérsékletét. Az értékek 3 állatból mért adatok átlagát mutatják \pm SEM (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Az LPS oltás hatékonyságát az állatok testhőmérsékletének mérésével monitoroztuk. Az LPS indukálta testhőmérséklet változás az irodalmi adatokkal egybevágóan (49) folyamatos csökkenést mutatott, majd 24 óra elteltével normalizálódott (7. **ábra**). A bFcRn génexpresszió LPS hatására bekövetkezett dinamikája a lépben jó egyezést mutatott a BAEC sejtekben megfigyelt génexpressziós változással (41).

Az újonnan kifejlesztett bFcRn-specifikus monoklonális ellenanyagunkkal (6D5/8) azt is ki tudtuk mutatni, hogy LPS kezelés hatására fokozódik a Tg egérből származó peritoneális MΦ-ok bFcRn kifejeződése (8. **ábra**). Bár kísérleti bizonyítékot nem sikerült szereznünk,

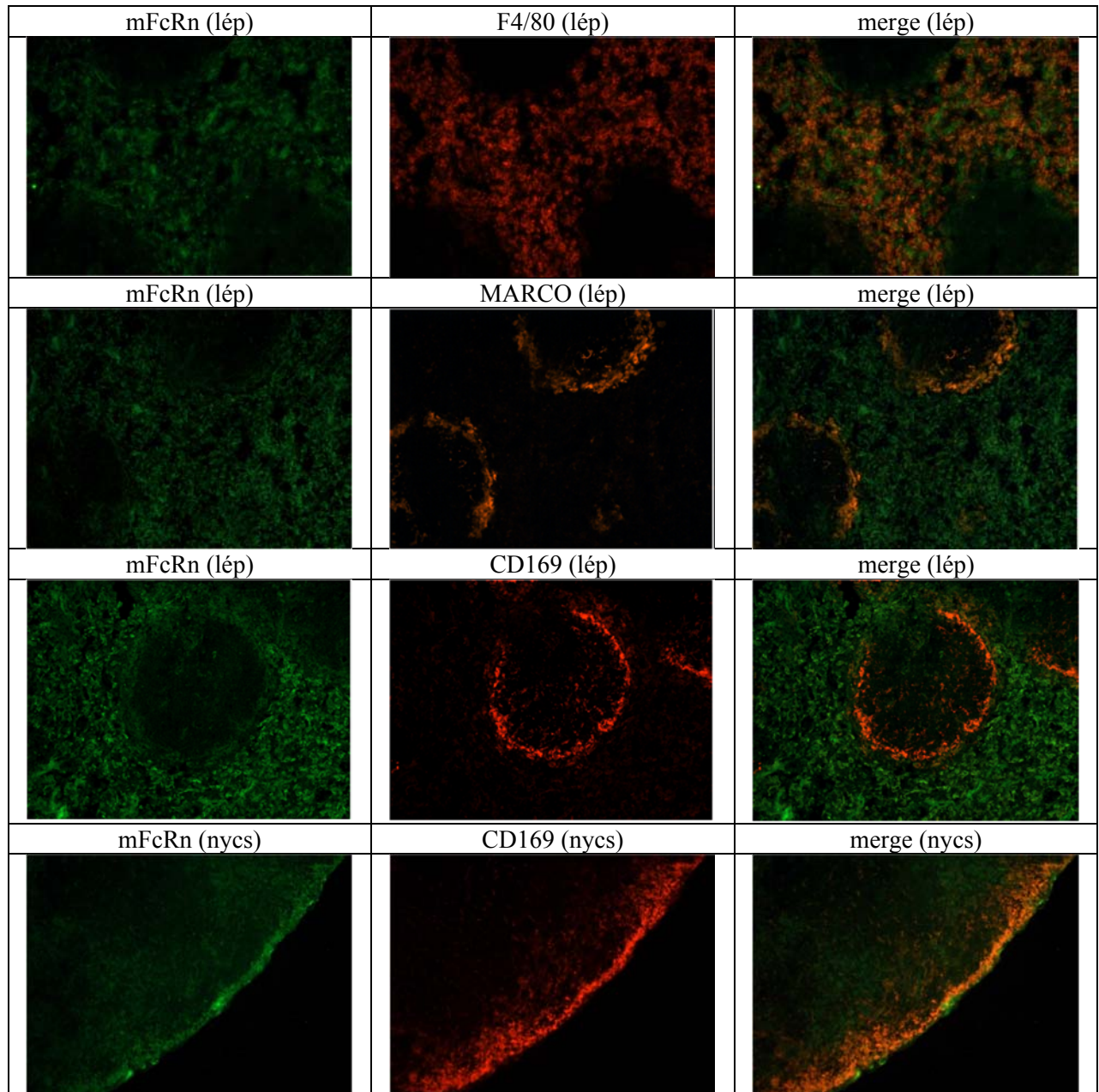


8. **ábra** - LPS kezelés hatására fokozódik a Tg egerek makrofágjainak bFcRn kifejeződése áramlási citofluoriméter elemzéssel.

véleményünk szerint a csontvelői eredetű DC-ben tapasztalt sokkal intenzívebb bFcRn kifejeződés (a peritoneális makrofágok bFcRn kifejeződéséhez képest) (2. **ábra**) háttérben az állhat, hogy a DC érlelése során alkalmazott citokin stimulus (IL-4, GM-CSF) és következményes NF- κ B transzkripciós faktor aktiválódás hatására a bFCGRT promotere intenzívebb transzkripciót mutat, mint az egér FCGRT promoter, amelyről NF- κ B függőséget nem mutattak ki (42). Mindez arra utal, hogy a helyi gyulladásos citokinek hatására, ami pl. az immunizálás kapcsán bejuttatott adjuvánsok hatására szabadul fel, a bFcRn funkciója optimális az antigén-prezentációs folyamatokban (41).

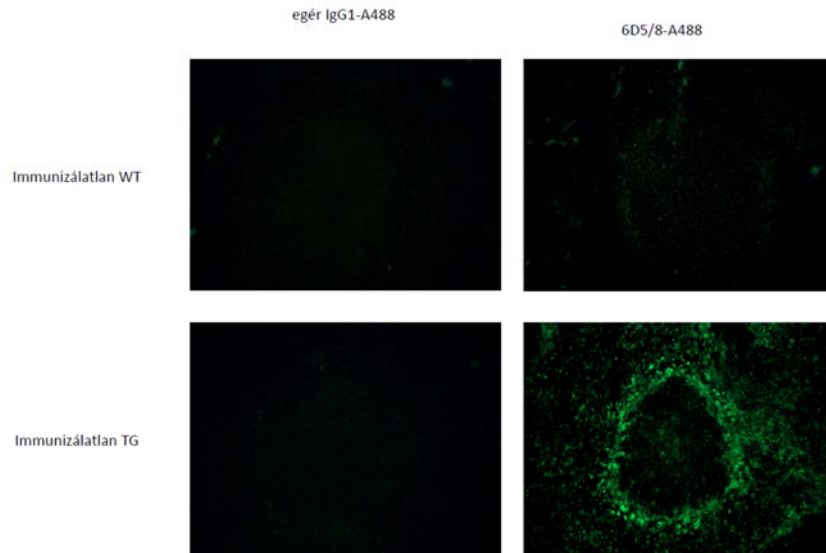
1.2. A bFcRn kifejeződik a Tg lép és nyirokcsomó APC sejtjeiben, ill. a Tg lép és nyirokcsomó szerkezete nem tér el a vt egerek szerveinek struktúráitól

Az egér FcRn (mFcRn) a lépben a vörös pulpa makrofágokban, és a marginális zóna (MZ) makrofágokban, a nyirokcsomóban pedig a szubkapszuláris szinusz makrofágokban és a folliculusok közti tér makrofágjaiban fejeződik ki (50). Kutatásaink első lépéseként saját rendszerünkben is meghatároztuk az mFcRn lokalizációját, normál lép és nyirokcsomó metszeteken, egy mFcRn-specifikus hörcsög antiszérum segítségével, amit Dr. Akilesh (Washington University, St. Louis, MO, USA) bocsájtott rendelkezésünkre (50). Vizsgálataink kapcsán megállapíthattuk, hogy az mFcRn mind a lépben, mind a nyirokcsomóban az irodalmi adatoknak megfelelően lokalizálódik, azzal a kiegészítéssel, hogy a lép MZ makrofág sejtek két típusát is elemeztük, és az mFcRn erősebben fejeződik ki a belső zónában található CD169+ marginális metallofil makrofágokban, és kisebb mértékben a külső zónában található MARCO+ MZ makrofágokban. Az irodalmi adathoz hasonló festődést kaptunk a nyirokcsomóban is, azaz az mFcRn a CD169+ szubkapszuláris szinusz makrofágokban és a folliculusok közti tér makrofágjaiban fejeződik ki (9. **ábra**). Vizsgálataink nem mutattak különbséget immunizálatlan (9. **ábra**) és immunizált minták között. (Nem specifikus hörcsög szérummal, mint kontrollal festve nem kaptunk specifikus festődést.)



