

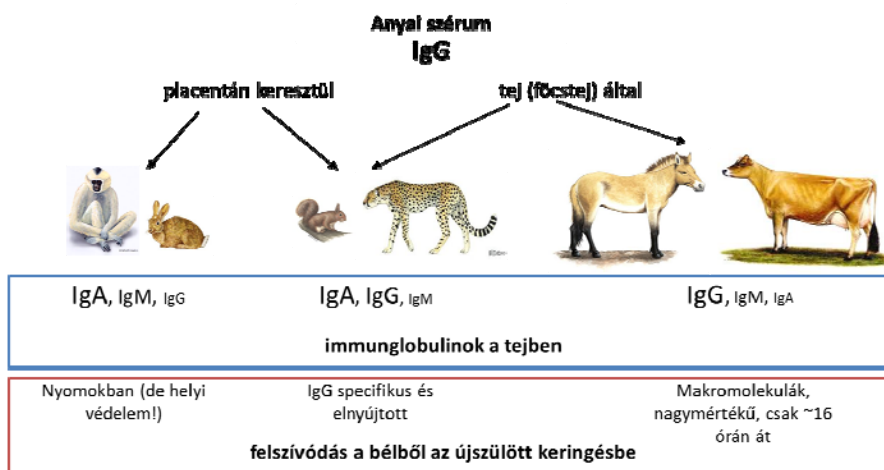


### Válasz Dr. Mándi Yvette egyetemi tanár bírálata

Köszönöm Dr. Mándi Yvette professzor asszonynak, hogy elbírálta értekezésemet és köszönöm a dolgozatról alkotott elismerő véleményét. Az értekezéssel kapcsolatos megjegyzéseire és kérdéseire adott válaszaim a következők:

1. Az 1. ábra bemutatja az anyai immunoglobulinok utódba jutásának mechanizmusait. A többi emlősfajhoz hasonlóan, a főemlősök esetén is a szisztémás eredetű IgG a maternális immunoglobulinok legfontosabb izotípusa, amely ebben a csoportban kizárólag a placentán keresztül jut a magzatba [1,2]. Ez ugyan az ábrához kapcsolódó szövegkörnyezetben szerepel, ám az ábráról valóban lemaradt, ami nehezíti az értelmezést (az ábrát ennek alapján javítottam; **1. ábra**; [3]).

