



Szent István Egyetem
Állattenyésztés Tudományi Doktori Iskola

**A NYÚL EMBRIOGENEZIS SPECIFIKUS
VONÁSAI - A LEUKÉMIA INHIBITOR FAKTOR
RECEPATOR (LIFR) ÉS AZ IGG KÖTŐ FC
RECEPTOR (FCRN) GÉNEK IZOLÁLÁSA ÉS
JELLEMZÉSE**

Doktori értekezés tézisei

Ana Paula Catunda Lemos

GÖDÖLLŐ
2009

A doktori iskola

Megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztési tudományok

Vezetője: **Dr. Mézes Miklós , D.Sc.**
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: **Dr. Bősze Zsuzsanna, D.Sc.**
Tudományos tanácsadó
az MTA Doktora
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

Megtermékenyítés után, az érett petesejt kétsejtes állapotú totipotens blasztomérákat hordozó embrióvá átalakulása az anyai mRNS-ek jelentős lebontásával jár. Az anyai RNSEk irányítják a korai embrionális fejlődést, miközben az újonnan létrejött embriók még transzkripcionálisan inaktívak. Az anyai-zigóta átalakulás alatt indul el az embrionális transzkripció párhuzamosan azokkal a folyamatokkal, melyek az anyai mRNS-ek lebontását okozzák. Ez kulcsfontosságú lépés a génextpresszió szabályozásában amíg a zigóta aktív állapotba kerül.

Az egér embriogenezisének vizsgálata sok információt szolgáltat az emberi embrionális fejlődésről is. Az emlősök embrionális fejlődéséhez hasonlóan az egér fejlődése molekuláris szempontból nagyon hasonlít az emberéhez, habár néhány fiziológiai jellemző mégis eltérő.

A nyúl népszerű laboratóriumi állat, amit széleskörűen használnak különböző kutatási célokra. Tartása és tenyésztése laboratóriumi körülmények között egyszerű. Felhasználható orvosi biológiai célokra, például diagnosztikai technikák fejlesztése, gyógyszerek vagy kozmetikumok toxicitási vizsgálata és felhasználják olyan protokollok fejlesztéséhez, amelyek emberi betegségek gyógyítására irányulnak. Mivel a nyúl fiziológiája meglehetősen hasonlít az emberéhez - nemcsak a kifejlett állapotban, hanem az embrionális korban is (a placenta és a transzkripció aktivitás kialakulása) - toxicitási tesztekhez is remekül alkalmazható.

Kutatásaim arra irányulnak, hogy jobban megérthessük azokat a faktorokat, amelyek a nyúl korai embrionális fejlődéséért, illetve a beágyazódásért felelősek. Ilyen faktorok a LIF és LIFR is, amelyek szerepet játszanak az embrió beágyazódásában és az őssejtvonalak alapításában. A nyúl ES sejtek tenyésztése egy olyan új technológia lehet, ami felhasználható transzgenikus nyulak létrehozásához, mivel a mikromanipuláció hatékonysága alacsony, és bizonyos genetikai módosítások létrehozása nem lehetséges ezen a módon. A nyúl széleskörűen használt az antitest termelési iparban, így annak megértése, hogy az immunoglobulin G hogyan jut el az anyától az utódig, valamint ez a folyamat hogyan szabályozódik, értékes tudásanyag.

Az értekezés célkitűzései:

- A nyúl korai embrionális fejlődésében résztvevő faktorok felderítése - mint például a nyúl Leukémia Inhibitor Faktor – és expressziójuk meghatározása különböző szövetekben és fejlődési stádiumokban.
- Annak igazolása, hogy a LIFR fontos szerepet játszik a nyúl ES sejtek alapításánál.
- A nyúl neonatális Fc receptor (FcRn) klónozása és jellemzése, kifejeződésének meghatározása különböző szövetekben.
- FcRn expresszió jellemzése az extraembrionális nyúl szövetekben, így a placentában és szikzacskóban annak érdekében, hogy megértsük az anyai immunitás átadásának folyamatát az anya és az embrió között.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. RNS tisztítása és cDNS szintézis

Egy 13,5 napos vemhes, valamint kontrol nőstény Hycote nyúl felhasználásával agy, szív, izom, nyálmirigy, nyirokcsomó, tüdő, bőr, máj, lép, vékonybél, vese, húgyhólyag, here, petefészek, méh, és placenta mintákat gyűjtöttünk. Szikzacskó és ivarléc mintákat is gyűjtöttünk 13,5 napos nyúl embriókból. Minden szövetet -70°C -on tároltuk az RNS minták izolálásáig, melyet RNABee reagenssel végeztünk.

