

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simona SALMIČ

PRIPRAVA KOKOŠJIH MONOKLONSKIH PROTITELES

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni študij

PRODUCTION OF CHICKEN MONOCLONAL ANTIBODIES

GRADUATION THESIS
university studies

Ljubljana, 2006

Z diplomskim delom zaključujem univerzitetni dodiplomski študij mikrobiologije. Diplomsko naloga je bila opravljena v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete na Rodici pri Domžalah.

Podpisana Salmič Simona se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je odobrila prijavljeno diplomsko delo in za mentorico imenovala prof. dr. Mojco Narat in za recenzentko prof. dr. Vladko Čurin-Šerbec.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Recenzentka: prof. dr. Vladka Čurin-Šerbec

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor NEKREP
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Člani: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

prof. dr. Vladka ČURIN-ŠERBEC
Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Datum zagovora: 18.12.2006

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simona SALMIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 616-097:636.5:577.15.083(043)=863
- KG imunoglobulini/kokošji imunoglobulini razreda Y/receptor FcRn/kokošja monoklonska protitelesa
- AV SALMIČ, Simona
- SA NARAT, Mojca (mentorica) / ČURIN (ŠERBEC), Vladka (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2006
- IN PRIPRAVA KOKOŠJIH MONOKLONSKIH PROTITELES
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP viii, 57 str., 6 pregl., 9 sl., 53 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V diagnostičnih testih in raziskovanju se poleg različnih sesalskih poliklonskih protiteles večinoma uporabljajo mišja monoklonska protitelesa. V nekaterih primerih pa bodisi ni mogoče proizvesti mišjih mAb ali pa le ta niso najbolj primerna. V takih primerih lahko kokošja protitelesa predstavljajo primerno rešitev. Kokošji IgY so strukturno in funkcijsko podobni sesalskim IgG, a imajo zaradi majhnih strukturnih razlik določene prednosti. V okviru diplomske naloge smo pripravili kokošja monoklonska protitelesa proti molekuli FcRn. Receptor za Fc del imunoglobulinov je membransko izražen na epitelnih celicah in sodeluje pri prenosu Ig. Molekula je pri sesalcih evlucijsko zelo ohranjena in pri miškah ne bi vzbudila želenega imunskega odziva, zato smo z rekombinantnim proteinom FcRn imunizirali kokoš in vzbudili dober imunski odziv. Uspešno smo izvedli fuzijo med kokošnjimi vraničnimi celicami in ustrezno kokošjo mielomsko celično linijo. Rast hibridomov smo preverjali v različnih gojitvenih medijih in uporabili različna razmerja celic pri fuziji. Rast hibridomov je bila najboljša v osnovnem mediju. Dodatek kokošnjega seruma in IL-6 nista imela vpliva na rast. Optimalno razmerje med vraničnimi in mielomskimi celicami pa je bilo 3:1. Po celični fuziji smo opredelili štiri stabilne kokošje hibridome, ki smo jih poimenovali 1A11, 1B6, 1C6 in 2H2. Z imunskoencimskim testom smo preverili prisotnost protiteles v supernatantih hibridomov in dobili nekaj pozitivnih reakcij. Pri poskusu smo pridobili štiri hibridome, vendar ti tekom kultivacije niso ohranili svoje aktivnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 616-097:636.5:577.15.083(043)=863
- CX immunoglobulins/chicken immunoglobulins of Y class/receptor FcRn/chicken monoclonal antibodies
- AU SALMIČ, Simona
- AA NARAT, Mojca (supervisor) / ČURIN (ŠERBEC), Vladka (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2006
- TI PRODUCTION OF CHICKEN MONOCLONAL ANTIBODIES
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO viii, 57 p., 6 tab., 9 fig., 53 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Alongside the various mammal polyclonal antibodies in diagnostic tests and research mostly mouse monoclonal antibodies are used. However, in some cases it is impossible to create mouse mAb or they are not the most appropriate. In such cases chicken antibodies can be a suitable alternative. Chicken IgY are structurally and functionally similar to mammalian IgG, however, due to some small structural differences, they have certain advantages. We prepared chicken monoclonal antibodies against the molecule FcRn. The receptor for the Fc part of the immunoglobulin cooperates in transferring Ig. FcRn is highly conservative molecule in mammals, and does not always trigger the immune response in mice. We immunized chickens with recombinant protein FcRn and triggered a good immune response. We successfully performed the fusion between the chicken spleen cells and the suitable chicken myeloma cell line. We tested the growth of hybridoma in various growth media and using various cell ratios in the fusion. Growth of hybridoma was best in the basic growth medium. Adding the chicken serum and IL-6 did not influence the growth. The optimal ratio between the spleen and myeloma cells was 3:1. After cell fusion we selected four stable chicken hybridoma, named 1A11, 1B6, 1C6 and 2H2. With the immunoenzyme tests we tested for the presence of antibodies in the supernatants of hybridoma and there were some positive reactions. In the experiment we attained four hybridoma; however, during the cultivation they did not retain their activity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	iii
KEY WORDS DOCUMENTATION	iv
KAZALO VSEBINE	v
KAZALO SLIK	vii
KAZALO PREGLEDNIC	viii
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	ix
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 IMUNOST IN PROTITELESA	3
2.1.1 Protitelesa razreda G (IgG)	5
2.2 MONOKLONSKA PROTITELESA	7
2.2.1 Kokošja monoklonska protitelesa	8
2.2.1.1 Uporaba kokošnjih monoklonskih protiteles	11
2.3 ANTIGEN	12
2.3.1 Receptorji za Fc	12
2.3.2 Neonatalni Fc receptor (FcRn)	13
2.3.2.1 Zgradba FcRn	13
2.3.2.2 Vloga FcRn pri prenosu in homeostazi IgG	14
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 CELIČNE LINIJE	18
3.1.1 Trajne celične linije	18
3.1.1.1 Odtajevanje celic	18
3.1.2 Primarna celična linija	19
3.2 PRIPRAVA ANTIGENA	19
3.3 IMUNIZACIJA	20
3.4 CELIČNA FUZIJA	21
3.4.1 Kloniranje hibridomov	24
3.4.1.1 Zamrzovanje hibridomov	24

