

Zárójelentés az OTKA K68126 számú, A nyúl neonatális FC receptor klónozása, jellemzése című pályázatról

Vezető kutató: Hiripi László

Bevezetés

Az emlősök szervezetében található immunglobulinok (Ig) közül legjelentősebb és legnagyobb mennyiségben megtalálható ellenanyag az IgG, mely a vírusok, baktériumok és paraziták fertőzésekkel szemben biztosít védelmet. Az IgG miután az antigénnel kapcsolódott, allergiás, gyulladásszerű folyamatokat indukál, aktiválva az immunsejteket, és az immunrendszer humorális elemeit.

Az emlősökben az újszülöttek immunvédeltsége még nem alakult ki, hanem az anyából az utódokba IgG molekulák átadása történik, mely biztosítja a korai fertőzésekkel szembeni védekezést. Ehhez a folyamathoz azonban feltételezhetően szükség van egy receptor molekulára, mely képes megkötni és szállítani az anyai immunglobulinokat, elsősorban sejtes barriereken keresztül. Ezt a receptort már az ötvenes években vizsgálták, IgG specifikusnak bizonyult, és telíthető módon működött (Brambell et. al., 1958). Ma ezt a receptor molekulát neonatális Fc receptor molekulaként ismerjük (FcRn).

Az anyai IgG átadásának három fő iránya alakult ki az emlős állatokban. Lehetőség van a magzati korban az immun transzportot biztosítani. Erre jó példa az ember és a nyúl. Bizonyos állatok, pl a kérődző állatok kizárólag az ún. főcstejjel, vagy kolosztrummal adják át az anyai immunglobulinokat. A harmadik csoportba olyan emlősállatok tartoznak, melyek mindkét útvonalat használják. Ilyenek a rágcsálók, és a ragadozók.

A véráramban található IgG molekulák a leghosszabb élettidejű fehérjék közé tartoznak. Ezt a szerkezet egy védőmolekulával biztosítja, mely meggátolja az IgG-t a lebontástól. Ezt a védelmet a kapillárisok endotél sejtjeiben szintén az FcRn molekula végzi (Waldmann és Strober 1969). Az IgG katabolizmusának biztosítása, és az anyai immunválasz átadásának folyamata, tehát azonos molekulához köthető.

A neonatális Fc receptor egy heterodimer molekula, amely egy α -láncból és a hozzá másodlagos kötőerőkkel kapcsolódó $\beta 2$ -mikroglobulinból épül fel. Nehéz lánc a sejtmembránhoz kapcsolódik, és három extracelluláris alegségből áll.

A receptor kapcsolódása az immunoglobulinhoz az eddigi ismeretek szerint nagyon szigorúan pH függő. A kötődés alacsony pH (pH 6.0) mellett történik míg semleges körülmények között bekövetkezik a disszociáció (Simister és Mostov 1989). Az epithelialis és endotél sejtekben a korai endoszómák savas környezetében kötődik az IgG, majd az IgG molekulák transzcitózissal a sejt túlóldalára kerülnek, vagy újra visszajutnak a keringésbe és disszociálnak (Ghetie et.al. 2002).

Az FcRn jellemzése több állatfajban megtörtént, így ismert rágcsálókban, emberben, sertésben, szarvasmarhában, juhban, tevében (Rodewald R. 1976, Cianga et.al. 1999 Schnulle et.al. 2003, Kacs Kovics et.al. 2000, 2006, 2007).

Annak ellenére, hogy az anyai IgG molekulák transzportját az utódokba legelőször nyúlban vizsgálták, majd ezt kiterjesztették citokémiai vizsgálatokra (Kraehenbuhl és Campiche 1969.) is, a nyúl FcRn molekuláris jellemzése sosem történt meg. Ebben a pályázatban a nyúl FcRn molekuláris klónozását, expressziós jellemzését tűztük ki célként, és valósítottuk meg.

Két gyakorlati szempontból is fontos a nyúl FcRn molekula. Egyrészt ugyanúgy kizárólag magzati korban történik az anyai IgG átadása mint az emberben, emiatt az adott folyamatoknak a legjobb modellállata. Másrészt egy publikációban felvetik

annak lehetőségét, hogy a nyúl FcRn molekula nem pH függő módon működik (Meads and Wild, 1994).

Pályázatunkban azonban sikerült igazolni, hogy a nyúl neonatális Fc receptor hasonlóan a többi emlősállathoz Ph függően köti meg az IgG-t, és disszociál az IgG molekuláról.

A kísérletekben felhasznált legfontosabb módszerek

A nyúl FcRn cDNS azonosítása 5' illetve 3' RACE-PCR módszerrel.

Nyúl máj, valamint lép májszövetből RNS-t izoláltunk, majd az 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 Kit (Invitrogen, UK) segítségével felszaporítottuk a nyúl FcRn 5' végét az útmutatónak megfelelően génspecifikus primerek felhasználásával.

Kiindulásként egy in silico módszerrel kiválasztott rövid nyúl EST-t használtunk, mely hasonlóságot mutatott az emlős FcRn szekvenciákhoz (Genbanki azonosító DN888548). A kapott PCR fragmentet tisztítás után szekvencia elemzésnek vetettük alá.

A 3' RACE PCR során a fent leírt RNS-t valamint cDNS-t használtuk fel egy kétlépéses PCR során. A második reakcióban kapott 600 bp hosszúságú fragmentet izoláltuk, és szekvenáltuk. Az 5' és 3' RACE PCR során kapott adatok alapján két génspecifikus primer segítségével (5'prime2f and 3'prime2r) sikerült felszaporítani a teljes kódoló régiót, majd azt pGEM T Easy plazmid vektorba klónoztuk, és újraszekvenáltuk.

A kísérletben használt primereket az 1. táblázat foglalja össze.

5' RACE Primer nevek	Szekvencia (5'-3')	Fragment méret
(AAP) primer	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG	-
(AUAP) primer	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	-
Génspecifikus (GSP)1_r	AAG CCC AGG CGT AGA AGG	-
GSP2_r	GCT CCT TCC ACT CCA GGT T	700 (with AAP)
GSP3_r	GCT TGG GGT CGA AAC TCA T	510 (with AUAP)
3'RACE PCR primerek		
RACE1	GAC TCG AGT CGA CAT CGA (T) ¹⁷	-
RACE2	GAC TCG AGT CGA CAT CGA	-
GSP4_f	AAC CTT CCT GCT CAC CTC CT	700 (with RACE2)
GSP5_f	GCG ACG AGT ACC GCT ACA G	600 (with RACE2)
5'prime2f	AGC TCG GCC ACG CAG CAT	1150
3'prime2r	GAT TCC AGG GGT CTC ACA GC	

1. táblázat Primer szekvenciák

Az FcRn szöveti megjelenésének vizsgálata RT-PCR módszerrel.

Az FcRn szöveti megjelenését RT-PCR módszerrel vizsgáltuk felhasználva a génspecifikus R1B1f (CTGAACGGTGAGGACTTCAT) és GSP1 primereket (AAGCCCAGGCGTAGAAGG). Kontrollként nyúl GAPDH-t alkalmaztunk (RabGAPDHf GAGCTGAACGGGAAACTCAC, RabGAPDHr CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT). Totál

RNS-t tisztítottunk vese, petefészek, méh, nyálmirigy, nyirokcsomó, tüdő, agy, máj, lép, vékonybél, méhlepény, amnion, és szikzacskó szövetekből RNABee (AMS Biotechnology, UK) reagens felhasználásával a gyártó útmutatásának megfelelően. A Promega egylépéses Access RT-PCR kitjét felhasználva szaporítottuk fel a megfelelő fragmenteket a gyár utasításainak megfelelően. A PCR program a következőképpen alakult: 48 °C 45 perc, 94 °C 2 perc, 40 ciklus 94 °C 30 s, 60 °C 1 perc és 68 °C 1 perc, 68 °C 7 perc. A fragmenteket 1-2%-os agaróz gélen választottuk el.