A teljes RNS izolálását követően az RT-PCR reakciót az ivarléc és máj mintákból egy lépéses RT-PCR-el végeztük. Degenerált primereket terveztünk az emberi, egér és patkány LIFR szekvenciák alapján a legkonzervatívabb régiókra a CLUSTALW programcsomag BIOEDIT programját felhasználva (7.0.1 verzió). Egy 526 bp hosszúságú PCR szakaszt sikerült felszaporítani, kitisztítani majd pGEM-T Easy plazmid vectorba klónozni, és szekvenálni.

2.2. A LIFR, gp130, és LIF expresszió vizsgálata különböző nyúl szövetekben, és fejlődési állapotokban RT-PCR segítségével

A megfelelő szövetekből a cDNS első szálát M-MuLV Reverz Transzkriptáz enzim segítségével szintetizáltuk. A megfelelő cDNS-t ezt követően PCR reakció segítségével szaporítottuk fel az általunk jellemzett LIF receptor klón alapján tervezett génspecifikus primerek felhasználásával. A nyúl LIF valamint gp130 specifikus oligonukleotidokat már létező EST szekvenciák alapján terveztük. Endogén kontrollnak a GAPDH gént választottuk. Minden PCR reakciót 1 % -os agaróz gélen választottunk el.

2.3. Fluorescens In Situ Hybridizáció (FISH)

Nyúl specifikus LIF receptor primerek segítségével sikerült két olyan klónt izolálni, amelyek hordozzák a nyúl LIF receptor teljes génjét (102H02 és 206F02 klónok). A hibridizációhoz a 102H02 BAC DNS-t izoláltuk és jelöltük biotin-14-dATP felhasználásával 15°C -on egy órán keresztül nick-transzlációs módszer segítségével. A jelölt DNS-t Sephadex G50 oszlopon tisztítottuk százszoros mennyiségű jelöletlen nyúl és heringsperma genomi DNS jelenlétében. Ezt követően a DNS-t kicsaptuk izopropanollal, és visszaoldottuk 8-10 ng/ μl koncentrációban.

2.4. A nyúl embriók gyűjtése és tenyésztése

Az embriógyűjtéshez felnőtt Hycote nyulakat használtunk. A szuper ovuláció, valamint az embriók nyérése a petevezetőből Besenfelder (1998) módszere alapján történt. A nyolcsejtes embriókat 44 órával a termékenyítés után gyűjtöttük.

Az RDH tenyésztő médiumot Ham's F10, RPMI és DMEM médium 1:1:1 arányú keverékéből állítottuk elő 5 mM taurin és 0.3 % BSA jelenlétében. A nyolcsejtes embriókat 20 μl térfogatú RDH médiumcseppekben, 35 mm átmérőjű steril petricsészékben paraffin olajjal lefedve tenyésztettük 38.5°C -on, 5 % CO_2 jelenléte mellett.

2.5. Nyúl ES sejtvonalak létrehozása

Nyolcsejtes nyülembriókat gyűjtöttünk 1,5 nappal a termékenyülés után, majd in vitro körülmények között tenyésztettük 48 órán keresztül. A 3,5 napos blasztocisztákból a zona pellucidát 0,5 % pronáz segítségével eltávolítottuk steril PBS oldatban. Ezután mosási lépéseket követően a blasztocisztákat tenyésztőmédiumba helyeztük vissza mitomycin C kezelt egér tápláló sejtrétegre. A blasztociszták letapadását azok növekedése követte 4 napon keresztül, majd az ICM sejtesomókat akkutáz enzimmel kezeltük. A kezelést követően a létrejött kis ICM sejtesomókat új tápláló sejtrétegre raktuk át. A morfológiailag nem differenciált sejtkolóniákat kiválogattuk, akkutázal

kezeltük, majd ismét friss táplálórétegre helyeztük.

2.6. Valós idejű PCR különböző nyúl passzázsszámoknál

A kompakt ES jellegű kolóniákból RNS-t izoláltunk RNABee-vel. A cDNS szintézist Mu-MuLV Reverz Transzkriptázzal végeztük a fent leírtak szerint. A QPCR-hez a Power SYBR Green PCR Master Mix kitet használtuk a gyártó útmutatásainak megfelelően. Az eredményeket a Rotor-Gene programmal elemeztük (v6.0.27). A statisztikai elemzéshez a Student's t-tesztet használtuk P0.05 szignifikancia szint mellett.