3.5 DETEKCIJA PROTITELES	25
3.5.1 Neposredni imunski test	25
3.5.2 Posredni imunski test	25
3.5.3 Western blot analiza	26
3.5.3.1 Elektroforeza	26
3.5.3.2 Prenos proteinov iz gela na membrano	28
4 REZULTATI	30
4.1 USPEŠNOST IMUNIZACIJE	30
4.2 USPEŠNOST CELIČNE FUZIJE	31
4.2.1 Vpliv gojitvenega medija	31
4.2.2 Vpliv razmerja med vraničnimi in mielomskimi celicami	32
4.3 TESTIRANJE HIBRIDOMOV	32
4.3.1 Testiranje na prisotnost IgY	33
4.3.2 Specifičnost protiteles	34
4.4 USPEŠNOST KLONIRANJA IN TESTIRANJE KLONOV	35
4.4.1 Testiranje klonov	36
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	37
5.1 RAZPRAVA	37
5.2 SKLEPI	41
6 POVZETEK	43
7 VIRI	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura sesalskega IgG, kokošnjega IgY in IgY(Δ Fc) (Chiou, 2002)	6
Slika 2 (levo): Struktura FcRn molekule (Raghavan in sod., 1995).....	14
Slika 3 (desno): Struktura molekule PHK razreda 1 (Robertus, 2002).....	14
Slika 4: Prenos IgG skozi posteljico in črevesne celice s pomočjo receptorja FcRn (Leese, 2003).....	15
Slika 5: Mehanizem prenosa in homeostaze IgG v serumu (Leese, 2003).....	16
Slika 6: Postopek priprave kokošnjih monoklonskih protiteles	21
Slika 7: Določanje reakcije med antigenom in protitelesi v kokošnjem imunskem serumu. Puščice označujejo reakcijo na mestu, kjer je rekombinantni protein FcRn.	30
Slika 8: Preverjanje prisotnosti protiteles v supernatantih hibridomov.....	33
Slika 9 (levo): Preverjanje aktivnosti in specifičnosti protiteles v supernatantih hibridomov proti antigenu FcRn	34