#### 1. ábra - Az emlősök az anyai immunoglobulin utódba irányuló transzportja alapján három csoportba sorolhatók

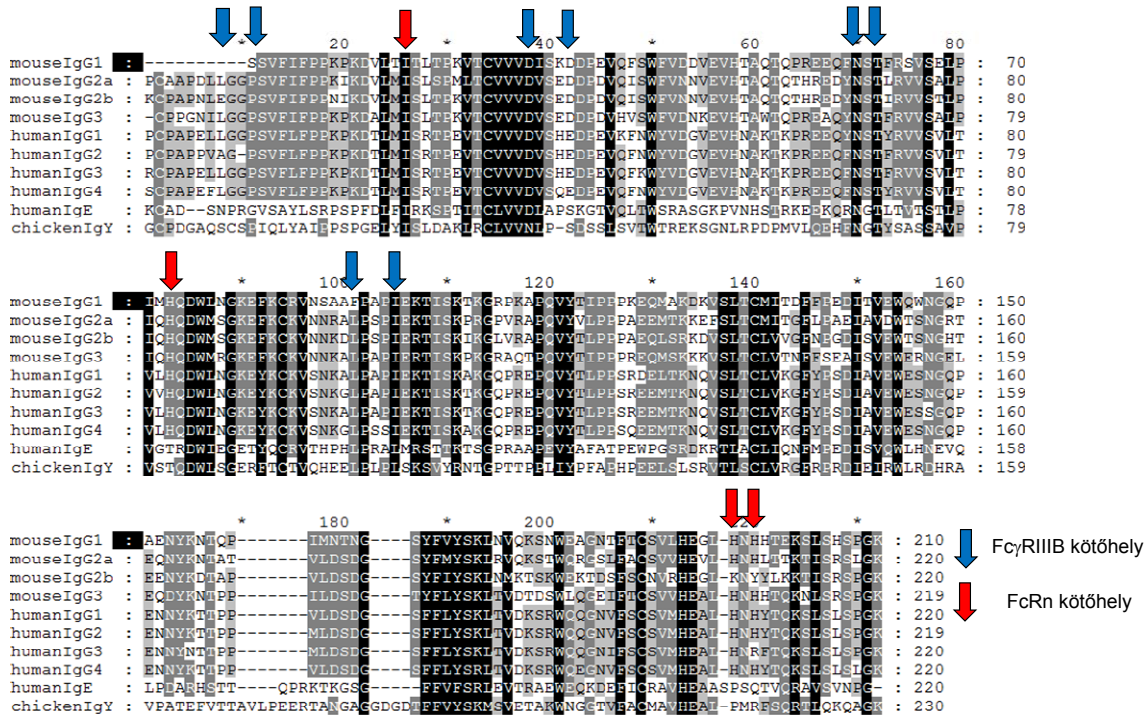


Szeretném ugyanakkor kiemelni, hogy az emberi anyatej elsősorban a tejmirigyben lokálisan termelődő IgA izotípust tartalmazza, ami az újszülött gastrointestinális, ill. felső légúti védelmét biztosítja, onnan felszívódni és a keringésbe bekerülni nem tud [4]. Az emberi anyatej IgG tartalma nagyon alacsony, különösen a többi csoporthoz képest, és az újszülött bélcsatornából is csak elenyésző mértékben tud felszívódni. Mindezek gyakorlati jelentősége többek között az, hogy az anya védőoltása (pl. influenza elleni) kapcsán termelődő IgG ellenanyagok csak a terhesség idején (a harmadik trimeszter elejéig-közepéig) tudnak FcRn közvetítésével a magzatba jutni és csak így védik meg az újszülöttet az esetleges fertőzéstől. Ennek ismerete és alkalmazása különösen fontos egy pandémiás időszakban [5,6].

2. A teve FcRn karakterizálása két szempontból volt izgalmas számunkra. Egyfelől a tevéfélék (*Tylapoda*) is a kérődzők csoportjába tartoznak, tehát a juh és szarvasmarha (*Ruminentia*) FcRn elemzéseinket érdekes, új adattal tudtuk kiegészíteni, részben összehasonlító elemzéseként, ill. azért mert a teve számos országban fontos gazdasági haszonállat. Míg a kérődzők közül a szarvasmarha, juh és kecske esetén ismert, hogy a kolosztrum, ill. tej akár 50-80-szor több IgG1 izotípust tartalmaz, mint amennyi IgG2-t (annak ellenére, hogy a vérplazmájukban közel azonos e két izotípus aránya), addig ilyen irányú adatokkal a tevéfélék esetén nem rendelkezünk. Tekintettel arra, hogy a tevéfélék három IgG izotípusa közül kettő (IgG2, IgG3) olyan funkcionális ellenanyag, amely csak két nehézláncból áll [7], kíváncsiak voltunk arra, hogy ez mennyiben befolyásolja az FcRn-hez kapcsolható funkciót, így a tejbe történő transzportot. Kísérleteink első fázisában jellemeztük a teve FcRn-t és ezt publikáltuk, ám sajnos a funkcionális elemzésre megfelelő forrás hiányában nem került sor, ill. tudomásom szerint ilyen irányú vizsgálatokat azóta sem végeztek.
3. A csirke IgY valóban jól használható, általában háttér reakciók nélkül, a legkülönbéle immunológiai tesztekben, pl. az emlős immunhisztokémiai elemzések során. Ezt valójában a korábbi gyakorlati tapasztalatok igazolták, aminek magyarázata minden bizonnyal a csirke IgY és az emlős IgG aminosav szekvenciák, ill. poszttranszlációs különbségekből adódik, különösen azokban a régiókban, amelyek fontosak az emlős IgG - emlős Fc receptorok kapcsolódásában. Régóta ismert, hogy a madár (kételtű, hüllő) IgY, az emlős IgG-hez hasonlóan biztosítja a maternális immuntranszportot. A csirke IgY-ról kimutatták, hogy a tojássárgájából (szik) az embrió szikzacskó falán keresztül, egy specifikus receptor révén transzportálódik a magzatba [8]. A receptort 2004-ben azonosították, és kimutatták róla, hogy a funkciót (epithel sejteken keresztüli transzport) és a receptor-IgY kölcsönhatást (kémhatás függő kapcsolat) figyelembe véve hasonlít az MHC-I rokon FcRn-hez, de molekuláris sajátossága – független evolúciós fejlődés eredményeként - teljesen eltér attól, mivel egy foszfolipáz A(2) receptor homológ [9]. Ismert, hogy a csirke IgY molekulatömege nagyobb, mint az emlős IgG, mivel egy nehéz-lánc konstans doménnel többel (CH2 - vélhetően az emlős IgG kapocs-régiójának őse) rendelkezik, valamint, hogy allergiás reakciók kiváltására képes, amely az emlős IgE izotípusra jellemző (szerkezetileg is inkább az IgE-re hasonlít). Feltételezések szerint a kételtűekben, hüllőkben is meglévő IgY az emlősökben génduplikációval hozta létre az IgE, ill. IgG molekulákat, úgy, hogy az IgE kevésbé változott az evolúció során és így jobban hasonlít az ősi IgY típusú molekulához [10-12]. A főként fehérvérsejteken kifejeződő Fc $\gamma$  receptorokkal (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII és Fc $\gamma$ RIII) az IgG az ún. kapocs-régió alsó részén, ill. a CH2 domén felső részén található átfedő, bár nem pontosan megegyező aminosav maradványokkal kapcsolódik, míg az FcRn-el a CH2-CH3 domének közötti régióban [13-15]. Az emlős IgG és madár IgY Fc szekvenciák nagymértékű eltérését a már jól karakterizált IgG – Fc $\gamma$ RIIIB [13], valamint az IgG – FcRn [15] interakciókban részt vevő aminosavmaradványok összehasonlításán keresztül mutatom be. Jól látható, hogy a kérdéses motívumok esetén a humán és egér IgG molekulák között nagyfokú a hasonlóság, míg a csirke IgY jelentősen eltér ezekben a régiókban, ill.