Western hibridizáció

A szöveti mintákat 7-8 térfogat jéghideg PBS-ben homogenizáltuk, majd 1 perces 10000 RPM centrifugálást követően a felülúszót különböző koncentrációkban közvetlenül összekevertük a mintapufferrel. A mintákat 12% SDS-PAGE gélen futtattuk, majd Hybond-P PVDF membránra (Amersham, UK) blottoltuk. Ezt követően kecskében termelt egér FcRn elsődleges ellenanyagot (K-13, 200µg/ml, Santa Cruz, USA) 1:1000 hígításban használtunk. A másodlagos ellenanyag 1:50000 hígításban használtuk (szamár anti-kecske IgG HRP, 100µg/ml, Santa Cruz, USA). A detektálást ECL-Plus Kittel végeztük (Amersham, UK).

FcRn specifikus peptid ellenanyag termeltetése baromfitojásban

Kereskedelmi forgalomban jó minőségű, nem nyúlban termelt immunhisztokémiához jól használható FcRn specifikus poliklonális ellenanyag nincsen. Kísérleteinkben felhasználtuk az ELTE-n a szarvasmarha FcRn ellen baromfi tojásban termeltetett ellenanyagot. A munkához Bovans Goldline X Bovans Nera hybrid tojókat használtunk. Az immunizáláshoz alkalmazott peptidet megszintetizáltattuk (SIGMA Genosys), és ezzel végeztük az immunizálást. A tojókat négy alkalommal immunizáltuk (0., 14., 28., 63., 97. napon) KLH-hoz kötött peptiddel (5 mg peptid, 3 mg KLH PBS-ben, dializálást követően 500 µg komplexszel immunizáltunk állatonként). A tojásokat folyamatosan gyűjtöttük és 4 °C -on tároltuk az ellenanyag tisztításáig. A tisztításhoz a tojás sárgát elkülönítettük a fehérjétől, majd 15 ml sárgához 60 ml vizet adtunk, kevertettük (15 min, RT) majd 9 ml dextranszulfátot (10%) továbbá 3 ml CaCl₂-ot (1M) adtunk hozzá kevertetés mellett (30 min, RT). Ezt követően lecentrifugáltuk (3000 rpm, 20 min, RT) majd a tiszta felülúszóhoz 7,3 g NaSO₄-et adtunk, és rázogatás mellett megvártuk míg feloldódik, majd lecentrifugáltuk (3000 rpm, 20 min, RT) A csapadékot 2,5 ml pufferben feloldottuk, majd dializáltuk (1000X mennyiségű pufferrel szemben 3-szor). A koncentrációt 8 mg/ml-re állítottuk be.

Immunhisztokémia

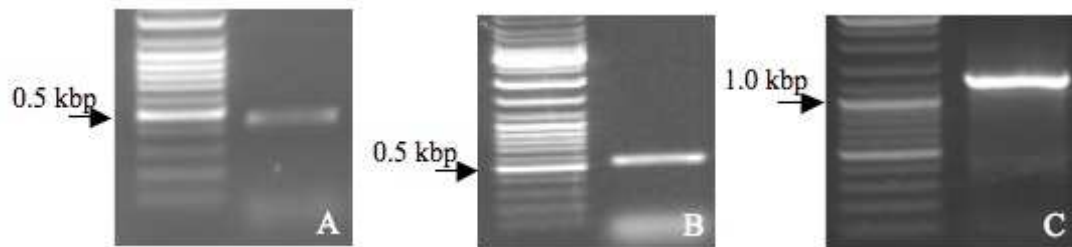
Immunhisztokémiához a mintákat 23 napos vemhes nyulakból nyertük. Szikzacskót, placentát és amniont gyűjtöttünk, majd 4% PFA-ban tároltuk 12 órán keresztül. A PFA kimosását követően emelkedő alkoholsorba helyeztük a mintákat 1-1 órára (70%,80%,90%, 2X100%), majd xyloba mártottuk 2X1 órára, és paraffinba ágyasztuk. 4 mikrométeres metszetek készítése után a metszeteket deparaffináltuk, majd antigén feltárást végeztünk 10 mM citrát pufferben pH 6.0 95 °C-on 10 percig. Az endogén peroxidázt 1% Hidrogén-peroxiddal blokkoltuk, majd 2X10 perc vizes mosást követően 10 percig PBS-ben áztattuk a metszeteket. A blokkoláshoz 2.5% BSA-t használtunk PBS-ben, 1 órán keresztül szobahőn. A metszeteket az elsődleges ellenanyaggal (K-13 1:70 hígítás; tojásban termelt FcRn ellenanyag 1:50 hígítás) 1% BSA/PBS-ben tartottuk 4 °C-on éjszakán keresztül. BSA/PBS mosási lépéseket követően a másodlagos ellenanyagot (szamár anti kecske IgG-HRP sc-2020 Santa Cruz 1:150 hígításban; Csirke IgY-HRP ab7118 Abcam 1:500 hígításban)1 órán keresztül

szobahőn adtuk a metszetekhez. A detektáláshoz 0.25 mg/ml DAB festéket használtunk PBS-ben oldva szobahőn. A metszeteket Meyer féle hematoxylin festékkel utánfestettük és DPX médiummal fedtük le.

Eredmények

A nyúl FcRn klónozása és szekvenciaelemzése

A kísérletek során kapott teljes cDNS hossza kb 1150 bp (1. ábra- C).



1. ábra A teljes cDNS klónozása. A-5'RACE; B-3' RACE; C-Teljes hosszúságú cDNS klón

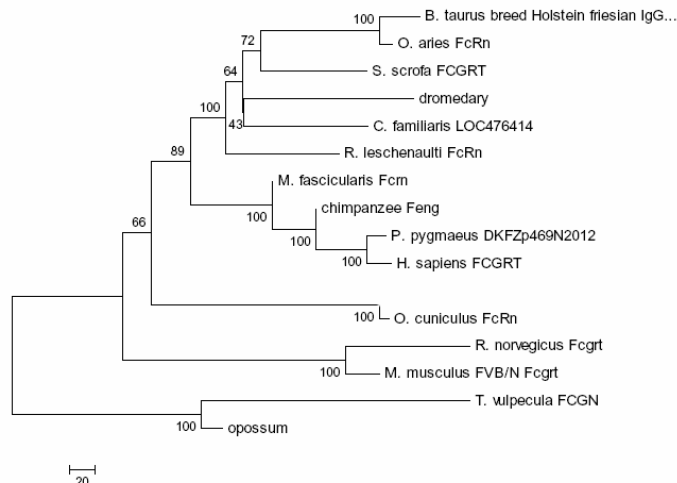
A teljes cDNS szekvencia 80% hasonlóságot mutat nukleinsav szinten az emberi kódoló szekvenciához, 78% a hasonlóság a szarvasmarha, és 70% hasonlóság tapasztalható az egér és patkány szekvenciákhoz (2. ábra). A kapott szekvenciát a (WO/2008/062383) szabadalom tartalmazza.