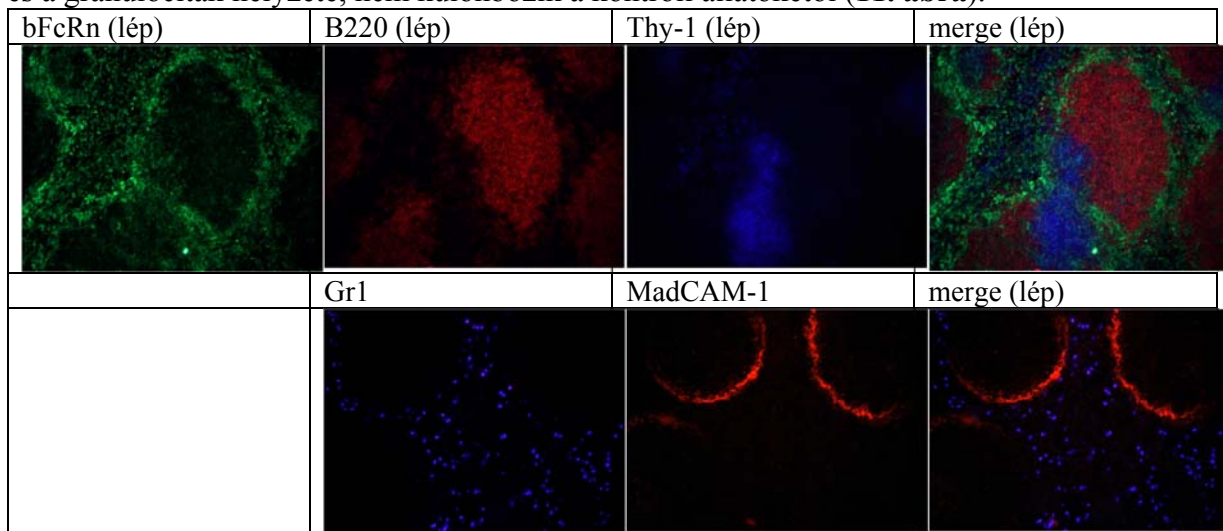
9. ábra – az endogén mFcRn lokalizációja immunizálatlan lépben és nyirokcsomóban (hasonló eredményt kaptunk immunizált mintáknál is). A vt szövetmintákat egy mFcRn specifikus hörszög antiszérummal (Dr. Akilesh ajándéka), ill. makrofág specifikus (F4/80), MZ makrofág specifikus (MARCO) és marginális metallofil makrofág (CD169), ill. a nyirokcsomóban (nycs) a szubkapszuláris szinus makrofág (CD169) specifikus ellenanyagokkal lokalizáltuk.

Pályázatunk kapcsán két, nagy specifikusságot mutató bFcRn specifikus monoklonális ellenanyagot (mAb) fejlesztettünk ki. Az egyiket (1E5/2) a már korábban bemutatott Western blotban alkalmaztuk (**2. ábra**). A másik ellenanyag (6D5/8) szintén nem reagál a Tg egerekben endogén kifejeződő egér FcRn molekulával (**10. ábra**).



10. ábra - a 6D5/8 mAb specifikusan reagál a bFcRn molekulával, de nem jelöli az egér FcRn-t.

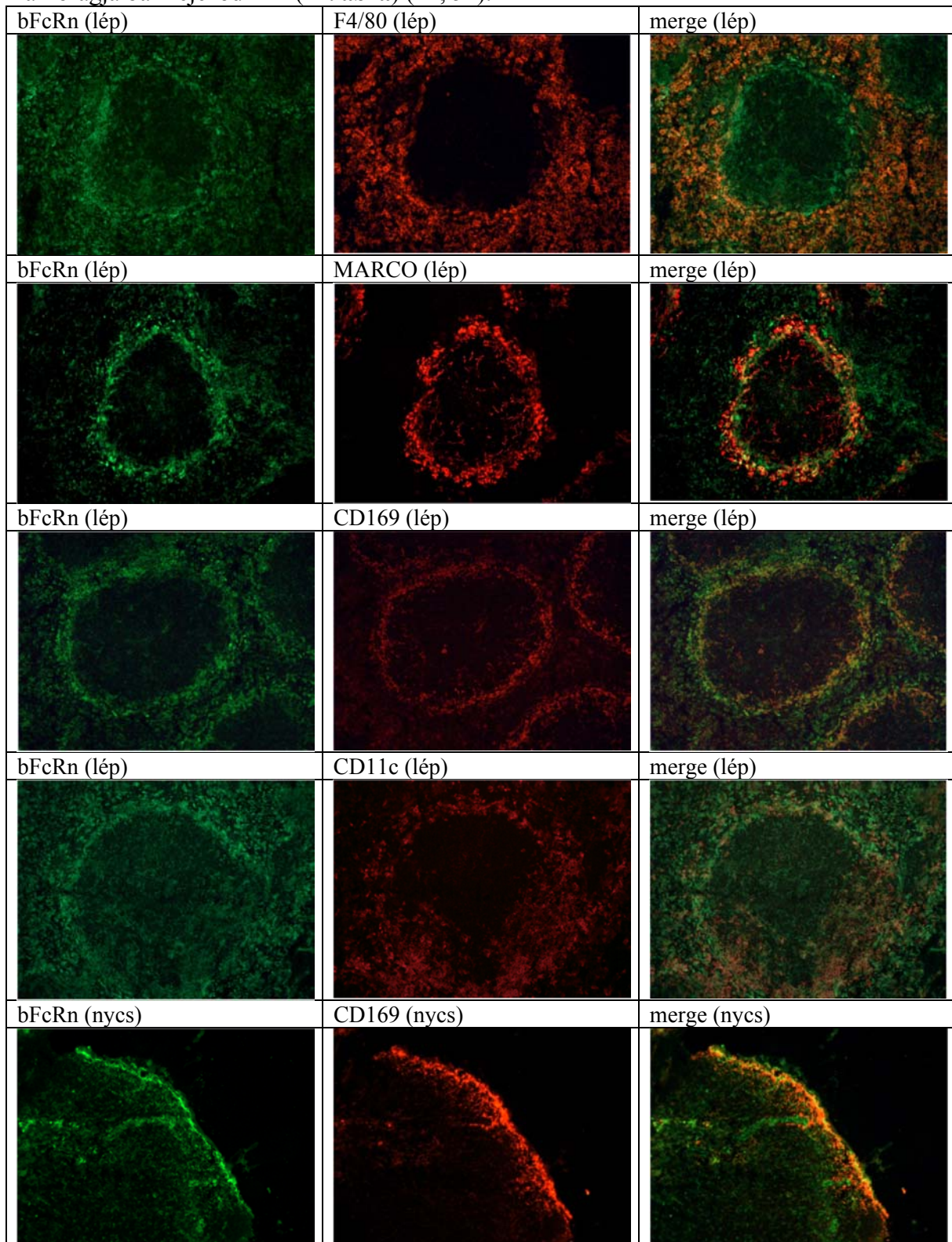
A továbbiakban a 6D5/8 mAb-al és az egyes sejttípus-specifikus reagensekkel festettük a bFcRn Tg egerek lép és nyirokcsomó immunizálatlan és immunizált metszeteit. Ezek kapcsán elsőként azt vizsgáltuk, hogy a Tg lép szerkezete mennyire hasonlít a kontroll állatok lépéhez, vagy attól esetleg eltérő. Megállapítottuk, hogy a Tg egerek lépének szerkezete, a B-sejtes folliculusok, csíráközpontok, a T-sejtes zóna lokalizációja, a marginális szinusz endotélsejtek és a granulociták helyzete, nem különbözik a kontroll állatokétól (**11. ábra**).

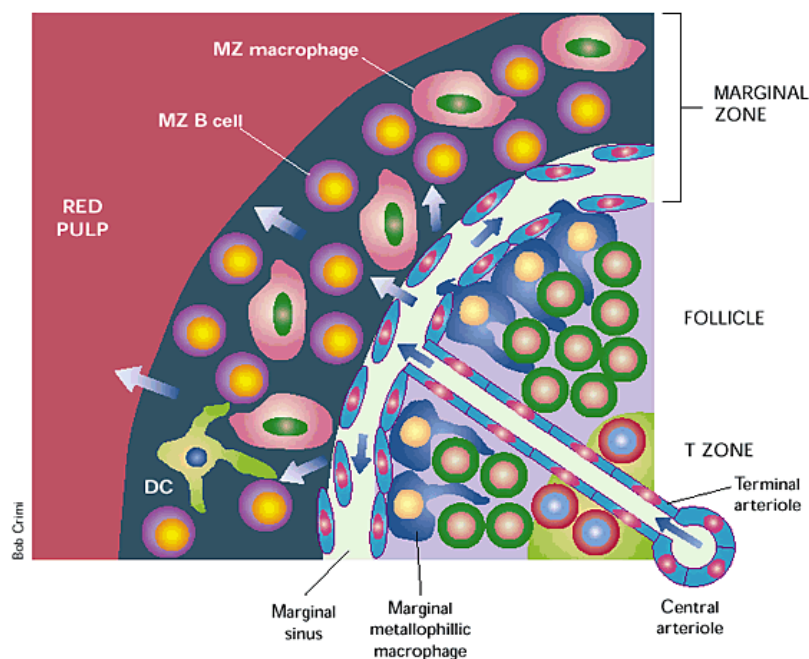


11. ábra – immunizálatlan bFcRn Tg egerek lépének immunhisztokémiai elemzése, bFcRn, B sejtek (B220), T-sejtek (Thy-1), granulociták (Gr1) és marginális szinusz bélő endotélsejtek (MAdCAM) kimutatásával. A Tg lép szerkezete, a B – és T-sejtes zónák hasonló módon elkülönülnek, mint a kontroll állatok esetében (az immunizált állatok metszetei hasonló szerkezetet mutattak).