általánosan is az IgG molekuláktól (2. ábra; az egyes aminosavmaradványok háttérének intenzitása párhuzamos a hasonlóság mértékével). Mindezek molekuláris szinten is magyarázzák a csirke IgY kiváló alkalmazhatóságát emlős szövetteni metszeteken végzett vizsgálatokban.

## 2. ábra - Az emlős IgG és csirke IgY Fc régió aminosav szekvenciák jelentősen különböznek egymástól



4. A különböző emlősfajok FcRn és IgG molekuláiban azok az aminosav maradványok, amelyek a patkány FcRn-IgG komplex röntgenkristályos elemzése kapcsán az interakcióban [15] részt vesznek csaknem teljes homológiát mutatnak [16] azt sugalva, hogy a különböző fajok FcRn és IgG molekulái hasonló mértékben kapcsolódhatnak egymáshoz. Ennek ellenére régóta ismert, hogy még a fajazonos FcRn molekulák is eltérő intenzitással kapcsolódnak az adott faj különböző IgG izotípusaival is, az eltérő fajú állatok IgG molekuláival pedig, ahogy Opponensem által is hivatkozott cikk tárgyalja [17], esetlegesen. Ennek oka az, hogy az egyes fajok IgG molekulái és Fc receptorai egyfajta ko-evolúció révén biztosítják a funkció - jelen esetben az IgG-FcRn interakció - megőrzését, míg ez nem valósulhat meg a különböző fajok molekulái esetén és így a nagymértékű filogenetikai távolság véletlenszerűvé teszi a kapcsolódást. A Tg állatainkban végzett IgG katabolizmus vizsgálataink szerint a bovin FcRn nehéz-lánc: egér béta 2-mikroglobulin heterodimer megköti az egér és a humán IgG molekulákat is, valamint a bovin FcRn nehéz-lánc citoplazmikus régiója hatékonyan együttműködik az egér szignalizációs fehérjékkel és e két faktor együttesen biztosítja azt, hogy a bovin FcRn Tg egerekben az egér és humán IgG védelme, valamint az egerek humorális immunválasza jelentősen fokozódik (feltételezésünk szerint a humán IgG-t termelő, ún. humanizált