		10	20	30	40	50	60	70	80
Human FcRn	1	ATGGGGTCC	CGCGCCTCA	GCCTGGGCG	CTG---GGGC	TCTGCTCTT	TCTCCTTCT	GGGAGCCTGG	GCGCAGAAAG
Mouse FcRn	1	ATGGGGAT--	---GCCACT	GCCTGGGCG	CTC---AGCC	TCTTGTGTGT	CCTCCTGCCT	CAGACCTGGG	GCTCAGAGAC
Rat FcRn	1	ATGGGGAT--	---GTCCCA	GCCCGGGGT	CTCCTCAGCC	TCTTATGTGT	CCTCCTGCCT	CAGACCTGGG	GAGCGGAGCC
Rabbit FcRn	1	ATGGGGGCGCC	CCCGCTTCT	GCCCGGCGG	CTG---CGCC	TCTGCTCTG	CCTGCTTCC	GGGAGCCTGG	CTGCAGGAGC
Human FcRn	78	CCACCTCTCC	CTCCTGTACC	ACCTTACCGC	GGTGTCTCTG	CCTGCCCGG	GGACTCTGC	CTTCTGGGTG	TCCGGCTGGC
Mouse FcRn	72	CGCCCCCA	CTGATGTATC	ATCTCACGGC	TGTGTCAAAC	CCATCTACGG	GGCTTCCCTC	TTTCTGGGCC	ACAGGCTGGT
Rat FcRn	75	CCGTCTCCA	CTGATGTATC	ATCTTGCAGC	TGTGTCTGAC	TTATCAACGG	GGCTTCCCTC	TTTCTGGGCC	ACGGGCTGGC
Rabbit FcRn	78	CCATCTCTCC	CTCCTGTACC	ACATCACGGC	CGTGACCGAC	CCCCATGGGG	GGACTCCCTC	CTTCTTGTGT	TCCGGCTGGC
Human FcRn	158	TGGGCCCGCA	GCAGTACTCTG	AGTACAATA	GCCTGGGGG	CGAGGCGGAG	CCCTGTGGAG	CTTGGTCTG	GGAAACCAG
Mouse FcRn	152	TGGGTCTCA	GCAGTACTCTG	ACCTACAACA	GCCTGGGCA	GGAAGCTGAC	CCCTGTGGGG	CCTGGATGTG	GGAAATCAG
Rat FcRn	155	TGGGTCTCA	GCAATATCTG	ACCTACAACA	ACCTGGGCA	GGAGCTGAC	CCCTGTGGGG	CCTGGATATG	GGAAACCAG
Rabbit FcRn	158	TGGGCCCGCA	GCAGTACTCTG	AGTACAGCA	ACAGGCGGT	GGAGGCGGAG	CCCTATGGGG	CTTGGATCTG	GGAAACCAG
Human FcRn	238	GTGTCCTGGT	ATTGGGAGAA	AGAGACCACA	GATCTGAGGA	TCAAGGAGAA	GCTCTTCTG	GAAGCTTCA	AAGCTTTGGG
Mouse FcRn	232	GTGTCCTGGT	ATTGGGAGAA	GGAGACCACA	GACCTCAAAA	GCAAAGAACA	GCTCTTCTG	GAGGCCCTCA	AGACCTTGA
Rat FcRn	235	GTGTCCTGGT	ATTGGGAGAA	GGAGACCACG	GATCTGAAAA	GCAAAGAACA	GCTCTTCTG	GAGGCCATCA	GGACCTTGA
Rabbit FcRn	238	GTGTCCTGGT	ACTGGGAGAA	AGAGACCGTG	GACCTGAAGA	ACAAACAGCA	GCTCTTCTG	GAAGCTTCTG	AAGTCTGGG
Human FcRn	318	GGG-----A	AAAGTCCCT	ACACTTGCA	GGGCTGCTG	GGCTGTGAAC	TGGGCCCTGA	CAACACTCG	GTGCCACCG
Mouse FcRn	312	GAAGATATTA	AATGGGACCT	ACACACTGCA	GGGCTGCTG	GGCTGTGAAC	TGGGCCCTGA	TAATTCTCA	GTGCCACCG
Rat FcRn	315	GAACCAAATA	AATGGGACCT	TCACACTGCA	GGGCTGCTG	GGCTGTGAAC	TGGGCCCTGA	TAATTCTCA	GTGCCACCG
Rabbit FcRn	318	GG-----	AAGTCTCT	ACACCCTGCA	GGGCTGCTG	GGCTGTGAGC	TGGGCCCAGA	CAACGCTCG	GTGCCACAG
Human FcRn	392	CCAAGTTCGC	CCTGAACGGC	GAGGAGTTCA	TGAAATTCGA	CCTCAAGCAG	GGCACCTGGG	GTGGGACTG	GCCTGAGGCC
Mouse FcRn	392	CTGTGTTTGC	CCTCAATGGT	GAGGAGTTTA	TGAAATTCGA	CCAAGAATC	GGCAATTGGA	CTGGGAGTGT	GCCTGAGACG
Rat FcRn	395	CTGTGTTTGC	CCTCAATGGT	GAGGAGTTCA	TGCGTTTCAA	CCAAGAACG	GGCAATGGA	GTGGGAGTGT	GCCTGAGACG
Rabbit FcRn	389	CCAAGTTCGC	CCTGAACGGT	GAGGACTTCA	TGAGTTTCTGA	CCCCAAGCAG	GGCAGCTGGG	CTGGGAGTGT	GCCTGAGGCC
Human FcRn	472	CTGCTATCA	GTCACCGGTG	GCAGCAGCAG	GACAAGGCGG	CCAACAAGGA	GCTCACCTTC	CTGCTATCT	CCTGCCCGCA
Mouse FcRn	472	GAAATCTGTG	CTAATCTGTG	GATGAAGCAG	CCTGATGCGG	CCAGGAAGGA	GAGCGAGTTC	CTGCTAACT	CTTGTCCGGA
Rat FcRn	475	GATATCTGTG	GTAATCTGTG	GATGAAGCAA	CCTGAGGCGG	CCAGGAAGGA	GAGCGAGTTC	CTGCTAACT	CTTGTCCGGA
Rabbit FcRn	469	CTGGGATCA	GCACCAGGTG	GCAGCAGCAG	GCCAGGCGG	TCAGCAAGGA	GAGAACCCTT	CTGCTCACT	CCTGCCCGCA

			570	580	590	600	610	620	630	640
		
Human FcRn	552	CCGCTGCGG	GAGCACCTGG	AGAGGGGCGC	CGGAAACCTG	GAGTGGAAAG	AGCCCCCCTC	CATGCGCCTG	AAGGCCCGAC	
Mouse FcRn	552	GCGACTGCTA	GGCCACCTGG	AGAGGGGCGC	ACGGAACCTG	GAGTGGAAAG	AGCCCGCCGC	TATGCGCCTG	AAGGCCCGTC	
Rat FcRn	555	GCGGCTGCTA	GGCCACCTGG	AGAGGGGCGC	TCGAAACCTG	GAGTGGAAAG	AGCCCGCCATC	TATGCGCCTG	AAGGCCCGTC	
Rabbit FcRn	549	GCGGCTGCTG	GGCCACCTGG	AGAGGGGCGC	CGGCAACCTG	GAGTGGAAAG	AGCCCGCCCTC	CATGCGCCTG	AAGGCCCGCC	
			650	660	670	680	690	700	710	720
		
Human FcRn	632	CCAGCAGGCC	TGGCTTTTCC	GTGCTTACCT	GCAGCGCCTT	CTCCTTCTAC	CCTCCGGAGC	TGCAACTTCG	GTTCCTGCGG	
Mouse FcRn	632	CTGGCAACTC	TGGCTCCTCC	GTGCTGACCT	GTGCTGCTTT	CTCCTTCTAC	CCACCGGAGC	TCAAGTTCGG	ATTCTGCGGC	
Rat FcRn	635	CTGGCAACTC	TGGCTCCTCA	GTACTGACCT	GTGCTGCTTT	CTCCTTCTAC	CCGCGGGAGC	TCAAGTTCGG	ATTCTGCGGC	
Rabbit FcRn	629	CGGGCCCTCC	CGGCTTCTCC	GTGCTCACCT	GCAGCGCCTT	CTCCTTCTAC	CCACCGGAGC	TGCAGTTCGG	ATTCTGCGGC	
			730	740	750	760	770	780	790	800
		