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Biološke lastnosti kokošnjih mielomskih celičnih linij (Nishinaka in sod., 1996).....	9
Preglednica 2: Kokošja monoklonska protitelesa in njihova uporaba (Narat, 2003)	11
Preglednica 3: Sestava različnih gojitvenih medijev za gojenje fuzijskih celic	23
Preglednica 4: Število zraslih hibridomov 6 in 12 dni po celični fuziji v različnih gojitvenih medijih	31
Preglednica 5: Število zraslih hibridomov v vseh šestih različicah gojitvenih medijev glede na različna razmerja med kokošnjimi vraničnimi celicami in mielomskimi celicami MuH1	32
Preglednica 6: Število zraslih klonov po kloniranju.....	35

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

chmAb	kokošja monoklonska protitelesa
C _L	konstantna regija na lahki verigi IgG (ali IgY)
C _V	konstantna regija na težki verigi IgY
C _γ	konstantna regija na težki verigi IgG
Fab	podenota IgG (ali IgY) sestavljena iz dela težke in celotne lahke verige
Fc	podenota IgG (ali IgY) sestavljena iz konstantnih delov obeh težkih verig
FcR	receptor za Fc del IgG (ali IgY)
FcRn	neonatalni prenašalec za IgG (ali IgY)
Fv	variabilni del IgG (ali IgY)
Ig	imunoglobulini
IgG	imunoglobulini razreda G
IgM	imunoglobulini razreda M
IgY	imunoglobulini razreda Y
IgY(ΔFc)	oblika imunoglobulina razreda Y, ki nima cele Fc regije
IL-6	interlevkin 6
kDa	merska enota kilodalton
Lv	lahka veriga imunoglobulinov
mAb	monoklonska protitelesa
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
PrP	prionski protein
rec IL-6	rekombinantni interlevkin 6
scFv	enoverižni variabilni del IgG (ali IgY)
SDS-PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom
Tv	težka veriga imunoglobulinov
V _H	variabilna regija na težki verigi IgG (ali IgY)
V _L	variabilna regija na lahki verigi IgG (ali IgY)

1 UVOD

Monoklonska protitelesa so izredno koristna kot diagnostični reagenti in terapevtska sredstva. Njihova uporaba zajemna analitično, biokemijsko in medicinsko področje.

Zelo veliko antigenov za imunizacijo predstavljajo konzervativne in ohranjene sesalske molekule, ki pri človeku in drugih sesalcih zaradi evolucijske oddaljenosti ne izzovejo ustreznega imunskega odziva. Kokoši zaradi evolucijske oddaljenosti predstavljajo ustrezen model za pridobivanje specifičnih protiteles proti takim molekulam (Nakamura in sod., 2003; Greunke in sod., 2005).

Nizkomolekularni imunoglobulini v kokošjem serumu so imunoglobulini Y (IgY). Molekule so homologe Ig razreda G pri sesalcih in imajo nekaj drugačnih lastnosti. IgY imajo nekoliko večjo molekulsko maso in omejeno upogljivost v predelu težkih verig. Bistvena prednost uporabe IgY je v tem, da ne aktivirajo komplementa, ne reagirajo z revmatoidnim faktorjem v sesalskem serumu, ne vežejo se na protein A in protein G in ne kažejo navzkrižne reaktivnosti s sesalskimi protitelesi (Nishinaka in sod., 1989).

Prav zaradi teh lastnosti so IgY zelo uporabni pri zaščitni imunizaciji v boju z gastrointestinalnimi patogeni pri ljudeh in živalih. Uporabljajo se tudi kot imunoterapevtiki proti patogenom, ki jih z antibiotiki ne odpravimo in predvsem pri diagnostiki in terapiji rakavih obolenj (Narat, 2003).