Ezt követően kimutattuk, hogy a bFcRn jelentős mértékben fejeződik ki a MARCO+ MZ makrofágokban, valamint a CD169+ marginális metallofil makrofágokban. Ezek a sejtek lényegesen nagyobb mértékben fejezik ki a bFcRn-t, mint az mFcRn-t. A bFcRn az F4/80+ vörös pulpa makrofágokban is kifejeződik, valamint a dendritikus sejtek mintegy 10-20%-ban is jelen van. Érdekes megfigyelésünk, hogy a csíráközpontok belsejében szóróványosan bFcRn pozitív sejteket detektáltunk, amelyeknek egy része kolokalizációt mutat a folliculusban lévő MARCO+, vagy CD169+ sejtekkel. A Tg nyirokcsomóban az mFcRn lokalizációjához

hasonlóan a CD169+ szubkapszuláris szinusz makrofágokban és a folliculusok közti tér makrofágjaiban fejeződik ki (**12. ábra**) (44, 51).





13. ábra – Az egér lép MZ szerkezete. A centrális arteriolából kiágazó terminális arteriolák ágai a B sejttes folliculust kívülről határoló marginális szinuszba futnak. Ennek a külső sejtsorában réseket találunk, amelyeken keresztül a vér a vörös pulpa felé áramlik és eközben átmossa az MZ B-sejteket (lila), a MARCO+ MZ makrofágokat (rózsaszín) és dendritikus sejteket (zöld). A késsel jelzett metallofil makrofágok a szinusz belső felületénél vannak, és szintén a marginális zónát alkotják. A folliculáris B sejtek zöldek, míg a T-sejt zóna T-sejtjei pirosak (*Jason G. Cyster: B cells on the front line Nature Immunology* 1, 9 - 10 (2000)).

transzkripció faktor kötőhelyet is tartalmaz – pl. NF κ B – amelyet az egér FcRn promoterében *in silico* elemzéssel nem sikerült kimutatnunk (41). Fontos eredményünk az is, hogy a bFcRn Tg egerek lépének és nyirokcsomójának szerkezete a vizsgált paraméterek vonatkozásában nem tér el a kontroll egerek szerveinek szerkezetétől (**11. ábra**). A lépben és nyirokcsomóban detektált bFcRn és mFcRn lokalizációja, sejttípus specifikussága, és expressziós szintje nem mutatott különbséget az immunizálatlan és immunizált mintákban. Fontos eredményünk, hogy a dendritikus sejtek egy része kifejezi a bFcRn-t, ami jól egybevágh azzal az eredményünkkel, amely a csontvelői dendritikus sejtekben mutatta ki a bFcRn jelenlétét és antigén prezentáló funkcióját (**2-3 ábra**) (40). Ahogy a bevezetőben felvázoltuk, az FcRn az IgG megővésán túl szerepet játszik a fagocitózis és az antigén prezentáció folyamatában is, hozzájárulva a humorális immunválasz kialakulásához (52).

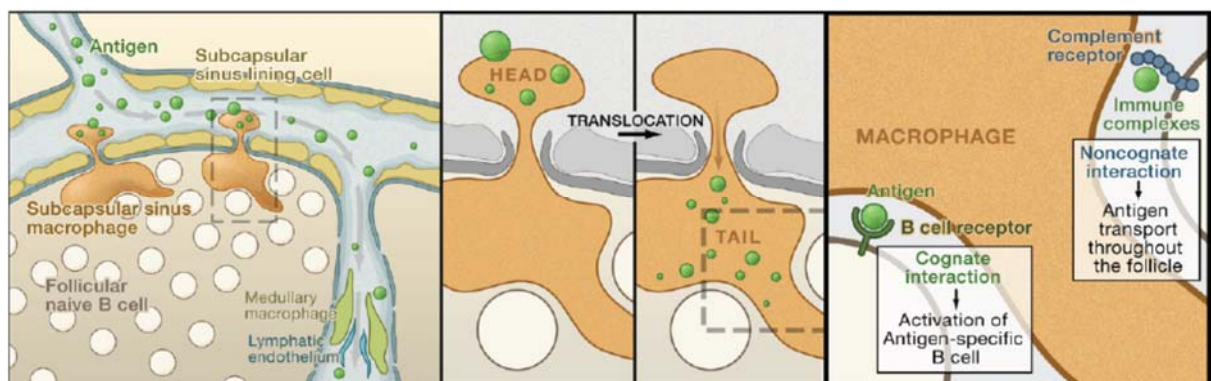
Néhány évvel ezelőtt kimutatták, hogy az FcRn a csontvelői eredetű sejtekben, így az F4/80+ vörös pulpa makrofág sejtekben is kifejeződik és az IgG homeosztázis fő fenntartójaként funkcionál (50). A bFcRn kifejeződése ezekben a sejtekben vélhetően hasonló funkciót tölt be, mint az endogén mFcRn.

A MARCO receptorral jellemezhető marginális zóna makrofág populáció is képes patogének megkötésére, továbbá részt vesz a nyirokcsomó mikrokozonyzatának fenntartásában és a T-independens B-sejt válasz kialakulásában (53). Nemrégiben kimutatták, hogy az Fc γ RII/III receptorokhoz irányított immunkomplexek a MARCO+ marginális zóna makrofágokban lokalizálódnak (54, 55) és mind T-independens, mind T-dependens antigén

Fontos megfigyelésünk, hogy a bFcRn a lépben és a nyirokcsomóban is ugyanazokban a sejtekben fejeződik ki, mint az mFcRn, azaz mindkét gén regulációját ugyanazok a szövet- és sejt-specifikus transzkripció faktorok szabályozzák. Érdekes azonban az a különbség, ami a bFcRn és az mFcRn kifejeződés mértékében mutatkozik. Míg az mFcRn hasonló mértékben fejeződik ki a lép F4/80, és az MZ makrofág sejtjeiben (**9. ábra**), addig a bFcRn szembenítően nagyobb intenzitással festődik a MZ mindkét típusában, azaz a zóna külső peremén lokalizálódó MARCO+ MZ makrofágokban, és a zóna belső részén helyeződő CD169+ marginális metallofil makrofágokban (**13. ábra**). Ez összefüggésben lehet azzal, hogy a bFcRn promotere olyan

esetén növelik a haptén-specifikus IgM és IgG termelő lépsejtek számát (54). Ismeretes az is, hogy a marginális zóna makrofágok MARCO és SIGNR1 receptorai nem csupán az antigének megkötésében játszanak fontos szerepet, hanem ezek a molekulák a marginális zóna B-sejtek antigén kötéséhez is szükségesek (56). A közelmúltban bizonyították, hogy a marginális zóna B-sejtek „ingáznak” a marginális zóna és a B-sejtes folliculusok között és hatékonyan juttatják el az antigént a folliculáris dendritikus sejteknek (57). Az FcRn jelenléte a MARCO+ marginális zóna makrofágokban így hozzájárulhat az IgG-antigén immunkomplexek megkötéséhez, és transzportjához, amely folyamatot a bFcRn Tg egerek fokozott FcRn expressziója hatékonyabbá teheti.

Ismeretes, hogy a másodlagos nyirokszervekben a T sejtek számára az antigéneket a dendritikus sejtek prezentálják. Ugyanakkor, a B-sejtek natív antigének hatására aktiválódnak miután azokat a BCR-en keresztül megkötötték. Ugyanakkor, a folliculusokban lévő B-sejteket a szinuszokban áramló vértől (lép), nyiroktól (nyirokcsomó) az egymással szoros kapcsolatban lévő szinusz endotélsejtek választják el, amelyeken csupán kisméretű antigének diffundálhatnak át és juthatnak el a B-sejtekhez. Az MZ makrofág populációiban kifejeződő FcRn szerepe tisztázásra vár, de e sejtek lokalizációja ideális a vér által szállított antigének megkötésére és továbbítására (**13. ábra**) (58). A lép marginális metallofil makrofágok lokalizáció és fenotípus szempontjából a nyirokcsomó CD169+ szubkapszuláris szinusz makrofágok megfelelői (59, 60). Kimutatták, hogy a szubkapszuláris szinusz makrofágok áttüremkednek a szinusz endotélsejtjei között és sejt felszíni receptorokkal megkötik a szinuszban keringő nagyobb méretű antigéneket, köztük az Ag-IgG IK-et is, majd ezt követően a folliculusokban lévő B-sejteknek juttatják. Ez a folyamat érdekes módon nem jár a megkötött antigének felvételével, hanem azok a makrofágok sejt felszínén, intakt módon transzportálódnak a folliculus belseje felé. Azt is igazolták, hogy a nyirokcsomóban lévő medulláris makrofágokhoz képest ezek a sejtek kismértékben internalizálják és emésztik az Ag-IgG IK-et (lizoszómális aktivitásuk csekély). Nem zárható ki továbbá az sem, hogy az Ag-IgG IK-ek intakt formában transzportálódnak a sejten keresztül (61). Ezáltal nyílik mód arra, hogy a B sejtek az intakt antigént a B-sejt receptorukkal (BCR) megkössék, majd a bekebelezés és feldolgozást követően a T-sejt zóna felé vándorolva MHC II-vel kapcsolt módon prezentálják az időközben aktivált és a B-sejt zóna felé migrált T-sejteknek. Amennyiben nem jön létre BCR specifikus reakció (pl. Ag-IgG IK esetén), akkor az így továbbított antigén-IgG IK a B-sejtek közvetítésével (a B-sejtek 1- és 2- típusú komplement receptorai révén) a folliculáris dendritikus sejtekhez kerülnek (**14. ábra**) (62-64). A közelmúltban a lép marginális metallofil makrofágjainak hasonló szerepét igazolták a T-dependens humorális immunválasz korai szakaszában (65).