2.7. A nyúl FcRn cDNS izolálása RACE módszerrel, valamint a szövetspecifikus génmegjelenés vizsgálata

A teljes nyúl FcRn cDNS-t májmintából izoláltuk 5' és 3' RACE PCR technikát felhasználva. A kapott fragmenteket pGEM-T Easy Vektorba klónoztuk, és szekvenáltuk. Az expressziós vizsgálatokat a különböző szövetekben, valamint embrionális stádiumokban nyúl FcRn specifikus oligonukleotidok segítségével végeztük.

2.8. A fehérje megjelenésének vizsgálata Western hibridizációval, valamint immunhisztológiával

23 napos nyúlembrióból extraembrionális szöveteket gyűjtöttünk, (placenta, amnion, szikzacskó) majd összfehérje izolálást végeztünk. A fehérje detektálásához az FcRn specifikus K13 antitestet használtuk.

Ugyanezeket a szöveteket paraffinba ágyaztuk, és hisztológiai elemzéseket végeztünk a fenti antitest felhasználásával. Ezáltal a nyúl FcRn szöveti megoszlását határoztuk meg.

3. EREDMÉNYEK

3.1. LIFR izolálása, és a fehérje jellemzése

A fent leírt degenerált primerekkel egy 526 bp hosszúságú DNS szakaszt izoláltunk, és szekvenáltunk. A kapott szakasz 85%-ban homológ az egér, 87%-ban a humán, és 85%-ban a patkány LIFR szekvenciákhoz képest az NIH adatbázisa alapján.

Az izolált szakasz megfelel a fehérje transzmembrán domén egy szakaszának, valamint a teljes citoplazmás régióknak.

A számítógéppel generált fehérje szekvencia konzervált cisztein oldalláncokat mutat a transzmembrán domén citoszol végéhez közel, ezenfelül 3 konzervált és a funkció szempontjából fontos fehérjeszakaszt is tartalmaz melyeket 1, 2, és 3 szakaszként jelöltünk.

A kapott szekvencia összehasonlítása más fajokkal megmutatta, hogy a fehérje 6 lehetséges tirozin foszforilációs helyet hordoz, valamint tartalmaz olyan fehérjekapcsolódási pontokat a citoplazmás doménben, amelyek a jelátvitelben játszanak szerepet.

3.2. FISH vizsgálatok

Mivel a nyúl LIFR szekvenciája teljes mértékben még nem ismert, ezért olyan kísérletet terveztünk amelynek segítségével a gén pontos kromoszomális elhelyezkedését megismerhetjük. Egérben a gén a 15. kromoszóma középső részén, emberben pedig az 5. kromoszóma 12-p13 régiójában található. FISH kísérleteink alapján a nyúl LIFR gén a 11. kromoszóma p11.1 (OCU11. p11.1) területén helyezkedik el.

Interspecifikus backcross vizsgálatok rámutattak, hogy az egér ezen szakasza az

emberi 5p régióval homológ. Az összehasonlító nyúl-emberi kromoszóma térkép szerint az emberi 5. kromoszóma a nyúl 11. kromoszómának felel meg (Korstanje et al., 1999), ezt megerősítik (Chantry-Darmon et al., 2003). FISH eredményei, amely szerint a fenti két kromoszóma homológ.

3.3. A LIFR mRNS szöveti megjelenése térben és időben

A LIFR-gp130 heterodimert alkot, minden általunk vizsgált szövetben expresszált, kivéve a szikzacskóban és a húgyhólyagban. A LIF mRNS-t sem sikerült kimutatni a húgyhólyagban.

A membrán-kötött LIFR nem volt kimutatható a korai embrionális szakaszban RNS szinten (3,5 és 4,5 dpc) először 6,5 napos embrióban detektálható jelenléte, amely megfelel a beágyazódás körüli időszaknak. A LIF mRNS hasonlóan a többi emlőállathoz a hólyagsírában jelenik meg először.

3.4. A LIFR expresszió vizsgálata nyúl ES sejtekben különböző LIF kiegészítésekkel, QPCR módszerrel

Mivel nyúl LIF nem szerezhető be tisztított formában, ezért kísérleteinkben patkány LIF-et használtunk a médiumban kiegészítésként, mely hatékonyan gátolta a nyúl ES-szerű sejtek differenciációját. A patkány LIF kiegészítést előkísérletek során választottuk ki hatékonyságuk alapján emberi, egér és patkány fehérjék közül.

Korai passzázsszámoknál nem találtunk különbséget a különböző LIF típusok között, de későbbi passzázsszámoknál a LIF nélkülözhetetlennek bizonyult, és a patkány LIF működött a legjobban. QPCR eredményeink jelentős expressziós különbséget mutattak ki a nyúl őssejtek alapítása során bizonyítva, hogy jelentősen magasabb a LIFR expresszió abban az esetben, ha az őssejtek LIF kiegészített tápoldatban nőnek.