egerekben is hatékony lehet a bFcRn fokozott kifejeződése annak érdekében, hogy immunválaszuk fokozódjék). FcRn transzgenikus nyulainkban a nyúl FcRn-t fejezik ki nagyobb mértékben a fokozott immunválasz elérése érdekében, így ezekben az állatokban a fajok közti keresztreakció képessége csak abban az esetben merül fel, ha a későbbiekben human IgG-t termelő, ún. humanizált nyulakban szeretnék az FcRn kifejeződés fokozásából adódó előnyöket kihasználni. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a nyúl FcRn hatékonyan megköti az emberi IgG-t [18,19].

5. Tg egereinkben és nyulainkban a FcRn fokozott mértékű kifejeződése nagyobb számú antigén-specifikus B-sejt kialakulását eredményezi, a fokozott mértékű IgG védelem mellett. Elemzéseink arra is rávilágítottak, hogy a B-sejt aktiválás fokozódása jelentősebb hatású a megnövekedett humorális immunválasz szempontjából, mint a fokozott IgG védelem. A dolgozat benyújtása óta végzett elemzéseink kimutatták, hogy az FcRn Tg egerekben az immunizálás hatására nagyobb számú antigén-specifikus Thelper sejt is képződik, valamint ezeknek az állatoknak a csíráközpontja átlagosan kétszer nagyobb, mint a vad típusú kontrolloké. (Ezeket az *előkísérleti eredményeket* jelenleg ismételjük, ill. pontosabb elemzésekkel igazoljuk.)
6. Munkacsoportomban az FcRn Tg állatok általános immunológiai karakterizálásán túl, olyan kutatásokat végzünk, amelyek értékes diagnosztikai, sőt akár terápiás ellenanyagok kifejlesztéséhez vezethetnek. A dolgozatomban hivatkozott két példával azt mutattuk ki, hogy gyengén immunogén oligopeptidre (hemagglutinin konzervált, nem-immundomináns epitópja), valamint a sejtmembránban kifejeződő GPCR (G-protein coupled receptor; CXCR4) molekulákra hatékony immunválaszt tudunk Tg állatainkban kiváltani. Az utóbbi időben az FcRn Tg technológia előnyeire támaszkodva olyan együttműködéseket keresünk, amelyek kapcsán egy-egy adott terápiás célpont szakértőjével közösen terápiás monoklonális ellenanyagokat fejlesztünk. Így többek között Stefan Feske professzorral (New York University) olyan monoklonális ellenanyagok előállításán dolgozunk, amelyek a T-sejtek membránjában lévő Ca-csatornát (ORAI1) blokkolják, és így a T-limfociták gátlását okozhatják. Ez pl. autoimmun betegekben lehet értékes terápiás eszköz, természetesen az. ún. humanizálást követően.
7. Az FcRn Tg nyulakban két értékes ellenanyagfejlesztésről számolhatok be. Egyfelől, Dr. Katona Istvánnal (munkacsoport vezető, KOKI, Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport) kollaborálva sikerült igen jó minőségű, cannabinoid 1. típusú receptor specifikus ellenanyagot előállítani, amelyekkel új, értékes megfigyeléseket végezhetek, és amelyekről a közeljövőben tervezünk beszámolni. Egy másik vizsgálatunk kapcsán kimutattuk, hogy FcRn Tg nyulaink mintegy háromszor hatékonyabb humán T-sejt specikus poliklonális ellenanyagot (ATG) termelnek, mint a kontroll állatok [20]. Az ATG által kiváltott immunszuppresszió értékes terápiás eszköz pl. a vese-transzplantáció esetén és évente több százezer nyulat használnak fel e termék előállítására. Bízunk benne, hogy ennek a terméknek a forgalmazói értékes új eszközt látnak eljárásunkban. (Az FcRn Tg

állatok fokozott immunválaszát, mint új technológiai eljárást szabadalomként bejegyezték az Európai Unióban, Ausztáliában és Hong Kongban, illetve jelenleg is folynak a szabadalmi eljárások az USA-ban, Kanadában, Kínában és Japánban. A találmány az ELTE és a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont tulajdona, amelyet az ImmunoGenes Kft kizárólagosan, kereskedelmi célra hasznosít. Az üzleti fejleményekkel kapcsolatban a cég honlapjára hivatkozom: [www.immunogenes.com](http://www.immunogenes.com) .)