14. ábra – A szubkapszuláris szinusz makrofágok mint antigén prezentáló sejtek (Martine-Pomares, Gordon. 2007. *Antigen presentation the macrophage way Cell* 131: 641-643).

További izgalmas megfigyelésünk, hogy a bFcRn határozottan megjelenik a csíráközpontok belsejében is. A kolokalizációs vizsgálatokból látszik, hogy a csíráközpontok belsejében látszó bFcRn specifikus sejtek *egy része* egyben CD169 pozitivitást is mutat, azaz ezek vélhetően a follikulusba migráló metallofil makrofágok. Ugyanakkor egyéb, a GC belsejében lévő, CD169 negatív sejtek is mutatnak bFcRn pozitivitást. Ezek a sejtek akár follikuláris dendritikus sejtek (FDC) is lehetnek, amelyekről leírták, hogy az Ag-IgG IK felvételét követően azokat intakt formában a sejtfelszínre juttatják vissza, azonban ennek mechanizmusát egyelőre nem sikerült tisztázni (66). Ennek jelentősége az, hogy az FDC felszínén hosszú ideig perzisztáló antigének révén valósul meg az affinitás érés folyamata. Amennyiben ez a folyamat hatékonyabb, pl. a bFcRn fokozott mértékű kifejeződése következtében, úgy a csíráközpontban lévő B-sejtek nagyobb mértékben vesznek részt az affinitásérésben, annak intenzitása is növekedhet, ami végül nagyobb affinitású ellenanyagokat eredményezhet. Sem az FDC, sem pedig a MZ makrofágok nem bontják le a felvett immunkomplexeket, hanem a sejtfelszínükön intakt formában megjelenítik azokat. Elképzelhető, hogy az FcRn ebben a folyamatban mind a marginális zóna makrofágjaiban, mind pedig az FDC-ben aktívan részt vevő molekula, amely a reciklizációt végzi. Megjegyzendő, hogy ebben az esetben eltérő funkciót töltene be, mint pl. a dendritikus sejtekben, amelyekben az FcRn az immunkomplexeket a lizoszómába juttatja, és ennek kapcsán fokozza az antigénből származó peptidek MHC II és I töltődését, azaz az antigén prezentációját és keresztprezentációját (52). Mint a következő fejezetben bemutatom, a bFcRn Tg egerekben immunizálás hatására jelentősen megnő a csíráközpontok mérete, amiben elképzelhető, hogy a marginális zóna, ill. a csíráközpontban bFcRn-t kifejező sejtek is szerepet játszanak. *E kérdés további vizsgálata egyik legfontosabb célkitűzésünk.*

1.3. A bFcRn Tg egerekben immunizálást követően nagyobb méretű csíráközpontok figyelhetők meg, és több van belőlük, mint a kontroll egerekben

A csíráközpontok (GC) kinetikai elemzéséhez vt és Tg egereket 21 napos időközzel kétszer immunizáltuk, majd az állatok csoportjait különböző időpontokban (24., 28. és 42. nap) vizsgáltuk. Az állatok szérumból mért antigén-specifikus IgG titere az ismétlődő oltást követően jelentős különbséget mutatott a Tg egerek javára, és az immunizálás végére hétszer nagyobbak bizonyult. A Tg egerek lépének tömege az immunizálás során 80-120 %-kal haladta meg a vt kontrollokét.

Vizsgálataink során összesen 281 vt és 325 Tg csíráközpontot elemeztünk (1. táblázat).

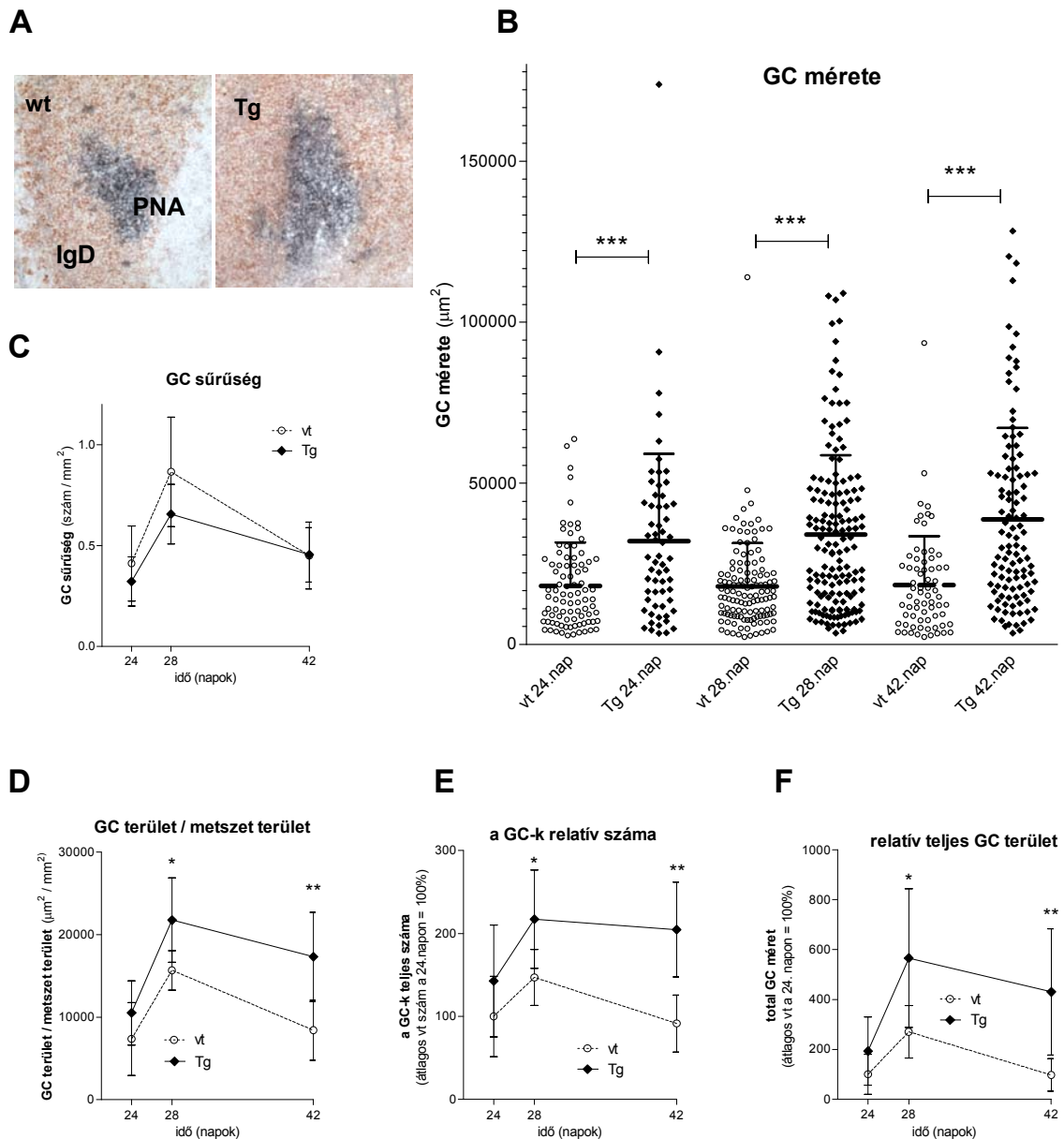
nap ^a	Elemzett GC szám												vt Σ^c	Tg Σ^c
	vt1 ^b		vt2 ^b		vt3 ^b		Tg1 ^b		Tg2 ^b		Tg3 ^b			
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2		
24	26	17	1	12	13	19	4	10	11	20	6	10	88	61
28	14	12	28	20	20	30	23	38	29	38	10	16	124	154
42	19	12	5	13	4	16	11	17	16	37	9	20	69	110
													281	325

^a vt és Tg egerek immunizálása a 0. és 21. napokon történt, a lépmintákat az immunizálás 24., 28. és 42. napján elemeztük

^b a GC-k elemzését két független lép metszeten végeztük állatonként (S1 és S2, a két metszet közti távolság > 500 μ m). Minden időpontban 3 Tg és 3 vt egeret elemeztünk.

^c az egyes időpontokban elemzett GC-k száma összesen

E kísérlettel összefüggő legfontosabb eredményünk, hogy a Tg GC-k mérete átlagosan kétszer volt nagyobb, mint a kontroll állatok esetén. A GC-k sűrűsége nem mutatott eltérést a két állatcsoport között, míg a lépmérettel korrigált relatív GC szám a Tg egerek esetében az immunizálás 28. és 42. napjára 50 illetve 120 %-kal haladta meg a vt egerekben számolt értéket. A GC-k méretét a relatív GC számmal korrigálva megállapítottuk, hogy a Tg egerek lépében az immunizálás 28. és 42. napján jóval nagyobb (110 és 340 %) a GC-k területe, így nagyobb a T-dependens antigénekre adott immunválasz kialakulásáért és az immunglobulinok affinitáséréséért felelős specializálódott mikrokörnyezet (**15. ábra**) (44, 45, 51).