3.5. A Nyúl FcRn cDNS izolálása és szekvenálása

A teljes kódoló nyúl FcRn izolálását, és szekvenálását elvégeztük 5' valamint 3' RACE PCR módszert alkalmazva. A kapott fragment hossza kb 1200 bp. A szekvenciák összehasonlítása során (NIH adatbázis) a kapott DNS szekvencia 80%-ban hasonló az emberi FcRn-hez, 78%-ban a szarvasmarha szekvenciához, és 70%-ban az egér és patkány szekvenciákhöz. 2008 elején Yang és munkatársai szintén izolálták a nyúl FcRn cDNS-t (EU_327788). Az általuk kapott szekvencia 100%-ban megegyezik az általunk izolált cDNS-el.

3.6. A nyúl FcRn és IgG fehérjék

A számítógéppel létrehozott nyúl FcRn szekvencia megmutatta, hogy a fehérje 3 extracelluláris domént., egy transzmembrán domént és egy citoplazmatikus szakaszt is tartalmaz ugyanúgy, mint a többi FcRn molekula. A nyúlhoz leginkább hasonló FcRn fehérjemolekula az emberi (71%). Az alfa-2 domént kódoló 3. exon mutatja a legnagyobb hasonlóságot.

Az egérrel és patkánnyal szemben 62% valamint 63% homológiát mutat a nyúl fehérje. Az alfa-2 doménben a Glu117, Glu132, Trp133, Glu135 és Asp137 aminosavak a leginkább konzerváltabbak az emlősök között. A fenti oldalláncokból a nyúlban a Glu117, Glu132, Trp133 és Glu135 konzervált. Asp137, akárcsak az ember esetében Leu137-ként található meg. Az Asn128 aminosav, melyhez cukoroldallánc is kapcsolódik a rágcsálók körében konzervált, míg az ember a nyúl és a szarvasmarha esetében nem. Ezt azért fontos megemlíteni mert ez az aminosav fontos szerepet tölt be

az FcRn-IgG kapcsolat kialakulásánál (FcRn-IgG régió). A His168 , amely az FcRn albumin kötéséért felel szintén konzervált a nyúlban.

Az IgG molekulában az Ile253, His310, His435 (és His433) a legfontosabb konzervált aminosavak. Ez a nyúl esetében is így van, valószínűleg ezek az oldalláncok vesznek részt az IgG-FcRn kötésben. Egérben és patkányban a legkevésbé konzervált aminosav amely részt vesz az FcRn-IgG kötésben a His436 (emberben Tyr), ha kicserélték Alaninra, az FcRn kötés megszűnt. Nyúlban az emberhez hasonlóan Tyr436 található az adott pozícióban. Az IgG Fc szakasza az FcRn-hez a CH2 és CH3 doménjével kapcsolódik.

Az IgG Fc szakaszán található 3-4 hisztidin oldallánc fontos szerepet tölthet be az IgG FcRn kötésében, valamint a az IgG elengedésében pH 6,5-nél, illetve 7,5-nél.

3.7. Az FcRn szövetspecifikus megjelenése

A vizsgált szövetek mindegyike kifejezte az FcRn-t, így a placenta, a szikzacskó, illetve az amnion, habár az utóbbi szövetben az expresszió mértéke jóval alacsonyabb.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

PhD dolgozatom az alábbi új tudományos eredményeket tartalmazza:

1. A nyúl Leukemia Inhibitor Faktor Receptor (LIFR) részleges cDNS szekvenciáját izoláltam. A szekvencia összehasonlítása más fajokkal megmutatta, hogy a LIFR erősen konzervált az emlősök között, és ez igaz a nyúl esetében is. A LIFR szignálútvonalban fontos szerepet játszó aminosavak, így a harmadik tirozin, az YXXV motívum, az SHP-2 kapcsolódási pontja, 3 másik tirozin (4.-6.) az YXXQ egységénél (STAT3 konszenzus kötőhely) mind konzerváltak a nyúl LIFR intracelluláris doménjében.

2. A LIFR megjelenését a legtöbb szövetben kimutattuk, de nem találtunk expressziót a húgyhólyagban, és a szikzacskóban A receptor gp130 egysége szintén nem expresszált ezekben a szövetekben, mely a receptor két egységének közös kifejeződését mutatja. A LIF mRNS-t nem expresszál a húgyhólyagban.

3. A membrán kötött LIFR nem fejeződik ki a korai embrionális korban, (3,5 dpc és 4,5 dpc) expressziója az embrió beágyazódása idején kezdődik a 6. napon.