Eno bistvenih omejitev pri uporabi IgY predstavlja pridobivanje monoklonskih protiteles (mAb) IgY. Osnova pridobivanja mAb je zlitje mielomske celice in B celice. Ta tehnika je bila najprej razvita za pridobivanje mišjih mAbs, kasneje pa so jo priredili še za kokošje sisteme. Pri kokošji tehnologiji hibridomov je odstotek nastalih celic, ki izločajo ustrezna protitelesa zelo nizek, če ga primerjamo s pridobivanjem mišjih protiteles (Nishinaka in sod., 1989; Nishinaka in sod., 1991).

Pri sesalcih je za učinkovito zaščito potreben prenos imunoglobulinov z matere na otroka. Pri tem je bistven neonatalni receptor za Fc del molekule IgG, FcRn. Protitelesa se vežejo na receptor, nastane kompleks FcRn-IgG, ta pa se potem s transcitozo prenese na drugo

stran celic. Receptorji so odgovorni tudi za uravnavanje količine serumskega IgG (Dickinson in sod., 1999; Kacs Kovics, 2004; Ober in sod., 2001; Raghavan in sod., 1995).

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil pridobiti kokošja monoklonska protitelesa proti proteinu, ki je med sesalci evolucijsko ohranjen in sicer proti govejemu receptorju za Fc del molekule IgG, imenovanem tudi FcRn. Domnevali smo, da je ta molekula evolucijsko dovolj oddaljena, da bi jo lahko uporabili kot antigen za imunizacijo in hkrati predvidevali, da bo sprožila ustrezen imunski odziv. Glede na predhodne izkušnje Laboratorija za imunologijo in celične kulture smo predvidevali, da bomo z vraničnimi celicami imunizirane kokoši in ustrezno kokošjo mielomsko linijo uspešno izvedli celično fuzijo in pridobili kokošja monoklonska protitelesa proti izbranemu antigenu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMUNOST IN PROTITELESA

Živa bitja so nenehno izpostavljena snovem, ki so potencialno nevarne za zdravje. V namen obrambe pred takimi snovmi so razvile obrambni oziroma imunski sistem. Gre za mehanizme, ki telo zavarujejo pred tujimi organizmi ali snovmi. Imunski sistem zajema dve skupini obrambnih mehanizmov. Prva je prirojena oziroma naravna imunost in je posledica že dolgotrajne koeksistence organizma in mikrobov. Vključuje genetične, anatomske, kemične, fiziološke pregrade ter endocitne in fagocitne procese, ki preprečujejo tujim agensom, da bi vdrlili v telo in se tam ustalili. Prisotnost patogenov pa lahko sproži tudi aktivacijo komplementnega sistema, katerega rezultat je liza različnih patogenih celic in nastanek vnetja (Carlander, 2002; Vozelj, 2000).

Ker mehanizmi naravne odpornosti niso vedno dovolj učinkoviti, so vretenčarji razvili še drugo skupino obrambnih mehanizmov. Pridobljena ali specifična imunost je odgovor na vdor tuje snovi (antigena, Ag) v organizem. Gre za zapleten sistem, kjer v gostitelju vzajemno delujejo številne celice in molekule. Na podlagi komponent imunskega sistema, ki posredujejo odziv, razdelimo specifični imunski odziv v dve obliki: humoralno in celično posredovano.

Celično imunost posredujejo celice, imenovane limfociti T, humoralno imunost pa posredujejo molekule v krvi, ki jih imenujemo protitelesa (Ab) ali imunoglobulini (Ig) in jih izdelujejo limfociti B (Vozelj, 2000).

Protitelesa so glikoproteinske molekule, ki z antigeni selektivno in specifično reagirajo. Specifičnost za antigen je za vsako celico B določena z membransko vezanim receptorjem za antigen. Ko celice B zorijo v kostnem mozgu, nastaja njihova specifičnost z naključnim preurejevanjem vrste genskih segmentov, ki kodirajo molekulo protitelesa. Ob koncu procesa ima vsaka zrela celica B en funkcijski gen, ki kodira protitelesno težko verigo in en funkcijski gen, ki kodira lahko verigo. Tako ena celica B sintetizira in izrazi na svoji membrani protitelo z eno samo specifičnostjo.