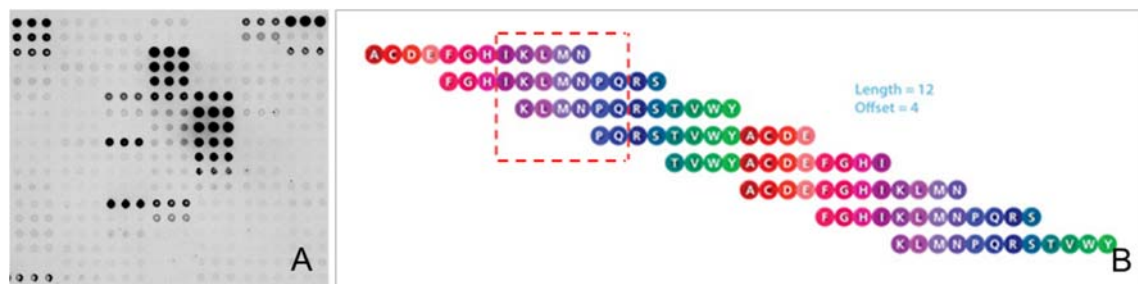


15. ábra - a csiraközpontok (GC) elemzése bFcRn Tg és kontroll egerekben TNP-KLH immunizálást követően. **A.** GC elemzése peanut hemagglutinnal történt, ami a GC B-sejteket elkülönítette a körülötte lévő IgD⁺ naiv B-sejtektől. **B.** a GC-k méretét mutatja; **C.** a GC-k száma egységnyi metszet felszínen; **D.** a GC-k mérete egységnyi metszet felszínen; **E.** a GC-k relatív száma a 24. napi vt számra viszonyítva; **F.** a GC-k relatív felülete a 24. napi vt felületre viszonyítva.

Vizsgálataink megerősítették korábbi eredményeinket, azaz az immunizált Tg egerek lépében szignifikánsan nagyobb méretű és számú GC-t találtunk, ami alátámasztja korábbi eredményeinket, azaz a Tg egerek lépében kifejlődő több antigén-specifikus B-sejtet. Ennek okaként leginkább a hatékonyabb antigén prezentációt, ill. azt követő nagyobb számú, aktivált antigén-specifikus Thelper sejtek szerepét tulajdonítjuk. Az aktiválódott Thelper sejtek azon részéből, amelyek nagy affinitással kapcsolódtak az APC sejtekhez, folliculáris Thelper sejtek képződnek (67). A T-sejt függő humorális immunválasz beindulásakor létrejönnek a csíráközpontok. A GC az elsődleges hely, ahol a B sejtek immunoglobulin (Ig) variábilis V génjének szomatikus hipermutációja, majd a nagy affinitású B limfociták szelekciója történik. A csíráközpontok belsejében található T_{FH} sejtek hatására kialakul az ellenanyag izotípusváltása, illetve létrejönnek az ellenanyag-termelő plazma és a memória B-sejtek. A T_{FH} sejtek alapvetően befolyásolják mindezeket a folyamatokat, ill. a GC-k méretét, kinetikáját. Ismeretes, hogy a rendelkezésre álló antigén, ill. annak prezentációja szoros korrelációt mutat a GC T_{FH} sejtek és a B-sejtek számával (68). *Feltételezésünk szerint a bFcRn Tg egerek lépében ezen T_{FH} sejteknek a száma is növekszik, ami alapvetően hozzájárul a GC méretének és számának növekedéséhez, ill. a humorális immunválasz diverzitásának fokozódásához. A T_{FH} sejtek tanulmányozása szintén elsőrendű célkitűzéseink közé tartozik.*

1.4. A bFcRn Tg egerek immunválasza fokozott diverzitású

Az antigén-specifikus humorális immunkészlet elemzése epitóp-térképezéssel

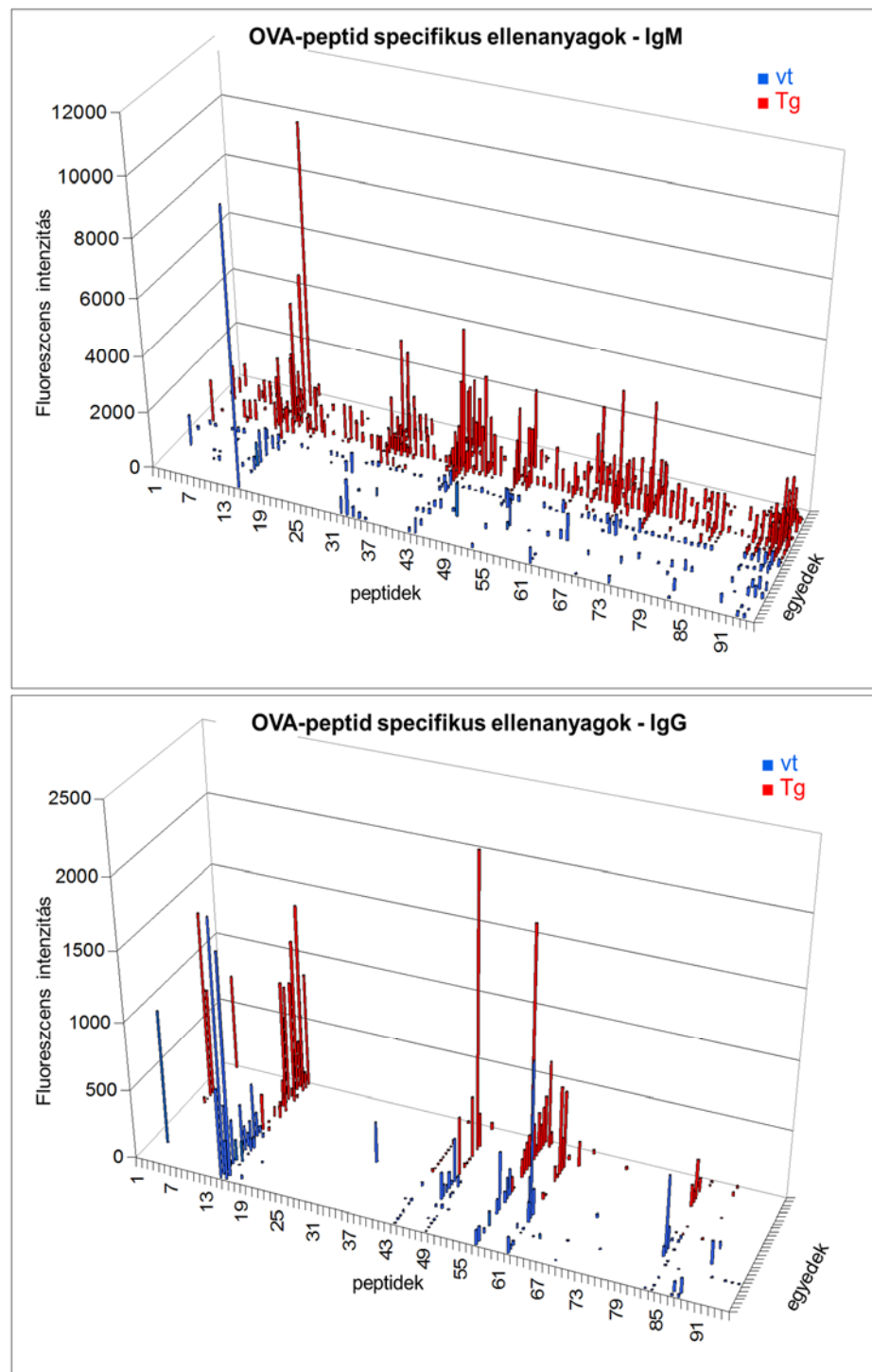


16. ábra – A bFcRn Tg és vt egerek humorális immunválasz diverzitásának elemzését olyan microarray (A) rendszerben teszteltük, amelyre az ovalbumin fehérjét alkotó 95 db. átfedő oligopeptidet konjugáltuk (B). Az egyes epitópot/peptidet felismerő egér IgM vagy IgG ellenanyagot fluoreszcenciával jelölt másodlagos ellenanyagokkal detektáltuk.

A fokozott mértékű humorális immunválasz, ill. ezen belül is a megnövekedett Ag-specifikus IgM szint, illetve a fokozott számú Ag-specifikus IgM-típusú ellenanyagokat termelő B-sejtek, valamint a nagyobb méretű és számú csíráközpontok arra utaltak, hogy a Tg egerek másodlagos nyirokszerveiben intenzívebb a naiv B-limfociták aktiválódása, ami a B-sejt klónok számának fokozásával és ezáltal az ellenanyag repertoár diverzitásának növelésével járhat. Ezt a feltevésünket kétféle módon teszteltük. Első vizsgálatunk során Tg és vt egereket (15 állat/csoport) ovalbuminnal oltottunk, és az immunizálást követően az egyes egerek szérumát egy olyan microarray rendszerben teszteltük, amelyre az ovalbumin fehérjét alkotó 95 db átfedő oligopeptidet konjugáltuk. Az egyes peptidekhez kapcsolódó egér IgM és IgG ellenanyagot fluoreszcenciával jelölt másodlagos ellenanyagokkal detektáltuk (**16. ábra**).