8. (ld 5. pont is) A dolgozat benyújtása óta végzett elemzéseink kimutatták, hogy az FcRn Tg egerekben az immunizálás hatására nagyobb számú antigén-specifikus Thelper sejt képződik (amit az antigénnel *ex vivo* re-aktivált állapotban a T-sejtek IL-2 ELISPOT elemzésével mértünk, valamint ezeknek az állatoknak a csíráközpontja átlagosan kétszer nagyobb, mint a vad típusú kontrolloké. (Ezeket az *előkísérleti eredményeket* jelenleg ismételjük, ill. pontosabb elemzésekkel igazoljuk.)

Végül még egyszer szeretném megköszönni a Professzor Asszonynak, hogy elbírálta az értekezésemet és kérem fogadja el a kérdéseire adott válaszaimat.

Budapest, 2013. május 20.



Dr. Kacskovics Imre

## Hivatkozások:

1. Van de Perre P (2003) Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* 21: 3374-3376.
2. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M (2012) IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol* 2012: 985646.
3. Butler JE (1999) Immunoglobulins and immunocytes in animal milks. In: Ogra PL, editor. *Mucosal Immunology*. Second ed. New York: Academic Press. pp. 1531-1554.
4. Brandtzaeg P (2010) The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr* 156: S8-15.
5. Lindsey B, Kampmann B, Jones C (2013) Maternal immunization as a strategy to decrease susceptibility to infection in newborn infants. *Current opinion in infectious diseases* 26: 248-253.
6. Barrow P (2012) Developmental and reproductive toxicity testing of vaccines. *J Pharmacol Toxicol Methods* 65: 58-63.
7. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, et al. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448.
8. Tressler RL, Roth TF (1987) IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *J Biol Chem* 262: 15406-15412.
9. West AP, Jr., Herr AB, Bjorkman PJ (2004) The Chicken Yolk Sac IgY Receptor, a Functional Equivalent of the Mammalian MHC-Related Fc Receptor, Is a Phospholipase A(2) Receptor Homolog. *Immunity* 20: 601-610.
10. Flajnik MF (2002) Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat Rev Immunol* 2: 688-698.
11. Hsu E, Pulham N, Rumpf LL, Flajnik MF (2006) The plasticity of immunoglobulin gene systems in evolution. *Immunol Rev* 210: 8-26.
12. Zhao Y, Cui H, Whittington CM, Wei Z, Zhang X, et al. (2009) *Ornithorhynchus anatinus* (platypus) links the evolution of immunoglobulin genes in eutherian mammals and nonmammalian tetrapods. *J Immunol* 183: 3285-3293.
13. Radaev S, Sun P (2002) Recognition of immunoglobulins by Fcγ receptors. *Mol Immunol* 38: 1073-1083.
14. Jefferis R, Lund J (2002) Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. *Immunol Lett* 82: 57-65.
15. West AP, Jr., Bjorkman PJ (2000) Crystal Structure and Immunoglobulin G Binding Properties of the Human Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor. *Biochemistry* 39: 9698-9708.
16. Catunda Lemos AP, Cervenak J, Bender B, Hoffmann OI, Baranyi M, et al. (2012) Characterization of the Rabbit Neonatal Fc Receptor (FcRn) and Analyzing the Immunophenotype of the Transgenic Rabbits That Overexpresses FcRn. *PLoS One* 7: e28869.
17. Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES (2001) Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol* 13: 1551-1559.
18. Brambell FWR (1970) *The Transmission of Passive Immunity from Mother to Young*; Neuberger A, Tatum EL, editors. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
19. Spiegelberg HL, Weigle WO (1965) The Catabolism of Homologous and Heterologous 7s Gamma Globulin Fragments. *J Exp Med* 121: 323-338.
20. Baranyi M, Cervenak J, Bender B, Kacs Kovics I (2013) Transgenic rabbits that overexpress the neonatal Fc receptor (FcRn) generate higher quantities and improved qualities of anti-thymocyte globulin (ATG). *PLoS One* submitted.