Med embrionalnim razvojem nastaja populacija B celic, kjer ima vsaka celica drugačno specifičnost in zato naj bi bilo kar 10^8 antigenskih specifičnosti. Ta različnost se kasneje v kostnem mozgu zmanjša s selekcijo, ki odstrani vse celice, katere membransko protitelo prepoznava sestavine lastnega telesa.

Hipoteza selekcije klonov razlaga, kako nastane in se vzdržuje tako obsežen repertoar različnosti. Bistvo te hipoteze je, da se lahko posamezni imunsko zmožni limfocit veže samo z eno antigensko determinanto (epitopom). Pri zorenju limfocitov B nastajajo imunsko zmožni limfociti, ki lahko spoznajo antigen in izražajo membransko protitelo z eno specifičnostjo. Ti limfociti so nastali iz ene izhodiščne matične celice z mitotskim razmnoževanjem. Celice klona so torej enake in imajo istovetne specifične receptorje za določen epitop. Ko antigen vdre v telo in se veže na celico B, katere membransko protitelo je specifično za epitop na tem antigenu, se začne selekcija klona. Telo izbere celico, ki ima najustreznejši receptor za epitop, se z njim veže kar spodbudi k razmnoževanju celic in dalje pripelje do nastanka klona diferenciranih celic. Nekatere celice postanejo efektorske in sintetizirajo protitelesa, druge pa spominske. Slednje krožijo po krvnem in limfnem obtoku ter služijo kot rezervoar celic proti istemu antigenu. Prav zato je sekundarni imunski odziv proti istemu antigenu hitrejši in obsežnejši kot primarni (Vozelj, 2000).

Pri pticah je rast in diferenciacija celic B nekoliko drugačna kakor pri sesalcih. Limfociti B pri pticah nastajajo v limfatičnem organu, imenovanem Fabricijeva bursa, ki se nahaja ob kloaki. Fabricijeva bursa je sestavljena iz približno 10^4 limfoidnih mešičkov, ki jih lahko izoliramo in v njih določimo različne stadije razvoja ločenih populacij celic B (Weill in sod., 1985). Številne študije so pokazale, da pri pticah obstajajo različne populacije matičnih celic, iz katerih potem nastanejo limfociti B (Dourain in sod., 1975).

Za nastanek burse pri pticah je odgovorna populacija prebursalnih matičnih celic. Te izhajajo iz krvne linije matičnih celic in z migracijo dosežejo predel, kjer bo nastala Fabricijeva bursa. To se dogaja med devetim in trinajstim dnevom embriogeneze. Bursalne matične celice se delijo, formirajo se mešički, v katerih nastajajo limfociti B, ki na površini izražajo imunoglobuline razreda M (IgM). To se dogaja med razvojem zarodka.

Po izvalitvi živali se celice B premaknejo na periferni del burse. Bursalna matična linija celic, ki je odgovorna za proizvodnjo limfocitov B, migrira iz burse in jo imenujemo postbursalna populacija celic. Ta je odgovorna za nastajanje funkcionalnih celic B že

odraslih ptic tekom njihovega življenja (Barth in Humphries, 1988; Dourain in sod., 1975; Weill in sod., 1985).

2.1.1 Protitelesa razreda G (IgG)

IgG so monomerne molekule, sestavljene iz dveh težkih verig (Tv) in dveh lahkih verig (Lv). Molekula ima dve vezišči za antigen (Fab del), ki sta kovalentno vezani na konstantni del molekule (Fc del). Mesto, kjer se Fab del stika z Fc delom je gibljivo in omogoča, da se kot med Fab deloma spreminja do 180° (Vozelj, 2000).