Vizsgálatunk kimutatta, hogy mind a Tg, mind a vt egerek széruma több ovalbumin epitóppal is reagáló ellenanyagot tartalmazott az immunizálás 49. napján. A peptid specifikus IgM ellenanyagok esetén megállapítható volt, hogy a Tg egerek sokkal több epitópot ismertek fel, mint a kontrollok. Ennek magyarázata lehet, hogy a Tg állatokban sokkal nagyobb számú naiv B-sejt aktiválódik és válik IgM termelő plazmasejtté az immunválasz során, mint a vt egerekben. Ezzel szemben nem találtunk számottevő különbséget a peptid specifikus IgG ellenanyagok esetén, hiszen mindkét csoport egyedei szinte ugyanazokat az epitópotokat ismerték

fel, bár a Tg állatokban termelődött mennyiségük jelentősen meghaladta a kontrollokt (17. ábra) (40).



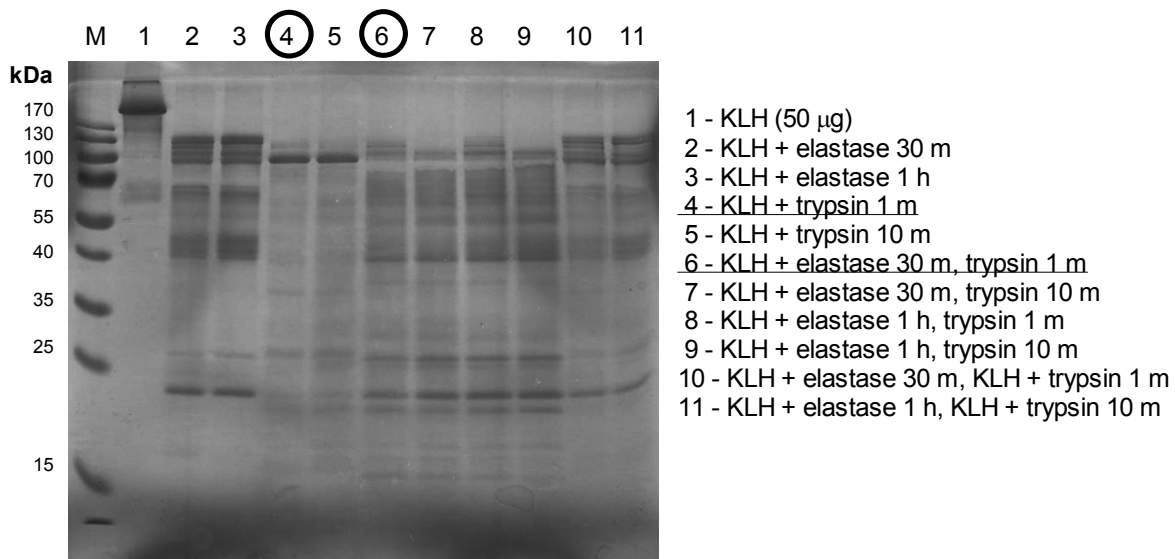
17. ábra – a Tg egerek sokkal nagyobb mértékű diverzitást mutatnak az IgM izotípusú ellenanyagokat elemezve, míg az IgG izotípusú ellenanyagok esetén nem mutatkozik különbség a felismert epitópok számát tekintve a Tg és vt egerek között az immunválasz 49. napján.

Korábbi publikációkból jól ismert, hogy az immunrendszer sokféle B- és T-sejt epitópot képes felismerni, de végül is csak néhányal, az ún. immundomináns epitópokkal szemben

alakul ki hatékony immunválasz. Ismert továbbá az is, hogy ez a fajta elköteleződés az IgM→IgG izotípus váltáskor következik be és csak az IgG termelő B-sejt populációt érinti (69). Amennyiben egy adott antigén immundomináns epitópjait eltávolítják, akkor az antigén más epitópjára ellen is hatékony immunválasz alakul ki (70-72). *Mind ezek arra utalnak, hogy bár a Tg egerek többféle naiv B-sejtet aktiváltak (azaz a Tg állatokban szinte minden epitóp ellen alakult ki IgM ellenanyag), azok közül csupán az OVA immundomináns epitópjaira specifikus B-sejtekben játszódtott le az IgM→IgG izotípusváltás (40).*

Az antigén-specifikus humorális immunkészlet elemzése Western-blot elemzéssel

A humorális immunválasz diverzitásának további elemzéséhez Tg és vt egereket (csoportonként 4 állatot) KLH-val oltottunk, majd az állatokból nyert szérumokkal, és részlegesen emésztett KLH mintákkal Western blot elemzést végeztünk, amelyben a KLH fragmenseket felismerő egér IgG-t detektálunk. Kísérletünk első fázisában a lehető legtöbb KLH fragmens előállításához az optimális emésztési körülményeket kellett megtalálnunk. Ennek meghatározásához a KLH-t különböző ideig emésztettük tripszinnel és elasztázzal külön-külön, illetve együtt is, majd SDS-PAGE segítségével szétválasztottuk a fragmenseket, amelyeket Coomassie-kék festéssel elemeztünk. Ennek alapján választottuk ki a kombinált elasztáz 30 perc/tripszin 1 perc emésztést, valamint a tripszin 1 perces emésztést, mivel úgy ítéltük meg, hogy ebben az esetben keletkezett a legtöbb fehérje fragmens (**18. ábra**) (44, 45).



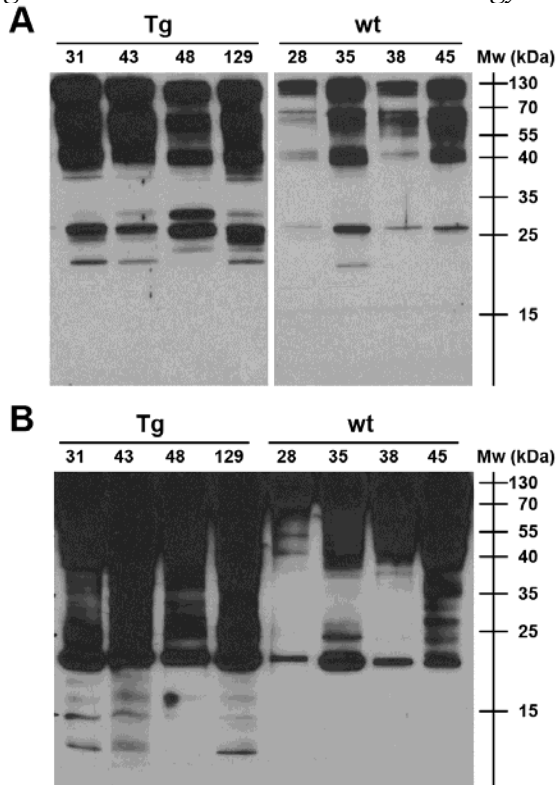
18. ábra – KLH részleges emésztése elasztáz és tripszin enzimekkel. A legtöbb fehérje fragmens eléréséhez a 4. és 6. beállítást választottuk.

A továbbiakban a kétféle módon emésztett KLH fragmenseket Western blotban teszteltük az immunizált egerek 2000-szeresen hígított szérum mintájával, amit egér IgG-re hívtunk elő. Feltevésünk szerint a nagyobb mértékű, antigén-specifikus IgG diverzitást nagyobb számú felismert fragmens jelzi. Előzetes vizsgálatainkat a 4-4 állat szérumának keverékével („pool”) végeztük el, és megállapíthattuk, hogy a legnagyobb szintű diverzitást a 70. napi minták adták. Ennek alapján a továbbiakban minden állat 70. napi immunszérumát külön-külön vizsgáltuk meg a kétféle részleges emésztést követő KLH fragmenseket tartalmazó blotton.

Vizsgálataink kapcsán számos olyan KLH fragmenst észleltünk, amelyek csak a transzgenikus egerek szérumaival történő előhívás során jelentek meg. Ez különösen a csak tripszinnel emésztett KLH fragmensek esetén látványos, mivel ebben a blotban a ~ 15 kDa méretű KLH fragmenseket csak a bFcRn Tg egerek szérum mintái ismerték fel. Emellett jóval

erősebb jelet detektáltunk a Tg minták használata esetén, amely a szérumok magasabb ellenanyag tartalmával állhat összefüggésben (**19. ábra**) (44, 45).

Vizsgálataink kimutatták, hogy a bFcRn-t tartalmazó egerekben nagyobb mennyiségű és többféle epitópot felismerő IgG izotípusú ellenanyag keletkezik egy adott antigén (KLH) ellen, mint a vad típusú állatokban. Ezek az eredmények mind arra utalnak, hogy a transzgenikus egerek humorális immunválaszának nagyobb a diverzitása.



19. ábra – Westen blot elemzés a KLH specifikus IgG immunválasz diverzitásának elemzésére. **A.** elasztáz+tripszin kombinált emésztéssel nyert KLH fragmensek előhívása; **B.** tripszinnel emésztett KLH fragmensek előhívása (a Tg és wt számok az egyes egerek azonosítási kódját jelzik).

terveztük, de ennek megvalósítását technikai és anyagi okok miatt nem tudtuk megvalósítani).