Human FcRn	712	AATGGGTTGG	CCGCTGGCAC	CGGCCAGGGT	GACTTCGGCC	CCAACAGTGA	CGGATCCTTC	CACGCCTCGT	CGTCACTAAC	
Mouse FcRn	712	AATGGGTTAG	CCTCAGGCTC	CGGAAATTCG	AGCACTGGTC	CCAATGGAGA	TGGCTCTTTC	CACGCATGCT	CATTGTGGGA	
Rat FcRn	715	AATGGGTTAG	CCTCAGGCTC	TGGAAATTCG	AGCACTGGTC	CCAATGGTGA	TGGATCTTTC	CATGCATGCT	CATTGTGTGA	
Rabbit FcRn	709	AATGGGATGG	CGGCCGGCTC	CGGAGAGGGC	GGCTTCGGCC	CCAACGGCGA	CGGCTCCTTC	TACGCCTGGG	CTTCGCTGTC	
			810	820	830	840	850	860	870	880
		
Human FcRn	792	AGTCAAAAGT	GGCGATGAGC	ACCACTACTG	CTGCATTGTG	CAGCACGCGG	GGCTGGCGCA	GCCCTCAGG	GTGGAGCTGG	
Mouse FcRn	792	GGTCAAAAGT	GGAGATGAGC	ACCACTATCA	ATGTCAAGTG	GAGCATGAGG	GGCTGGCACA	GCCTCTCACT	GTGGAGCTAG	
Rat FcRn	795	GGTCAAAAGT	GGAGATGAAC	ACCACTATCA	ATGTCAAGTG	GAGCATGAGG	GGCTGGCCCA	GCCTCTCACT	GTGGAGCTAG	
Rabbit FcRn	789	CTGTGGCAGC	GGCGACGAGT	ACCGCTACAG	CTGCGTGGTG	CGCCACGCGG	GGCTGGCCGA	GCCCTCAGG	GTGGAGCTGG	
			890	900	910	920	930	940	950	960
		
Human FcRn	872	AATCTCCAGC	CAAGTCCTCC	GTGCTCGTGG	TGGGAATCGT	CATCGGTGTC	TTGCTACTCA	CGGCAGCGGC	TGTGAGGAGGA	
Mouse FcRn	872	ATTTCATCAGC	CAGATCTTCT	GTGCTGTGGG	TGGGAATCGT	TCTTGGTTTA	TTGCTGGTGG	TAGTGGCCAT	CGCAGCGGCT	
Rat FcRn	875	ATTTCGCCGC	CAGATCTTCT	GTGCTGTGGG	TGGGAATCAT	TCTTGGTTTA	TTGCTGGTGG	TAGTGGCCAT	CGCAGCGGCT	
Rabbit FcRn	869	ATTGGCCAGC	CAAGTCCTCG	GTGACCTGCG	CGGGCATCGT	TGTGCGGCTC	CTGCTGCTGG	TGGCCCTGGC	CGCGGAGCT	
			970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
		
Human FcRn	952	GCTCTGTGTT	GGAGAAGGAT	GAGGAGTGGG	CTGCCAGGCC	CTTGGATCTC	CCTTCGTGGA	GACGACCCGC	GGTCTCTCT	
Mouse FcRn	952	GTGCTGTGTT	GGGGCAGGAT	GCGCAGCGGT	CTGCCAGGCC	CATGGCTTTC	TCTCAGCGGC	GATGACTCTG	GTGACCTGTT	
Rat FcRn	955	GTGCTGTGTT	GGAAACAGGAT	GCGAAGTGGG	CTGCCAGGCC	CATGGCTTTC	TCTCAGTGGT	GATGACTCTG	GCGACCTATT	
Rabbit FcRn	949	GCCTGGCTGG	GGAGGAGGA-	--GGAGGGGG	CTGCCAGGCC	CCTGGGTCTT	TCTCCGTGGG	GACGACATCA	GAACGCTCCT	
			1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
		
Human FcRn	1032	GCCCAACCCA	GGGGAGGCCC	AGGATGCTGA	TTTGAAGGAT	GTAATGTGTA	TTCCAGCCAC	CGCCTGACCA	TCCGCCATTTC	
Mouse FcRn	1032	GCTTGGTGGG	AACTTGCCCC	CAGAAGCTGA	ACCTCAAGGT	GAAATGCTCT	TTCCAGCCAC	TTCTGATGTC	AGACTGCGGC	
Rat FcRn	1035	GCCTGGTGGG	AACTTGCCCC	CGGAGGCTGA	ACCTCAAGGT	GTAATGCTCT	TTCCGGCCAC	TTCTGATGTC	CAACCCAGGC	
Rabbit FcRn	1026	GCCC-----	-----C	AAGACGAGGG	CCCCAGGAC	GTGAGCGCCT	TCCCGCCAC	TGCCCTGA---	-----	

2. ábra Az emberi, az egér, a patkány és a nyúl FcRn szekvencia szintű összehasonlítása.

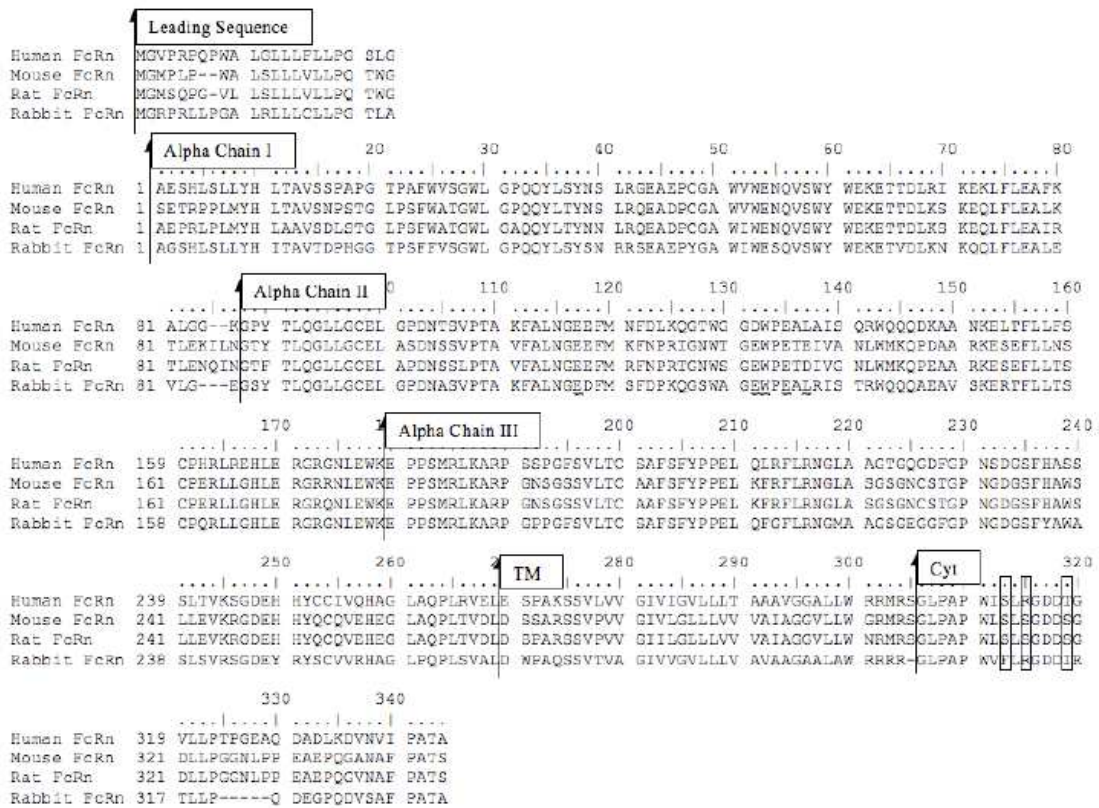
A szekvencia összehasonlítást követően elvégeztük a cDNS filogenetikai vizsgálatát. A 3. ábrán jól látszik, hogy a háziállatok közül az emberi FcRn-hez a nyúl FcRn (*O. cuniculus*) áll a legközelebb. Tekintve az IgG maternális transzfer alapvető hasonlóságát, ez az eredmény nem meglepő.