4. Izoláltam a teljes nyúl FcRn kódoló szekvenciát, és kimutattam, hogy 80%-ban hasonló az emberi, 78%-ban a szarvasmarha, és 70%-ban az egér és patkány szekvenciákhoz.

5. Az FcRn expressziót a vizsgált szövetek mindegyikében sikerült kimutatni. Fehérje szinten az FcRn megjelenik a placentában és a szikzacskóban, de az amnionban csak sokkal kisebb mértékben. Immunhisztokémiai vizsgálataim szerint az Fc receptort a kapilláris endotél sejtek expresszálják a nyúl placenta magzati oldalán, valamint a szikzacskó endodermális sejtjeinek apikális része.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Nyúl LIFR:

A LIF egy olyan többfunkciós citokin, mely befolyásolja a sejtek differenciációját, túlélését és proliferációját mind felnőtt mind embrionális korban.

Mivel a LIFR fontos szerepet tölt be a LIF-LIFR útvonalban, így összehasonlítottam a nyúl LIF, LIFR, és gp130 cDNS szekvenciákat egér, patkány és emberi ortológokkal. Megállapítottam, hogy a nyúl a funkció szempontjából fontos helyeken konzervált szekvenciaelemeket hordoz. A szekvenciák összehasonlítása, valamint a gén kromoszomális elhelyezése a (nyúl OCU11p11.1 régiójába) alapján megállapítottam, hogy az izolált gén megfelel a nyúl LIFR génjének. Mind az ember, mind az egér esetében elmondható, hogy a LIFR gén a citokin receptor klaszterben az IL-7 receptor, a prolaktin receptor, valamint a növekedési hormon receptor génjével közösen helyezkedik el. Mivel a nyúlban ismert prolaktin, valamint növekedési hormon receptor EST térképezhető az OCU11q13 régióba, így feltételezhető, hogy a citokin receptor klaszter nyúlban a 11. kromoszómán helyezkedik el.

A nyúlban kapott LIF, LIFR expresszió összhangban van a LIF szignálút vonal pleiotróp hatásával. Ugyanez elmondható a nyúl gp130 estében melyet megerősítenek Saito és munkatársai (1992) adatai, akik szintén kimutatták a gp130 expressziót egér szív, lép, tüdő, máj, agy, placenta szövetek mellett egér embrióban, és ES sejtekben is.

A mint a 15. ábrán látható, LIFR és a gp130 expresszió ugyanazt az eloszlást mutatja, és először a 6 napos embrióban jelenik meg. A LIF-gp130 kötést, valamint a LIF receptor gp130 alegységének megjelenését vemhes nyúl méhében már korábban is vizsgálták Yang és munkatársai (1995). A legerősebb kötést a vemhesség 5. és 6. napján tapasztalták a méh epitéliumban. Ez a megfigyelés alátámasztja azt a vizsgálatunkat, hogy a nyúl embrió kapcsolódása a méh szövetéhez, valamint az ezt követő beágyazódás a LIF-LIFR útvonal befolyása alatt áll.

Másrészt Lei és munkatársai (2004) kimutatták a LIFR kifejeződését a nyúl szeder- és hólyagsíra állapotaiban. Ennek az a lehetséges magyarázata, hogy az általuk használt primerek a receptor extracelluláris részét ismerik fel, így ők detektálhatták a LIFR szolubilis formáját, avagy ők még kimutatták az anyai eredetű mRNS-t a nyolcsejtes és morula állapotú embriókban.

A LIF az ES sejtek önmegújító, valamint pluripotencia képességét különbözőképpen befolyásolja az egyes fajokban. A nyúl őssejtek növekedésükben, alakjukban leginkább az emberi ES sejtekre hasonlítanak, de tenyésztési körülményeik eltérőek. Míg az emberi ES sejtek fenntartását a LIF nem segíti elő, addig laboratóriumunkban tenyésztett nyúl őssejtek fenntartásához a LIF nélkülözhetetlennek bizonyult. LIF hiányában a sejtek morfológiailag is eltértek a LIF kiegészítéssel tenyésztett ES sejtektől.

Fang és munkatársai (2006) által izolált nyúl őssejtvonalak csak egér táplálórétegen tenyészthetők, de függetlenek a külsőleg hozzáadott bFGF faktortól, és megtartják nem differenciált állapotukat LIF hiányában is. Az általuk választott tenyésztési körülmények során azonban nem vizsgálták a folyamatban szerepet játszó receptorokat, és leginkább korábbi egér kísérletek alapján dolgoztak.