4. Konklúzió

A bFcRn expresszióját kimutattuk a lép marginális zóna makrofágokban, a vörös pulpa makrofágokban és a T-sejt zóna dendritikus sejtjeiben, valamint a nyirokcsomó szubkapszuláris szinus makrofágjaiban, és a nyirokcsomó kérgi területén, a folliculusok közti állomány makrofágjaiban. Igazoltuk, hogy a csontvelő eredetű dendritikus sejtek kifejezik a bFcRn-t és sokkal több helper T-sejtet aktiválnak, amennyiben antigén-IgG immunkomplexet adunk hozzájuk, mint a kontroll dendritikus sejtek. Azt is bizonyítottuk, hogy a bFcRn kifejeződését az NF κ B indukálja, ami arra utal, hogy az immunizálás során alkalmazott adjuváns ezt az útvonalat is aktiválva tovább optimalizálja a bFcRn funkcióját a professzionális antigén prezentáló sejtekben és ezzel hozzájárul a bFcRn transzgenikus (Tg) egerek fokozott immunválaszához.

A mostani Western blot vizsgálatok során kapott eredmények technikai korlátai miatt elképzelhető, hogy amennyiben jóval hosszabb ideig hívnánk elő a blottokat, vagy esetleg kisebb hígításokat használnánk, akkor a vad típusú állatokból származó szérumok is felismernék Tg egereknél látott fragmenseket. Mindazonáltal, a jelenlegi eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a Tg állatokban sokkal nagyobb az egyedi epitópotok felismerő ellenanyagok mennyisége, amelynek hátterében minden bizonnyal sokkal több, az egyedi ellenanyagokat termelő B-sejt található (ahogy ezt a jelen kutatási beszámolóunk számos pontján részletesen bemutattuk). Kijelenthető tehát, hogy a Tg egerek B-sejtjeiből lényegesen nagyobb eséllyel lehet egy adott epitópra, még a gyengén immunogén epitópokra is, monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómát fejleszteni.

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

A bFcRn Tg egerek immunizálása legalább kétszer annyi antigén-specifikus, aktivált helper T sejtet, ill. nagyobb méretű és számú csíráközpont eredményezett. További vizsgálataink igazolták, hogy a bFcRn Tg egerek OVA és KLH immunizálásra sokkal diverzebb ellenanyagtermeléssel reagálnak, mint a kontroll egerek. Ezek a vizsgálatok rámutattak arra, hogy a bFcRn Tg egerekben kialakuló fokozott mértékű antigén prezentáció, növeli az aktivált helper T sejtek számát, aminek eredménye a nagyobb számú antigén-specifikus B sejt, és ez fokozott diverzitású antigén-specifikus antitesteket eredményez.

Az FcRn transzgenikus technológiát nemzetközi szabadalmak védik (EU: EPO EP2097444B1, Kanada: CA2670389, Ausztrália: AU2007323049, Kína: 200780043407.0, Hong Kong: 2007323049, ill. USA, Japán a szabadalmi eljárások jelenleg is zajlanak). Az ImmunoGenes Kft e technológia ipari hasznosítása érdekében 2007-ben kizárólagos hasznosítási szerződést kötött a szellemi termék tulajdonosaival, az ELTE-vel és az MBK-val. 2012 decemberében az ImmunoGenes és a Magyar Fejlesztési Bank, Corvinus Kockázati Tőkealap-kezelő Zrt új céget hozott létre – ImmunoGenes-ABS Zrt, amely hazai és külföldi megrendelők számára fejleszt ellenanyagokat az FcRn transzgenikus egerek és nyulak alkalmazásával.

Az új technológia működőképességét a közelmúltban a Kyowa Hakko Kirin (KHK) vezető japán gyógyszergyár is visszaigazolta, melynek nyomán az ImmunoGenes és a KHK hasznosítási szerződést kötött (2014.09.08). A KHK terápiás monoklonális ellenanyagokat fog az általunk létrehozott bFcRn Tg egerekkel fejleszteni.

A jelen pályázat kutatásai egy korábbi fejlesztés kiegészítését jelentik, amelynek lényege, hogy az FcRn molekulát fokozott mértékben kifejező egerek hatékonyabb immunválasszal termelnek monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómát, még olyan esetekben is, amikor a hagyományos eljárások kudarcot vallanak. Mindezeket a korábbi eredményeket értékes új kísérleti adatokkal sikerült kiegészítenünk, amelyek ennek a Tg modellnek a pontosabb értelmezését és ezen keresztül hasznosítását támogatják.

5. Hivatkozások (sárgával kiemelve jelen pályázathoz kapcsolódó saját eredményeink)

1. Kohler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-7
2. Hutchings CJ, Koglin M, Marshall FH. 2010. Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs* 2: 594-606
3. Strohl WR. 2014. Antibody discovery: sourcing of monoclonal antibody variable domains. *Curr Drug Discov Technol* 11: 3-19
4. Takahashi N, Kakinuma H, Hamada K, Shimazaki K, Yamasaki Y, Matsushita H, Nishi Y. 2000. Improved generation of catalytic antibodies by MRL/MPJ-lpr/lpr autoimmune mice. *Journal of immunological methods* 235: 113-20
5. Strasser A, Harris AW, Vaux DL, Webb E, Bath ML, Adams JM, Cory S. 1990. Abnormalities of the immune system induced by dysregulated Bcl-2 expression in transgenic mice. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 166: 175-81
6. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. 1996. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379: 346-9
7. Bolland S, Yim YS, Tus K, Wakeland EK, Ravetch JV. 2002. Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in Fc gamma RIIB^{-/-} mice. *Journal of Experimental Medicine* 195: 1167-74
8. Tiller T, Kofler J, Kreschel C, Busse CE, Riebel S, Wickert S, Oden F, Mertes MMM, Ehlers M, Wardemann H. 2010. Development of self-reactive germinal center B cells and plasma cells in autoimmune Fc gamma RIIB-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 207: 2767-78
9. Qin D, Wu JS, Vora KA, Ravetch JV, Szakal AK, Manser T, Tew JG. 2000. Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *Journal of Immunology* 164: 6268-75

10. Sakaguchi N, Kimura T, Matsushita S, Fujimura S, Shibata J, Araki M, Sakamoto T, Minoda C, Kuwahara K. 2005. Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in the Ganp gene-transgenic mouse. *J Immunol* 174: 4485-94
11. Ono M, Matsubara J, Honda K, Sakuma T, Hashiguchi T, Nose H, Nakamori S, Okusaka T, Kosuge T, Sata N, Nagai H, Ioka T, Tanaka S, Tsuchida A, Aoki T, Shimahara M, Yasunami Y, Itoi T, Moriyasu F, Negishi A, Kuwabara H, Shoji A, Hirohashi S, Yamada T. 2009. Prolyl 4-hydroxylation of alpha-fibrinogen: a novel protein modification revealed by plasma proteomics. *J Biol Chem* 284: 29041-9
12. Daly J, Bebenek K, Watt DL, Richter K, Jiang C, Zhao ML, Ray M, McGregor WG, Kunkel TA, Diaz M. 2012. Altered Ig hypermutation pattern and frequency in complementary mouse models of DNA polymerase zeta activity. *Journal of immunology* 188: 5528-37
13. Lonberg N. 2005. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23: 1117-25
14. Dechiara TM, Poueymirou WT, Auerbach W, Friendewey D, Yancopoulos GD, Valenzuela DM. 2009. VelociMouse: fully ES cell-derived F0-generation mice obtained from the injection of ES cells into eight-cell-stage embryos. *Methods Mol Biol* 530: 311-24
15. Menoret S, Iscache AL, Tesson L, Remy S, Usal C, Osborn MJ, Cost GJ, Bruggemann M, Buelow R, Anegon I. 2010. Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur J Immunol* 40: 2932-41
16. Brambell FWR, Halliday R, Morris IG. 1958. Interference by human and bovine serum and serum protein fractions with the absorption of antibodies by suckling rats and mice. *Proceedings of the Royal Society, Series B* 149
17. Brambell FWR, Hemmings WA, Morris IG. 1964. A theoretical model of gammaglobulin catabolism. *Nature* 203: 1352-5
18. Jones EA, Waldmann TA. 1972. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *Journal of Clinical Investigation* 51: 2916-27
19. Simister NE, Rees AR. 1985. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur J Immunol* 15: 733-8
20. Rodewald R. 1976. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. *J Cell Biol* 71: 666-9
21. Rodewald R, Kraehenbuhl JP. 1984. Receptor-mediated transport of IgG. *J Cell Biol* 99: 159s-64s
22. Simister NE, Mostov KE. 1989. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 337: 184-7.
23. Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, Anderson CL. 2003. The Major Histocompatibility Complex-related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin and Prolongs Its Lifespan. *The Journal of Experimental Medicine* 197: 315-22
24. Ward ES, Ober RJ. 2009. Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn. *Adv Immunol* 103: 77-115
25. Simister NE, Ahouse JC. 1996. The structure and evolution of FcRn. *Res Immunol* 147: 333-7; discussion 53
26. Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, Miao L, Wang Y, Robert C, Wu B, Smith PD, Lencer WI, Blumberg RS. 2001. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* 166: 3266-76.
27. Montoyo HP, Vaccaro C, Hafner M, Ober RJ, Mueller W, Ward ES. 2009. Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2788-93
28. Mi W, Wanjie S, Lo ST, Gan Z, Pickl-Herk B, Ober RJ, Ward ES. 2008. Targeting the neonatal fc receptor for antigen delivery using engineered fc fragments. *J Immunol* 181: 7550-61
29. Qiao SW, Kobayashi K, Johansen FE, Sollid LM, Andersen JT, Milford E, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9337-42
30. Liu X, Lu L, Yang Z, Palaniyandi S, Zeng R, Gao LY, Mosser DM, Roopenian DC, Zhu X. 2011. The Neonatal FcR-Mediated Presentation of Immune-Complexed Antigen Is Associated with Endosomal and Phagosomal pH and Antigen Stability in Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol* 186: 4674-86
31. Baker K, Qiao SW, Kuo TT, Aveson VG, Platzer B, Andersen JT, Sandlie I, Chen Z, de Haar C, Lencer WI, Fiebiger E, Blumberg RS. 2011. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates cross-presentation of IgG immune complexes by CD8-CD11b+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 9927-32
32. Kacs Kovics I, Bosze Z, Bender B, Cervenak J, Hiripi L. 2007.
33. Bosze Z, Kacs Kovics I, Cervenak J, Hiripi L, Bender B. 2012. *Australia Patent No. AU2007323049*
34. Bosze Z, Kacs Kovics I, Cervenak J, Hiripi L, Bender B. 2011. *European Patent Specification Patent No. EP 2 097 444 B1*