3. ábra az FcRn cDNS-ek filogenetikai törzsfája. *O. Cuniculus*-nyúl

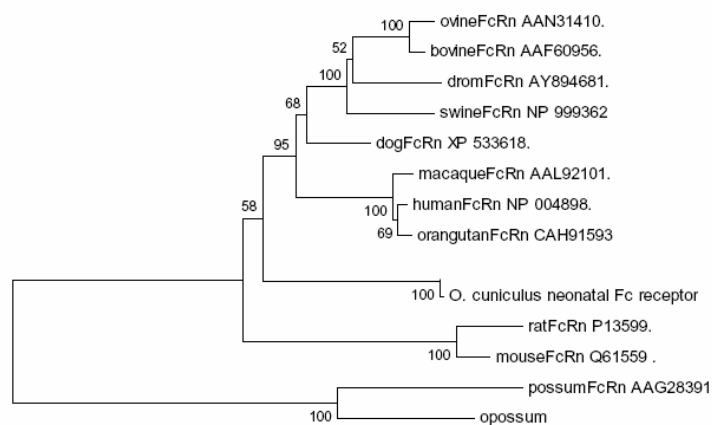
A kapott cDNS szekvencia alapján elkészítettük az eredeztetett aminosav szekvenciát is. A fehérjeszekvencia 71%, 62%, ill 63% hasonlóságot mutat az ismert emberi, egér és patkány szekvenciákkal. A szekvencia alapján a nyúl FcRn nehéz lánc három extracelluláris,

egy transzmembrán, valamint egy citoplazmatikus farok motívumot hordoz, hasonlóan az eddig ismert FcRn fehérjékhez. A legmagasabb konzerváltságot a 3. exon által kódolt 2. alfa lánc mutatta (4.ábra).



4. ábra Az emberi, a patkány, az egér és a nyúl FcRn fehérjék összehasonlítása. A fekete nyilak a különböző fehérje domének kezdetét jelölik. Alpha Chain- alfa láncok, TM- transzmembrán domén, Cyt- citoplazmás farok.

A fenti adatok alapján elkészítettük az FcRn fehérje molekulák törzsfáját (5.ábra) Hasonlóan a cDNS adatokhoz látszik, hogy a rágcsálók nagyon közeli rokonok, azonban az emberi FcRn molekula a rágcsálóktól viszonylag távol foglal helyet (Story et. al 1994). A nyúl FcRn a kettő között helyezkedik el.



5. ábra Az FcRn fehérje molekulák törzsfája.

Érdekes következtetések vonhatók le, ha megvizsgáljuk az ismert, és az IgG-FcRn kötésben, valamint a molekula egyéb tulajdonságaiban szerepet játszó aminosavak konzerváltságát a nyúl esetében. Az alfa-1 domén az ember és a nyúl esetében tartalmaz 2 ill. 3 aminosav-deléciót. Ez egy N-glikozilációs hely a rágcsálókban, és általában jellemző az MHC-I fehérjékre. Az alfa-2 doménben a Glu117, Glu118, Glu132, Trp133, Glu135 és Asp137 aminosavak konzerváltak a fajok között. A nyúl esetében azonban a Glu118 ASP118-ra, Asp137 Leu137-re cserélődött. Ez utóbbi csere az ember esetében is megtalálható.

Az alfa-3 doménben az Asn225 a rágcsálókban az FcRn dimer kötés létrehozásában fontos szénhidrát molekulához képes kapcsolódni. Ez a nyúlban nem konzervált struktúra. Ezzel szemben a Gly191, mely alapvető az FcRn-IgG interakcióban, a nyúlban is konzervált aminosav oldallánc. Érdekes módon a His250 és His251 oldalláncok, melyek mutációja csökkent IgG kötődést mutat rágcsálókban, valamint konzervált az emberben és a szarvasmarhában is, a nyúlban Tyr és Arg oldalláncokká fejlődött.

A citoplazmás egységben található Ser313 aminosav fontos szerepet tölt be az FcRn apikális-bazolaterális transzportjában. A transzcitózis Ser-foszforiláción keresztül szabályozott folyamat. Ez érdekes módon a nyúlban PHE, hasonlóan az erszéyes rókakuzuhoz, valamint a tevéhez. Ez a típusú mutáció az IgG kiválasztás felé tolhatja el a transzportfolyamatot (Kacskovics et. al, 2007). A Trp311, valamint a fark doménben található dileucin motívum az endocitózis szempontjából fontos oldalláncok mind konzerváltak a nyúlban is. Az ismert, illetve a nyúl esetében feltételezett IgG-FcRn interakcióban szerepet játszó aminosav oldalláncok összehasonlító adatai a 2. táblázatban található (Ober et.al. 2001 és Martin et.al. 2001 alapján)

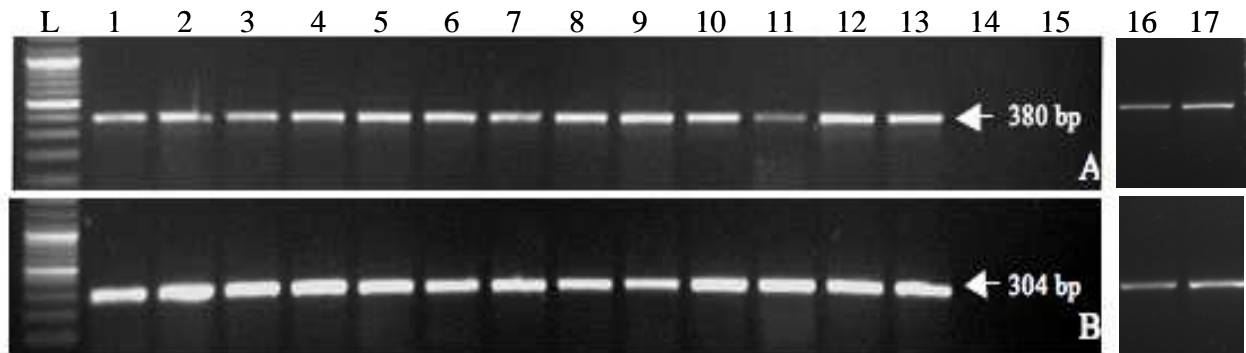
Rat FcRn	Rat IgG	Human FcRn	Human IgG	Rabbit FcRn	Rabbit IgG
Glu117	Ile253	Glu117	Ile253	Glu117	Ile253
Glu118	His310	Glu118	His310	Asp118	His310
Glu132	His435	Asp132	His435	Glu132	His435
Trp133	His436	Trp133	Tyr436	Trp133	Tyr436
Glu135		Glu135		Glu135	
Asp137		Leu137		Leu137	
Gly191		Ser191		Gly191	
Trp311		Trp311		Trp311	
Ser313		Ser313		Phe313	
Asp317/318		Asp317/318		Asp317/318	
Leu322/323		Leu321/322		Leu318/319	

2. táblázat. Az FcRn-IgG kötésben szerepet játszó aminosav oldalláncok összehasonlító táblázata.