Immunhisztológiai vizsgálataink szerint az általunk használt nyúl őssejtvonalak a nem differenciált őssejtekre jellemző markerek közül az alkalikus foszfatázt, az Oct-4 és Nanog pluripotencia markert, az SSEA-1 embrionális antigént, a tetraspanint és a CD9 fehérjét expresszálják. A CD9 és a LIF markerek együttesen jelennek meg egér esetében és szerepet játszanak a nem differenciált állapot fenntartásában. A CD9 megjelenése a nyúl esetében azt sugallja, hogy a LIF ebben a fajban is fontos szerepet tölt be.

Nyúl FCRN

A fő hisztokompatibilitási génkomplex I. osztályához hasonló FcRn molekula az IgG szállításában vesz részt az epitéliumban, az endoszómán keresztül. Az FcRn megvédi az endocitózissal belépő IgG molekulákat a lebomlástól. Ez a folyamat két szempontból is jelentős. Az IgG anyagból utódba történő átvitele során, valamint abban az esetben amikor az IgG belép, vagy elhagyja a keringést.

Az emberi FcRn kötésspecificitását tekintve nagyon szigorú molekula. Az a tény hogy az emberi és a nyúl FcRn is hordozza azokat az IgG kötésben szerepet játszó konzervált aminosav oldalláncokat, mint Ile253, His310, His435 és Tyr436 magyarázatot adhat arra, hogy az nyúl IgG erősebben kötődik az emberi FcRn receptorhoz, mint a saját nyúl receptorhoz Ober et.al. (2001). Az emberi FcRn sokkal erősebben köti az egér IgG2b molekulákat mint az egér IgG1 és 2a osztály molekuláit. Ez a különbség valószínűleg a 436. pozícióban lévő aminosavnak köszönhető, mely hisztidin az egér 1 és 2a osztályokban, míg tirozin a 2b alosztályban, hasonlóan az emberhez és a nyúlhoz.

Mikor összehasonlítottuk a nyúl FcRn fehérje szekvenciáját az emberi és rágcsálókban származó adatokkal, bizonyos esetekben az IgG-FcRn kötésben fontos aminosavak különböztek a nyúl esetében, míg mások konzerváltak maradtak.

A receptor-IgG kötést befolyásoló módosítások a következők: Asp137 (savas jellegű aminosav, mely a patkány esetében a kötésben játszik szerepet), a nyúlnál és embernél Leu137, mely közömbös jellegű. A Ser313 (Phe a nyúlban és az opossumban, Ala a tevében). Ez a csere több funkciót is módosíthat. Az apikális-bazolaterális transzcitózis mértéke csökkenhet, illetve a Ser313 kialakíthat olyan FcRn-t, mely inkább az IgG szekrécióban mint az IgG felvételben érdekelt. A másik lehetőség, hogy a rágcsálókban és emberben leírt kétirányú IgG transzport megkérdőjelezhető nyúlban, avagy ezekben a fajokban az FcRn irányította transzcitózis más módon szabályozott. A citoplazmális rész a nyúl esetében 10 aminosavval rövidebb mint a rágcsálókban és az emberben. Érdekes megemlíteni hogy a patkányban (az emberben és nyúlban nem) a citoplazmás "farok" szakaszon dileucin oldalláncok egy olyan szerin szomszédságában helyezkednek el, mely nem más mint egy CKII foszforilációs hely, amely a fehérjék mozgásának szabályozását hivatott végezni. Ennek a CKII foszforilációs helynek a megléte a patkány esetében felveti a kérdést, hogy a foszforilációs hely funkcionálisan aktív-e, valamint hogy az intracelluláris mozgás kinetikája a patkányban, a humánban, és most már a nyúlban is függ az IgG izoformáktól, esetleg a ligand minőségétől, vagy esetleg az adott sejttípustól (pl enterocita vagy szincitiotrofoblaszt)?

A konzervált aminosavakra, melyek szerepet játszanak az FcRn-IgG kötésben a Trp311 és a di-leucin 320/321 (mutáció ezeken a helyeken megzavarja az IgG-FcRn kapcsolatot). 2001-be Wu és Simister szerint a Trp311 és a dileucin mutációját követően az endocitózis még megtörtént, bár csökkent mértékben, míg az Asp317 és Asp318 mutációja teljesen megállította az endocitózis szignál folyamatot mely a dileucin helyhez köthető patkányban. Az Asp317 és/vagy Asp318 így résztvevői egy tipikus dileucin endocitózis szignálnak. Ezek az oldalláncok konzerválódtak az evolúció folyamán, és valószínűleg a nyúlban is ugyanezt a funkciót tölthetik be, hasonlóan mint a His166, mely szintén konzervált és az albumin kötésért felelős hely.