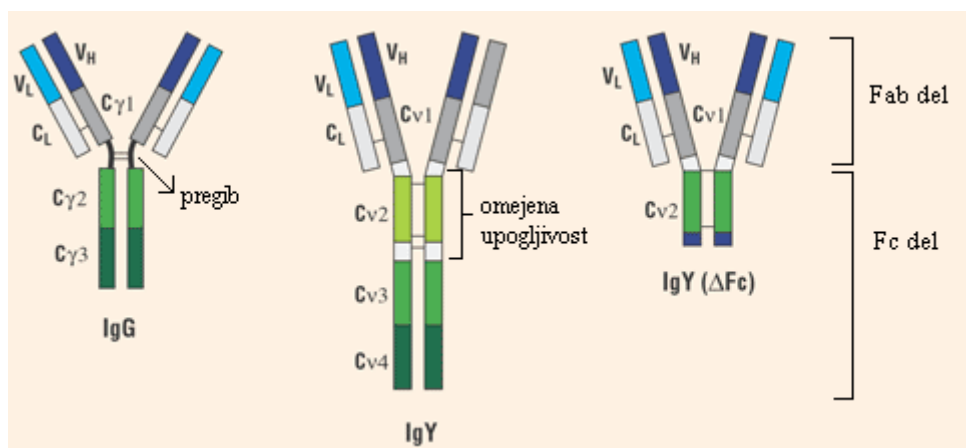
Tako kot sesalci so tudi ptice razvile možnost proizvodnje učinkovitih protiteles proti različnim okužbam. Pri pticah se imunoglobulini prenesejo iz krvi v jajčni rumenjaki, kar pri raziskovalnem delu predstavlja veliko prednost, saj lahko protitelesa tako pridobimo na neinvaziven način. Protitelesa iz jajčnega rumenjaka označujemo z IgY (Y iz ang. besede »yolk«) in so homologni Ig razreda G pri sesalcih (slika 1). Po zgradbi so IgY podobni IgG, strukturne razlike pa narekujejo nekatere drugačne lastnosti IgY (Narat, 2003).

Osnovna struktura molekule IgY je enaka kakor pri IgG. Sestavljata jo dve težki (Tv) verigi z molekulsko maso 65–70 kDa in dve lahki verigi (Lv) verigi z molekulsko maso 22–30 kDa (slika 1). Molekulska masa IgY je približno 180 kDa. Težke verige molekule IgY imajo 4 konstantne regije (Fc) in eno variabilno (Fv), IgG molekula pa ima le 3 konstantne regije in zato posledično nižjo molekulsko maso (Carlander, 2002; Chiou, 2002; Narat, 2003).

Molekule IgY imajo tudi drugačno izoelektrično točko in so bolj hidrofobne. Zaradi višje telesne temperature kokoši je razpolovni čas IgY merjen v mesecih, njihova aktivnost pa ohranjena do 6 mesecev pri sobni temperaturi in en mesec pri 37°C (Narat, 2003).

Odkrili so tudi posebno različico molekule IgY, ki nima celotne konstantne (Fc) regije in jo označimo z IgY(Δ Fc). Ta skrajšana oblika se pojavlja pri nekaterih pticah (racah, goskah) ter dvoživkah in ribah pljučaricah. Do nastanka te oblike naj bi prišlo zaradi alternativnega rezanja mRNA. Molekulska masa take molekule je le okoli 120 kDa. Prav

zaradi svoje strukture je ta oblika potencialno dober produkt za različne imunološke teste (Chiou, 2002; Narat, 2003).



Slika 1: Struktura sesalskega IgG, kokošjega IgY in IgY(Δ Fc) (Chiou, 2002).

Težke verige IgG so označene z zeleno barvo in lahke verige imunoglobulinov z modro barvo. Na lahkih verigah so vezišča za antigen označena z V_L in na težkih verigah z V_H . Vsaka monomerna molekula ima dve vezišči za antigen. Ostali segmenti so enaki pri vseh imunoglobulinih istega tipa in so označeni s C_γ pri IgG in s C_V pri IgY. To so konstantne regije na težki verigi Ig. C_L je konstantna regija na lahki verigi Ig. IgY je manj fleksibilna molekula od IgG, saj ima omejeno gibljivost med $C_{\gamma 1}$ in $C_{\gamma 2}$, ki je posebnost sesalskih Ig (Narat, 2003; Vozelj, 2000).

Kokošji IgY ne kažejo navzkrižne reaktivnosti s sesalskimi protitelesi, ne reagirajo z revmatoidnim faktorjem v sesalskem serumu, ne aktivirajo sistema komplemента in se ne vežejo na protein A in protein G. Zaradi teh lastnosti so zelo uporabni v imunoloških (Nishinaka in sod., 1989; Nihinaka in sod., 1991) in kliničnih testih (Carlander, 2002).