A nyúl FcRn szöveti megjelenésének vizsgálata

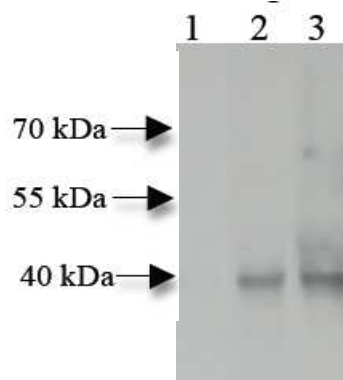
A nyúl neonatális Fc receptor nehéz láncának szöveti eloszlását RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. A vizsgált szövetek (vese, petefészek, méh, nyálmirigy, nyirokcsomó, tüdő, agy, máj, lép, vékonybél, méhlepény, amnion, és szikzacskó) mind expresszálták az FcRn RNS-t (6.ábra.). Ez az eredmény nem okozott nagy meglepetést, hiszen az emlősállatokban játszott szerepénél fogva az FcRn a kapilláris endotél sejtekben jelen van. Azon szövetek melyek tartalmaznak kapilláris endotél sejteket, feltehetően megjelenítik az FcRn molekulát. Ez a feltételezésünk beigazolódott. Az anyai immunitás átadásában fontos szerepet betöltő szövetek (placenta, amnion és szikzacskó) szintén mutattak FcRn expressziót, habár az aminonban csak nagyon gyenge jelet figyelhetünk meg. Ez a megfigyelés megegyezik az emberi expresszióval melyet Story et. al. Vizsgált 1994-ben.

A legújabb megfigyelések szerint az FcRn megjelenik közvetlenül az immunsejtekben is, így pl a monocitákban és a makrofágokban. Pontos funkciója egyelőre itt nem ismert, feltehetően az adaptív immunválasz iniciációjában, az antigén prezentációban, és a fagocitózisban játszhat szerepet (Akilesh et.al 2007). Sikerült nyúlból makrofág és monocita sejtpopulációt tisztítani, ezek tisztasága meghaladta a 95%-ot. A tisztított sejtpopulációkban is megvizsgáltuk az FcRn expresszióját, és sikerült nyúlban is igazolni az FcRn jelenlétét RNS szinten mind a makrofág, mind a monocita sejtekben (6.ábra).



6. ábra A nyúl FcRn szöveti megjelenése. Felső (A) panel FcRn vizsgálatok, alsó panel (B) endogén kontrol (GAPDH). L – marker, 1 – vese, 2 – petefészek, 3 – méh, 4 – nyálmirigy 5 – nyirokcsomó 6 – tüdő, 7 – agy, 8 – máj, 9 – lép, 10 – vékonybél, 11 – amnion, 12 – méhlepény, 13 – szikzacskó, 14 – negatív kontrol (-DNS), 15 – negatív kontrol (reverz transzkriptáz -) 16 – monocita, 17 – makrofág.

Az anyai immunitás átadásában fontos szövetekben a vizsgálatokat megismételtük Western hibridizációval is. A kísérletekhez a Santa Cruz Biotechnology FcRn K-13 ellenanyagát használtuk. Ez elsősorban emberi FcRn-re tervezett antitest, de széleskörűen felismer egyéb fajokat is (egér, patkány, szarvasmarha). A kísérletek szerint a szikzacskó és a placenta erős jelet mutat, viszont az amnionban gyakorlatilag nem lehetett kimutatni a fehérje terméket (7.ábra)

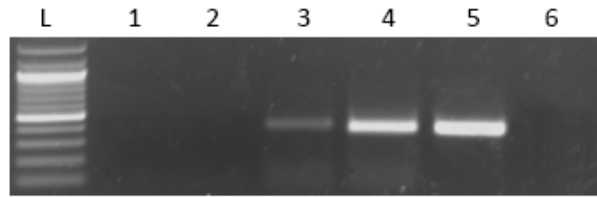


7. ábra Az anyai immunitásban szerepet játszó szövetek FcRn expressziója fehérje szinten. 1- amnion, 2-szikzacskó, 3-méhlepény

A nyúl FcRn számítógépes analízis alapján kalkulált mérete 39.5 kDa, izoelektromos pontja pI 6.25. A fenti western kísérletben a kapott jel mérete megfelel a vártnak.

Expressziós kísérleteinket kiterjesztettük a korai embrionális időszakra is. Ebben a korai szakaszban irodalmi adatok egér embriók esetében vannak. Warner és munkatársai kimutatták, hogy egér esetében már kétsejtes embrióban is kimutatható az FcRn. Nyúl

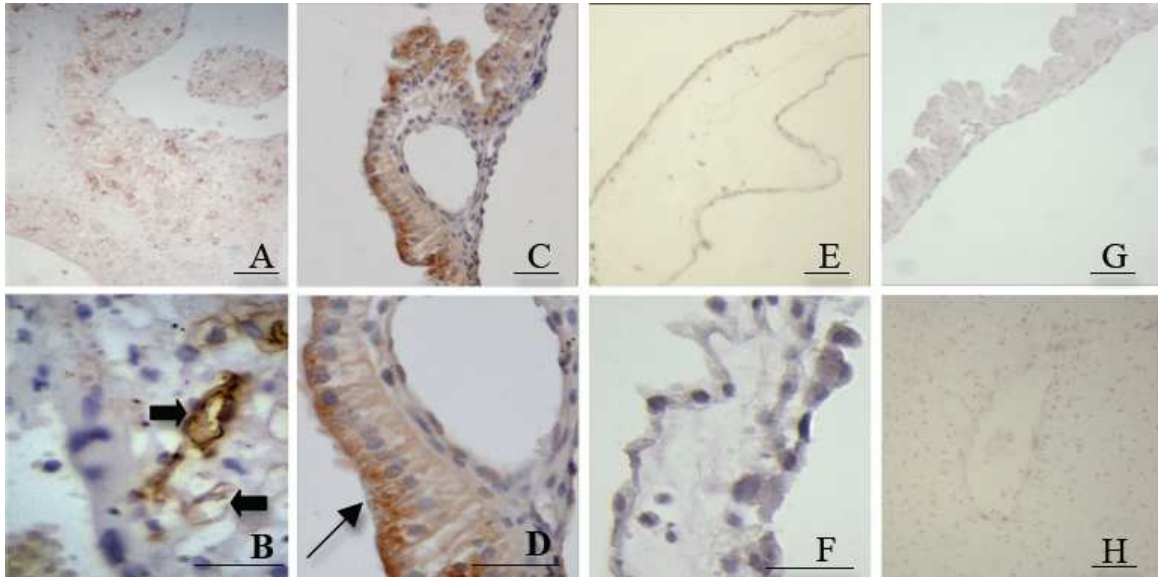
esetében a legkorábbi expresszió a 6. napon volt kimutatható, mely gyakorlatilag megegyezik nyúlban az embriók méhbe történő beágyazódásával (8. ábra)