Az FcRn-IgG kötés pH függését rágcsálókban az IgG His310, 435, és His436 oldalláncaihoz lehet kötni. Emberben a His436 helyen tirozin található, ennek ellenére a pH függés megmaradt. Hasonlóan az emberhez a nyúl IgG-ben az első két His konzervált, míg a harmadik helyen tirozin található a 436. pozícióban. Meads és Wilde (1994) szerint a nyúl szikzacskóban az IgG transzcitózisa nem pH függő "in vitro"

körülmények között. Ennek a kérdésnek a tisztázására kísérleteket tervezünk laboratóriumunkban.

Sonoda és munkatársai (1973) igazolták, hogy a nyúl szikzacskó felelős az IgG átjutásában az anyából a magzatba. Az IgG a szikzacskó endodermális sejteinek felszínén a mikrovillusokhoz, valamint a mikropinocitikus vezikulumokhoz kötődik. Wild and Dawson (1977) kimutatta, hogy az IgG szelektív módon transzportálódik át ezen az embrionális membránon, ezzel igazolva közvetett úton az Fc receptor jelenlétét.

Dolgozatomban igazoltuk, hogy a nyúl FcRn a szikzacskóban az endodermális sejtek apikális felén jelenik meg, és ez felelős az IgG (és feltehetően az albumin) transzportjáért is a méhből a magzati keringésbe. A nyúl mellett csak patkány esetében igazolták az FcRn jelenlétét a szikzacskóban. Az anyai IgG átadásánál az FcRn expresszióját placentában in vitro (tenyésztett emberi placenta endotél sejtekben), valamint in vivo módszerekkel (a szincitiotrofoblasztokban emberi méhben) (Simister et. Al. 1996). Brambell és munkatársai (1949) kiderítették, hogy a nyúl placenta részt vesz a passzív immunátvitelben.

A dolgozatban bemutatjuk, hogy a nyúl placenta, pontosabban a magzati kapilláris endotél sejtek expresszálják az FcRn-t, ami azt jelenti hogy a nyúl placenta részt vehet a passzív immunitás átadásában, bár ennek pontos mibenlétét még további kísérletekkel kívánjuk igazolni.

Kísérleteinkben sikerült izolálni egy olyan BAC klónt mely az FcRn-t kódoló gén mellett további géneket is hordoz. Teóriánk alapján az FcRn génje a nyúlban az 5. kromoszóma rövid karjára fog térképeződni.

Az emberi FcRn génje a 19. kromoszóma q13.33 régiójában helyezkedik el. Közel található hozzá a RYR1 gén is a 19q13.2 pozícióban, 11.09 Mb távolságra az FcRn-től. Chantry-Darmon et al. (2003) valamint Korstanje et al. (1999) kimutatták, hogy az emberi 19-es kromoszóma, pontosabban annak hosszú karja (19q), megfelel a nyúl 5. kromoszóma rövid karjának. Az emberi 19. kromoszóma rövid karja pedig a nyúl 10. kromoszóma rövid karjának felel meg. Emellett a nyúl RYR1 szintén az 5. nyúl kromoszómára térképezhető.

Emberben a RYR1-hez és az FcRn-hez közel lévő gének a nyúlban is viszonylag közel vannak a RYR1-hez (5p12). Ilyenek a GPI (5p12prox) és FUT1 FUT2 (5p12). Ez a tény valamint az ember-nyúl összehasonlító géntérkép alapján úgy hisszük, hogy a nyúl FcRn az 5. kromoszómán helyezkedik el, de ezt célszerű lenne FISH vizsgálatokkal igazolni.

6. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

6.1. Folyóirat cikkek

Lemos APC., Gocza E, Carstea VB, Hiripi L, Hayes H, Rogel-Gaillard C, Bertaud M, Bosze Zs. 2008 Characterization, chromosomal assignment, and role of LIFR in early embryogenesis and stem cell establishment of rabbits. Cloning and Stem cells, 10(4):1-6. IF: 2.93

Carstea VB, Lemos APC., Ilie D, Bodo Sz, Kovacs A, Bosze Zs, Gocza E. 2007 Production of identical mouse twins and a triplet with predicted gender. Cloning and Stem cells, 9(2):247-256. IF: 3.03

Baranyi M, Hiripi L, Szabo L, Lemos APC., Harsanyi I, Komaromy P, Bosze Zs. 2007 Isolation and some effects of functional, low-phenylalanine kappa-casein expressed in the milk of transgenic rabbits. J. Biotechnology, 128(8):383-392. IF: 2.60

Silva LP, Lemos APC., Curi R, Azevedo RB. 2006 Effect of fish oil treatment on bleomycin-

induced pulmonary fibrosis in mice. *Cell Biochemistry and Function*, 24:387-396. IF: 1.27

Carstea VB, Lemos APC, Ilie D, Bodó Sz, Kovács A, Bősze Zs, Gócza E. 2006 Az ivar átfordítás lehetőségének vizsgálata egér kimérák alkalmazásával. *Állattenyésztés és takarmányozás*, 55:501-504.