Kokoši so evlucijsko precej oddaljene od sesalcev, zato so primerni organizmi za imunizacijo, kadar imamo antigen sesalskega izvora. Evlucijsko ohranjeni antigeni pri sesalcih namreč pogosto ne izzovejo imunskega odziva ali pa je ta zelo šibek. V teh primerih so kokoši izjemno primerne živali za imunizacijo (Nishinaka in sod., 1989; Nihinaka in sod., 1991).

2.2 MONOKLONSKA PROTITELESA

V organizmu je raznolikost protiteles zelo velika. Kljub temu pa so poskusi pokazali, da posamezna celica B izdeluje le eno vrsto protiteles. Takim protitelesom rečemo monoklonska (mAb), saj jih izdelujejo celice enega klona (Vozelj, 2000).

Leta 1975 sta Köhler in Milstein v reviji Nature opisala metodo za pridobivanje specifičnih monoklonskih protiteles, za kar sta leta 1984 dobila tudi Nobelovo nagrado za medicino. Njuna metoda temelji na zlitju (fuziji) med celico B, ki izdeluje protitelesa in mielomsko celico ter selekciji zlitih celic, ki izločajo protitelesa želene specifičnosti. Take zlite celice imenujemo hibridomi, protitelesa, ki jih izdelujejo pa monoklonska protitelesa (Vozelj, 2000).

Prvi korak za izvedbo celične fuzije je priprava ustrezne mielomske linije, ki se razmnožuje v normalnem mediju, ne razmnožuje pa se v selekcijskem mediju. Mielomske celične linije so potencialno nesmrtno in se lahko neomejeno razmnožujejo. Pri zlitju normalne celice B z mielomsko celico, nastane večjedrna celica, imenovana heterokariont. Po nekaj delitvah, se jedri združita in tako nastala celica ima kromosome obeh starševskih celic. Pri samem postopku fuzije se zlije le majhen odstotek celic in nekatere zlite celice so le homogene starševske celice. Tako moramo v drugem koraku zagotoviti ustrezno sestavo selekcijskega medija, saj je potrebno hibridne celice ločiti od homogenih zlitih ali nezlitih celic. Celice gojimo v selekcijskem mediju, v katerem preživijo le hibridne celice (hibridomi). Ti se lahko neomejeno razmnožujejo in nekateri od njih imajo hkrati sposobnost izdelovanja specifičnih protiteles (Goding, 1986; Vozelj, 2000).

Tekom let se je tehnologija za pridobivanje mAbs izboljševala, vendar še vedno lahko najdemo določene omejitve pri uporabi. Del teh omejitev zagotovo predstavlja dejstvo, da je večina mAbs, ki se danes uporabljajo, mišjega izvora, nekaj tudi podganjega, kunčjega in humanega. Sesalska mAb pa niso vedno primerna za diagnostiko, posebej če imamo prisotne komponente sesalskega seruma, saj lahko z njimi navzkrižno reagirajo.

Dodatna omejitev je tudi, da so antigeni, ki so med sesalci evolucijsko ohranjeni slabi imunogeni ali pa za sesalce sploh niso imunogeni (Narat, 2003).

2.2.1 Kokošja monoklonska protitelesa

Prva kokošja monoklonska protitelesa (chmAb) so opisali Nishinaka in sod. leta 1989. Kokošjo mielomsko linijo so pripravili tako, da so uporabili kokošje B limfoblastoidne celice, imenovane HU3, ki so bile iz neznanih razlogov odporne na selekcijski HAT (hipoksantin, aminopterin, timidin) medij. Iz celične linije HU3 so želeli pripraviti mutante, ki ne bi sintetizirale encima timidin kinaze, zato so celice obdelali s kemijskim mutagenom, etil metansulfonatom (EMS). Da bi pridobili take celice, so morali ločiti tiste HU3, ki so bile odporne za trifluorotimidin (TFT). Slednjega so uporabili kot selekcijski medij, da so pridobili ustrezno mielomsko celično linijo in jo poimenovali HU3R27.