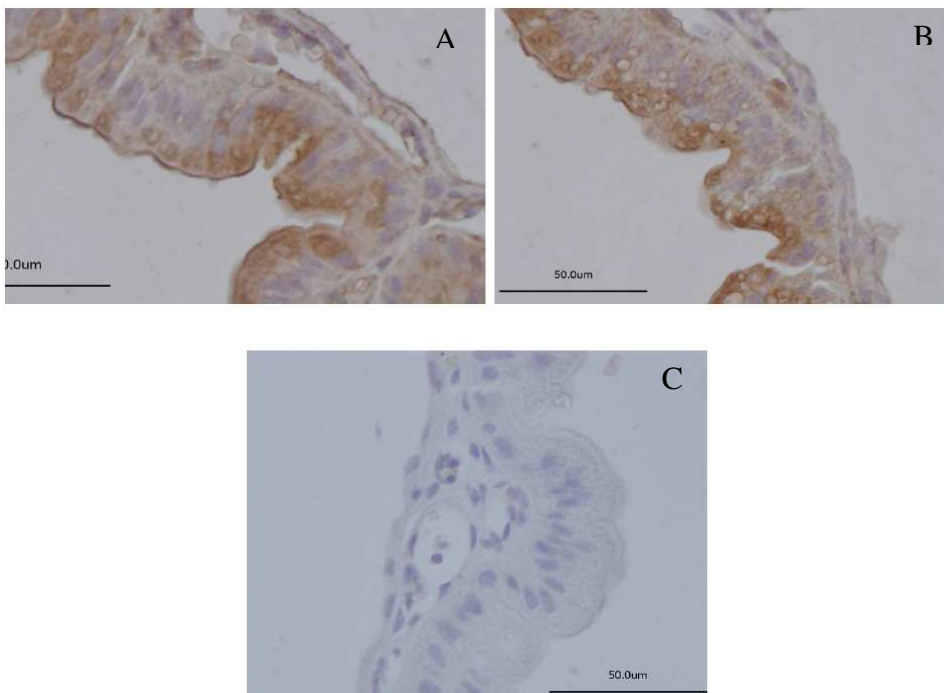
8. ábra A nyúl FcRn megjelenése korai embrionális korban. L-létra, 1- 3.5 napos nyúl blasztociszta, 2- 4.5 napos nyúl blasztociszta, 3- 6 napos nyúl blasztociszta, 4- 9 napos nyúl embrió, 5- 13.5 napos nyúl embrió, 6- negatív kontrol (DNS -).

Az FcRn sejtspecifikus megjelenésének vizsgálata a anyai IgG átadása idején

Az anyai IgG átadásának pontos sejtszintű lokalizációjának vizsgálatát Immunhisztokémiával végeztük el nyúlban. A kísérlethez anyanyulakból a késői vemhesség szakaszában, a huszadik napot követően, amikor már biztosan van IgG átadás, szöveti metszeteket készítettünk a placentából, a szikzacskóból, valamint az aminonból. Ezekben a szövetekben sejtszintű lokalizációt vizsgáltunk. Mivel egyelőre nincs jó minőségű nyúl FcRn elleni ellenanyag, ezért két független poliklonális ellenanyagot használtunk a vizsgálatokhoz. Ezek egyike emberre tervezett, poliklonális (K13) kecskében termelt, ismertén reagál több emlős FcRn molekulára. A másik ellenanyag szarvasmarha ellenanyag mely tojásban lett termeltetve, emiatt az emlős rendszerekben a keresztreakciók esélye sokkal kisebb. Vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy a nyúl FcRn nem mutatható ki fehérje szinten az amnion sejtjeiben. A placentában a magzati oldal kapilláris endotél sejtjei expresszálják az FcRn-t. A szikzacskóban az endodermális sejtek apikális régióihoz köthető az FcRn expresszió, biztosítva az IgG átjutását a magzati keringésbe (9,10 ábra). Indirekt vizsgálatok már eddig is jelezték, hogy a nyúl szikzacskó részt vehet az IgG transzferben (Sonoda et.al 1973). Sejtszinten azonban nekünk sikerült ezt először bemutatni. Patkányban, mely rágcsáló faj, így szintén használja a magzati kor útvonalát az anyai immunitás átadására, már igazolták hogy a szikzacskó részt vesz a folyamatban (Robertson et. al 1990, Ahouse et.al. 1993). A placenta FcRn expresszióját in vivo rendszerben, emberben igazolták a syncytiotrofoblaszt sejtekben. A nyúl placentában a syncytiotrofoblaszt sejtek nem expresszálják az FcRn-t, azonban a magzati oldalon mutatkozó kapilláris endotél sejtekben történő megjelenés felveti a lehetőségét annak, hogy a nyúl placenta is részt vesz az anyai immunitás átadásának folyamatában.



9. ábra. Az FcRn sejtszintű lokalizációja. A és B placenta, a nyilak a magzati kapilláris endotél sejteket mutatják C és D szikzacskó, a nyíl az endoderm sejtréteg apikális felszínén mutatja az expressziót E és F, Az aminon nem festődő sejtjei. G és H, Szikzacskó és placenta negatív kontrol. (mérő szakasz A, E, G- 200 μm ; C, H- 100 μm ; B,D,F-50 μm).Használt ellenanyag:kecske anti humán FcRn (K13)



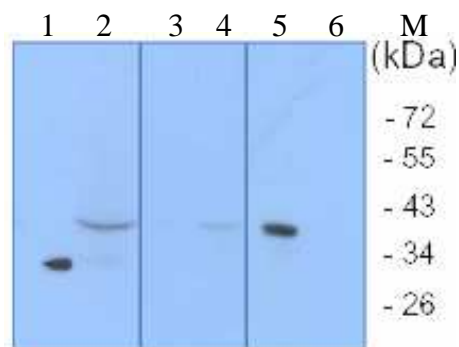
10. ábra Az FcRn sejtszintű lokalizációja. A és B szikzacskó, C Az aminon nem festődő sejtjei. (mérő szakasz 50 μm).Használt ellenanyag:csirke anti bovine FcRn

A nyúl FcRn pH függő működésének vizsgálata

Az eddig megismert FcRn molekulák mindegyike szigorúan pH függő módon működik. Alacsony pH mellett képes megkötni az IgG molekulákat (pH 6.0), semleges pH érték mellett megtörténik a disszociáció. Azonban Meads and Wild arra következtetésre jutottak, hogy a nyúl FcRn molekula nem pH függően működik. Ha ez igaznak

bizonyul, akkor a nyúl FcRn alapvetően másképp működik mint az emlősökben eddig megismert neonatális Fc receptorok, és ez felveti a molekula új funkcióinak lehetőségét is. Ezt az elméletet mi mindenképpen cáfolni vagy igazolni szeretnénk volna. Elő megközelítésként egy viszonylag egyszerű rendszert választottunk. Ebben a tisztított nyúl FcRn nehéz láncát, a tisztított nyúl béta-2 mikroglobulint, valamint kereskedelmileg kapható tisztított nyúl IgG molekulákat vizsgáltunk volna surface plasmon resonance (SPR) vizsgálati eszközzel, mely alkalmas nemcsak a molekulák közötti kötésekre, hanem átfolyó rendszerben pH függés vizsgálatára is. Kísérleteinkhez klónoztuk a nyúl béta-2 mikroglobulin teljes cDNS-t, melyet pGem T Easy vektorba klónoztunk, és szekvenáltuk. A kapott fragment 100%-ban megegyezett a génbankban talált szekvenciával. Ezt követően a béta-2 mikroglobulint egy c-terminális HIS tag-et hordozó emlős expressziós vektorba átklónoztuk (pcDNA3.1/myc-His). A fehérje termelését megpróbáltuk emlő epiteliális, valamint egér őssejt vonalakban is. Habár RNS szinten kimutatható volt a nyúl béta-2 mikroglobulin, fehérjét nem tudtuk tisztítani a sejtvonalakból. Mivel az SPR vizsgálatokhoz szükséges a béta-2 mikroglobulin jelenléte, ezért az SPR vizsgálatokat elvetettük.

A pH függést így más vizsgálati módszerrel, az IgG agaróz precipitációval és azt követő Western hibridizációval vizsgáltuk. Ebben az esetben nagy mennyiségű, vemhes nyúl anyából származó szikzacskó fehérje lizátumot készítettünk. Különböző pH viszonyok mellett nyúl IgG agarózhoz kötöttük a lizátum fehérjéit. Ezt követően western blot technikával vizsgáltuk, hogy az FcRn milyen körülmények között kötődik a nyúl IgG-hez. A 11. ábra alapján igazoltuk, hogy a nyúl FcRn hasonlóan az eddig ismert FcRn molekulákhoz pH függő módon működik. Alacsony pH 6.0 esetében megtörténik a kötés, míg pH 7.4-nél disszociáció következik be az IgG és az FcRn között.