Bősze Zs, Bender B, Baranyi M, Harsányi I, Lemos APC, Kacs Kovics I, Németh V, Bartyik J. 2004 A tejösszetétel módosítása molekuláris genetikai módszerekkel. *Állattenyésztés és takarmányozás*, 53:465-475.

6.2. Konferencia kiadványok

Baranyi M, Lemos APC, Bodrogi L, Bender B, Szabó L, Hiripi L, Bősze Zs. 2005 Expression of low-phenylalanine kappa-casein in the milk of transgenic rabbits, *FEBS Journal*, 272 (1). **IF: 3.41**

Carstea VB, Lemos APC, Ilie D, Bodó Sz, Kovács A, Gócza E. 2006 Mouse triplets developed from single blastomeres of an 8-cell stage embryo supported with tetraploid embryos. *IETS, Reproduction, Fertility and Development*, 18:1-2. **IF: 1.51**

Hiripi L, Gócza E, Lemos APC, Kvell K, Czömpöly T, Bősze Zs. Second generation transgenic rabbits. 1st International Conference on Transgenic Rabbits, Tsukuba, Japan, 2008.

Lemos APC, Gócza E, Carstea VB, Rogel-Gaillard C, Hayes H, Hiripi L, Bősze Zs. Characterization of the rabbit Leukemia Inhibitory Factor receptor gene. *ES Tools Annual Consortium Meeting*, Budapest, 1-5 June, 2008.

Gócza E, Lemos APC, Hiripi L, Bősze Zs. On the role of LIF and LIFR expression during rabbit embryonic stem cell line establishment. 16th ICAR, Budapest, 2008.

Gócza E, Lemos APC, Hiripi L, Carstea VB, Hayes H, Rogel-Gaillard C, Hiripi L, Bősze Zs. Applied embryological research by biotechnological methods in rabbit. 2th International Meeting on Mammalian Embryogenomics, October 17-20, 2007, Paris.

Hiripi L, Baranyi M, Carnwath JW, Niemann H, Bodrogi L, Raaben W, Brands R, Seinen W, Lemos APC, Bender B, Szabó L, Bősze Zs. 2006 Transgenic rabbit as models for producing biologically active human recombinant proteins. In: *Genetika 2006*. Ljubjana, Slovenia 28.09-1.10. pp 76.

Baranyi M, Hiripi L, Szabó L, Bodrogi L, Lemos APC, Bender B, Harsányi I, Bősze Zs. Expression and characterization of functional low-phenylalanine kappa-casein and its isolation from the milk of transgenic rabbits. 3rd International Symposium: Milk Genetics & Human Health, September 19-21, 2006, Brussels.

Gócza E, Lemos APC, Hiripi L, Bodrogi L, Bősze Zs. Characterization of rabbit embryonic stem cell like cells. *International Conference, Embryonic and Somatic Stem Cells-Regenerative Systems for Cell and Tissue Repair*. Nova Acta Leopoldina, NF 95. Nr. 352. p121, 2006.

Lemos APC, Baranyi M, Bodrogi L, Bender B, Szabó L, Hiripi L, Bősze Zs. Transgenic rabbit as a model for producing low-phenylalanine milk proteins. 13th IMP Spring Conference/ IMBA Conference, 19-21 May, 2005.

Hiripi L, Baranyi M, Carnwath JW, Niemann H, Bodrogi L, Raaben W, Seinen W, Lemos APC, Bender B, Szabó L, Bősze Zs. Transgenic rabbits as models for producing biologically active human recombinant proteins, *Proceedings of the 5th International Conference on Transgenic Animals*, China, 2005.

Hiripi L, Baranyi M, Gócza E, Lemos APC, Whitelaw B, Bősze Zs. Production of kappa-casein knock-out ES cell line derived chimeras. *Proceedings of 5th International Conference on Transgenic Animals*, Guangzhou, China, p. 72, 2005.

Gócza E, Bodrogi L, Lemos APC, Bősze Zs. Derivation and characterization of rabbit embryonic stem cells. 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, Munich, P299, p. LXXIX, 2005

Gócza E, Bodrogi L, Lemos APC, Bősze Zs. Immunocytochemical characterization of rabbit ES like cell colonies. 1st International Conference on Transgenic Rabbits, Tsukuba, Japan, P-6, pp. 12-14, 2005.