35. Bender B, Bodrogi L, Mayer B, Schneider Z, Zhao Y, Hammarstrom L, Eggen A, Kacs Kovics I, Bosze Z. 2007. Position independent and copy-number-related expression of the bovine neonatal Fc receptor alpha-chain in transgenic mice carrying a 102 kb BAC genomic fragment. *Transgenic Res* 16: 613-27
36. Cervenak J, Bender B, Schneider Z, Magna M, Carstea BV, Liliom K, Erdei A, Bosze Z, Kacs Kovics I. 2011. Neonatal FcR Overexpression Boosts Humoral Immune Response in Transgenic Mice. *J Immunol* 186: 959-68
37. Schneider Z, Cervenak J, Baranyi M, Papp K, Prechl J, Laszlo G, Erdei A, Kacs Kovics I. 2011. Transgenic expression of bovine neonatal Fc receptor in mice boosts immune response and improves hybridoma production efficiency without any sign of autoimmunity. *Immunology Letters* 137: 62-9
38. Vegh A, Cervenak J, Jankovics I, Kacs Kovics I. 2011. FcRn overexpression in mice results in potent humoral response against weakly immunogenic antigen. *mAbs* 3: 173-80
39. Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, Brown AC, Akilesh S, Jung N, Petkova S, Avanesian L, Choi EY, Shaffer DJ, Eden PA, Anderson CL. 2003. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J Immunol* 170: 3528-33
40. Vegh A, Farkas A, Kovesdi D, Papp K, Cervenak J, Schneider Z, Bender B, Hiripi L, Laszlo G, Prechl J, Matko J, Kacs Kovics I. 2012. FcRn Overexpression in Transgenic Mice Results in Augmented APC Activity and Robust Immune Response with Increased Diversity of Induced Antibodies. *PLoS One* 7: e36286
41. Cervenak J, Doleschall M, Bender B, Mayer B, Schneider Z, Doleschall Z, Zhao Y, Bosze Z, Hammarstrom L, Oster W, Kacs Kovics I. 2013. NF- κ B induces overexpression of bovine FcRn: a novel mechanism that further contributes to the enhanced immune response in genetically modified animals carrying extra copies of FcRn. *mAbs* 5: 858 - 69
42. Tiwari B, Junghans RP. 2005. Functional analysis of the mouse Fcgrt 5' proximal promoter. *Biochim Biophys Acta* 1681: 88-98
43. Ye L, Liu X, Rout SN, Li Z, Yan Y, Lu L, Kamala T, Nanda NK, Song W, Samal SK, Zhu X. 2008. The MHC class II-associated invariant chain interacts with the neonatal Fc gamma receptor and modulates its trafficking to endosomal/lysosomal compartments. *J Immunol* 181: 2572-85
44. Schneider Z, Vegh A, Szikora B, Iliás A, Cervenak J, Balogh P, Kurucz I, Kacs Kovics I. 2015. More antigen-specific T helper cells, more and larger germinal centers and increased diversity of induced IgGs in immunized transgenic mice that overexpress the bovine FcRn. (kézirat előkészítés alatt)
45. Schneider Z, Végh A, Cervenak J, Szikora B, Iliás A, Balogh P, Kurucz I, Kacs Kovics I. 2014. Expanded antigen-specific T helper cell pool accompanied with augmented germinal center formation and IgG diversity in bovine FcRn transgenic mice upon immunization. Presented at Antibody Biology & Engineering: Understanding Antibody Structure, Function, Diversity, and Pathology to Improve Disease Treatment, Lucca, Italy
46. Doleschall M, Zhao Y, Mayer B, Hammarstrom L, Kacs Kovics I. 2005. Isolation of the gene encoding the bovine neonatal Fc receptor. *Vet Immunol Immunopathol* 108: 145-50
47. Doleschall M. 2007. *The transcriptional regulation of the bovine neonatal Fc receptor*. PhD thesis. Szent István University, Budapest
48. Doleschall M, Mayer B, Cervenak J, Cervenak L, Kacs Kovics I. 2007. Cloning, expression and characterization of the bovine p65 subunit of NFkappaB. *Dev Comp Immunol* 31: 945-61
49. Kozak W, Zheng H, Conn CA, Soszynski D, van der Ploeg LH, Kluger MJ. 1995. Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *Am J Physiol* 269: R969-77
50. Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS. 2007. Neonatal FcR Expression in Bone Marrow-Derived Cells Functions to Protect Serum IgG from Catabolism. *J Immunol* 179: 4580-8
51. Schneider Z, Végh A, Cervenak J, Balogh P, Kacs Kovics I. 2013. Greater number of activated T cells and enlarged germinal centers in the spleen of bovine FcRn transgenic mice in the background of the enhanced immune response. Presented at ICI
52. Baker K, Rath T, Pyzik M, Blumberg RS. 2014. The Role of FcRn in Antigen Presentation. *Front Immunol* 5: 408
53. Chen YY, Pikkarainen T, Elomaa O, Soininen R, Kodama T, Kraal G, Tryggvason K. 2005. Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. *Journal of Immunology* 175: 8173-80
54. Angyal A, Szekeres Z, Balogh P, Neer Z, Szarka E, Virag V, Medgyesi D, Prechl J, Sarmay G. 2009. CD16/32-specific biotinylated 2.4G2 single-chain Fv complexed with avidin-FITC enhances FITC-specific humoral immune response *in vivo* in a CD16-dependent manner. *International Immunology* 22: 71-80
55. Szarka E, Neer Z, Balogh P, Adori M, Angyal A, Prechl J, Kiss E, Kövesdi D, Sarmay G. 2012. Exacerbation of collagen induced arthritis by Fc γ receptor targeted collagen peptide due to enhanced inflammatory chemokine and cytokine production. *Biologics: targets and therapy* 6: 101-15

56. You Y, Myers RC, Freeberg L, Foote J, Kearney JF, Justement LB, Carter RH. 2011. Marginal Zone B Cells Regulate Antigen Capture by Marginal Zone Macrophages. *Journal of Immunology* 186: 2172-81
57. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW, Cyster JG. 2008. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature Immunology* 9: 54-62
58. Cyster JG. 2000. B cells on the front line. *Nat Immunol* 1: 9-10
59. Martinez-Pomares L, Gordon S. 2007. Antigen presentation the macrophage way. *Cell* 131: 641-3
60. den Haan JM, Kraal G. 2012. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J Innate Immun* 4: 437-45
61. Phan TG, Green JA, Gray EE, Xu Y, Cyster JG. 2009. Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nat Immunol* 10: 786-93
62. Carrasco YR, Batista FD. 2007. B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27: 160-71
63. Phan TG, Grigorova I, Okada T, Cyster JG. 2007. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat Immunol* 8: 992-1000
64. Junt T, Moseman EA, Iannacone M, Massberg S, Lang PA, Boes M, Fink K, Henrickson SE, Shayakhmetov DM, Di Paolo NC, van Rooijen N, Mempel TR, Whelan SP, von Andrian UH. 2007. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450: 110-4
65. Nikbakht N, Shen S, Manser T. 2013. Cutting edge: Macrophages are required for localization of antigen-activated B cells to the follicular perimeter and the subsequent germinal center response. *J Immunol* 190: 4923-7
66. Heesters BA, Chatterjee P, Kim YA, Gonzalez SF, Kuligowski MP, Kirchhausen T, Carroll MC. 2013. Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* 38: 1164-75
67. Crotty S. 2011. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29: 621-63
68. Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2013. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* 38: 596-605
69. Agarwal A, Sarkar S, Nazabal C, Balasundaram G, Rao KV. 1996. B cell responses to a peptide epitope. I. The cellular basis for restricted recognition. *Journal of immunology* 157: 2779-88
70. Garrity RR, Rimmelzwaan G, Minassian A, Tsai WP, Lin G, de Jong JJ, Goudsmit J, Nara PL. 1997. Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. *Journal of immunology* 159: 279-89
71. Henry KA, Murira A, van Houten NE, Scott JK. 2011. Developing strategies to enhance and focus humoral immune responses using filamentous phage as a model antigen. *Bioengineered bugs* 2: 275-83
72. Tobin GJ, Trujillo JD, Bushnell RV, Lin G, Chaudhuri AR, Long J, Barrera J, Pena L, Grubman MJ, Nara PL. 2008. Deceptive imprinting and immune refocusing in vaccine design. *Vaccine* 26: 6189-99