11. ábra A nyúl FcRn pH függése IgG agaróz precipitációt követő Western hibridizációval. 1–szolubilis szarvasmarha bFcRn +control, 2– nyúl szikzacskó + kontrol 3- pH 6.0 nem kötött frakció 4–pH 7.4 nem kötött frakció 5– kötött frakció pH 6.0 mellet, 6–kötött frakció pH 7.4 mellett, M–molekulasúly marker

A pH függés vizsgálata után végső kísérletként indirekt módszerekkel megvizsgáltuk a nyúl IgG-nyúl FcRn kötést. Anti-ovalbumin specifikus nyúl IgG-t tartalmazó nyúlszérumot fecskendeztünk felnőtt nyulak vénájába, majd ELISA rendszer segítségével nyomon követtük az Ova-IgG kiürülését. A kiürülés dinamikája alapján megállapítottuk a molekula féléletidejét, mely átlagosan 11.93 napnak bizonyult. Szarvasmarha IgG féléletideje azonos rendszerben 1.64 nap, míg az emberi IgG féléletideje nyúl rendszerben átlagosan 2.45 napnak bizonyult. A vizsgálatok alapján a nyúl FcRn molekula legerősebben a nyúl IgG-t köti, és

védi a lebomlástól, de képes más emlős IgG molekulákat is megkötni. A kapott eredmények egybevágóak a molekuláris törzsfaj alapján várt értékekkel.

Vizsgálataink bebizonyították, hogy az általunk klónozott és jellemzett molekula a neonatális nyúl FcRn, mely alapvető tulajdonságaiban megegyezik az eddig jellemzett és megismert FcRn molekulákkal.

A legfontosabb eredmények összefoglalása jelenleg kézirat formájában található. A *Molecular Immunology* szaklapba 2011 március végén küldjük el az anyagot *Cloning and characterization of the rabbit neonatal Fc receptor* címen. Szerzők: Lemos Ana Paula Catunda, Judit Cervenak, Orsolya Hoffmann, Anita Farkas, László Hiripi, Imre Kacsokovics

Az eredmények közvetlen hasznosítása

A téma által létrejött eredményeknek megindult a közvetlen hasznosítása. Az Immunogenes Kft, az ELTE, valamint az MBK közös célkitűzése olyan transzgenikus nyulak kifejlesztése amelyek lényegesen több, antigén specifikus ellenanyagot termelnek. A fejlesztés alapját az a felismerés adja, amely szerint az FcRn kifejeződésének fokozása az antigén specifikus B-sejtek számának és az ellenanyagok termelődésének növekedését, valamint az IgG típusú ellenanyagok csökkent mértékű lebomlását eredményezi transzgenikus egérben. A kísérleteket az OM-00117-00120/2008 azonosítójú IGRABBIT pályázat támogatja. A fenti projekt során létrehozunk olyan transzgenikus nyulakat, melyekben a nyúl saját FcRn-jét szeretnénk túltermeltetni. Mind cDNS mind genomi konstrukciókat felhasználunk a kísérletekhez. Ezekhez a kutatásokhoz nélkülözhetetlen volt a nyúl FcRn molekuláris jellemzése. A cDNS alapú SIV-CAG-rFcRn konstrukcióval lentivírus alapon hoztunk létre transzgenikus alapító egyedeket. A lentivírusos transzgenézis módszerét nyúlban ehhez ki kellett előzetesen dolgozni (Hiripi et. al. 2010). A létrehozott alapító egyedek a transzgenre mind mozaikosnak bizonyultak, és ivarsejtjeikben nem jelent meg a transzgén. Ezért áttértünk a genomi nyúl FcRn-t hordozó transzgenikus állatok létrehozására. Két transzgenikus alapítónk örökíti is a transzgént, így lehetőségünk nyílt a megfelelő transzgenikus állatvonal kialakítására. Jelenleg a transzgenikus vonalak immunológiai jellemzése zajlik, mely megmutatja, hogy a transzgenikus nyúl vonal valóban alkalmas-e nagy mennyiségű és magas specificitású ellenanyag előállítására.

Irodalomjegyzék

Ahouse JJ, Hagerman CL, Mittal P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Simister NE. Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC. *J. Immunol.* 1993. 151:6076-6088.

Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS. Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J Immunol.* 2007. 179(7):4580-8.

Batty I, Brambell FW, Hemmings WA, Oakley CL. Selection of antitoxins by the foetal membranes of rabbits. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1954 Sep 27;142(909):452-71.

Brambell FW, Halliday R, Morris IG.

Interference by human and bovine serum and serum protein fractions with the absorption of antibodies by suckling rats and mice.
Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1958 Jul 1;149(934):1-11.

Cianga P, Medesan C, Richardson JA, Ghetie V, Ward ES.
Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice.
Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2515-23.

Ghetie V, Ward ES.
Transcytosis and catabolism of antibody.
Immunol Res. 2002;25(2):97-113.

Hiripi L, Negre D, Cosset FL, Kvell K, Czömpöly T, Baranyi M, Gócza E, Hoffmann O, Bender B, Bosze Z.
Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector.
Transgenic Res. 2010. (5):799-808.

Kacskovics I, Wu Z, Simister NE, Frenyo LV, Hammarstrom L.
Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc receptor.
J Immunol. 2000 Feb 15;164(4):1889-97.

Kacskovics, I., Z. Kis, B. Mayer, A. P. West, Jr., N. E. Tiangco, M. Tilahun, L. Cervenak, P. J. Bjorkman, R. A. Goldsby, O. Szenci, and L. Hammarstrom. 2006a. FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. *Int Immunol* 18:525-536.

Kacskovics I, Mayer B, Kis Z, Frenyó LV, Zhao Y, Muyltermans S, Hammarström L.
Cloning and characterization of the dromedary (*Camelus dromedarius*) neonatal Fc receptor (drFcRn)
Developmental and Comparative Immunology 2007, 31(9):945-61.

Kraehenbuhl JP, Campiche MA.
Early stages of intestinal absorption of specific antibodies in the newborn. An ultrastructural, cytochemical, and immunological study in the pig, rat, and rabbit.
J Cell Biol. 1969 Aug;42(2):345-65.

Martin WL, West Jr AP, Gan L, Bjorkman PA. Crystal Structure at 2.8 Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. *Mol. Biol. Cell*, 2001. 7:867–877.

Meads TJ, Wild AE.
Evidence that Fc gamma receptors in rabbit yolk sac endoderm do not depend upon an acid pH to effect IgG binding and transcytosis in vitro.
Placenta. 1994 Jul;15(5):525-39.

Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES.
Differences in the promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies.
Int. Immunol. 2001 13:1551-1559

Roberts DM, Guenther M, Rodewald R.

Isolation and characterization of the Fc receptor from the fetal yolk sac of the rat.
J Cell Biol. 1990. 111(5 Pt 1):1867-76.

Rodewald R.

pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat.
J Cell Biol. 1976 Nov;71(2):666-9.

Schnulle PM, Hurley WL.

Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland.
Vet Immunol Immunopathol. 2003 Feb 10;91(3-4):227-31.

Simister NE, Mostov KE.

An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens.
Nature. 1989 Jan 12;337(6203):184-7.

Sonoda S, Shigematsu T, Schlamowitz M.

Binding and vesiculation of rabbit IgG by rabbit yolk sac membrane.
J. Immun. 1973. 110:1682-1692.

Story CM, Mikulska JE, Simister NE.

A major histocompatibility complex class II-like Fc receptor cloned from human placenta:
possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus.
J. Exp. Med. 1994 180:2377-2381.

Waldmann TA, Strober W.

Metabolism of immunoglobulins.
Prog Allergy. 1969;13:1-110.

Warner CM, Paschetto MG.

Analysis of mRNA levels for the MHC class I-like molecules CD1 and FcRn in
preimplantation mouse embryos.
Am. J. Reprod. Immunol. 2000,43:234-239.