Kokoši uporabljene v tem poskusu so bile imunizirane z inaktiviranim Newcastle disease virusom (NDV). Kokošje vranične celice so zmešali z mielomskimi celicami HU3R27 v razmerju 5:1 in izvedli fuzijo s polietilen glikolom (PEG). Detektirali so le en hibridom, ki je izločal protitelesa, specifična za NDV (Nishinaka in sod., 1989).

Hibridomi, ki so jih pridobili na ta način, so zelo hitro izgubili sposobnost izločanja protiteles v celični kulturi. V nadaljevanju je bila zato potrebna izboljšava mielomske celične linije. Najprej so izvedli fuzijo s celično linijo HU3R27 in vraničnimi celicami kokoši, imunizirane z NDV. Nastalo linijo so poimenovali HU3R27N in so jo v nadaljevanju še nekajkrat klonirali. Tudi iz te celične linije je bilo potrebno izolirati tiste klone, ki nimajo encima timidin kinaze. Po že opisanem postopku (Nishinaka in sod., 1989) so pridobili 4 ustrezne klone in jih poimenovali R27H1, R27H2, R27H3 in R27H4. Pri naslednji fuziji so tako uporabili mielomsko linijo R27H4 ali HU3R27 in vranične celice kokoši, imunizirane s hemocianinom iz školjke (keyhole limpet hemocyanin, KLH). Razmerje vraničnih in mielomskih celic je bilo 5:1, fuzijo pa so izvedli s PEG. Nastali hibridomi so izločali protitelesa, vendar so po 30. do 45. dneh izgubili sposobnost proizvodnje protiteles (Nishinaka in sod., 1991).

Celična linija R27H4 je bila občutljiva na HAT medij in celice so po 5. do 6. dneh propadle. Poleg tega pa nastali hibridomi niso izločali protiteles, ki bi bila specifična za KHL. V nadaljevanju so bile zopet potrebne izboljšave mielomske linije. Tokrat so uporabili celični liniji R27H1 in R27H4 in jih tretirali z EMS. Celice so najprej gojili v mediju RPMI 1640 s 5 % FBS, nato pa so medij zamenjali z IMDM z 10 % FBS in ouabainom koncentracije 5×10^{-5} M. Preživele klone so na koncu gojili v mediju, ki je

vseboval TFT in 1×10^{-4} M ouabain. Celični liniji, ki sta bili odporni za ouabain in nista sintetizirali timidin kinaze, so poimenovali MuH1 in MuH4. Biološke lastnosti celičnih linij so navedene v spodnji preglednici.

Preglednica 1: Biološke lastnosti kokošnjih mielomskih celičnih linij (Nishinaka in sod., 1996)

Celična linija	Izražanje Ig				Generacijski čas [h]
	Citoplazmatski Ig			izločanje	
	L veriga	μ veriga	γ veriga		
R27H1	-	+	-	μ veriga	17,29
R27H4	+	+	-	IgM	13,80
MuH1	-	+	-	-	20,89
MuH4	+	+	-	IgM	15,72

Celice MuH1 sintetizirajo, vendar ne izločajo, μ verige IgM. Celice MuH4 pa sintetizirajo μ in L verigo in izločajo IgM. Nobena od celičnih linij ne sintetizira γ verige.

Pri celični fuziji so uporabili vse štiri mielomske celične linije in vranične celice kokoši, imunizirane s humanim IgG. Volumsko razmerje vraničnih in mielomskih celic je bilo 5:1, za fuzijo pa so uporabili PEG. Učinkovitost fuzije je bila boljša pri liniji MuH1, kot pri MuH4. Pri dveh poskusih fuzije je zraslo 29 hibridomov, ki so izločali protitelesa, specifična za humani IgG. Od tega je bilo 18 hibridomov od MuH1, 9 hibridomov od MuH4 in 2 od R27H4. Specifična protitelesa, ki so jih izločali hibridomi, so bila iz razreda IgG (Nishinaka in sod., 1996).

Prve večje raziskave, kjer so se kokošja mAb izkazala kot zelo uporabna, so bile raziskave na področju prionskih proteinov (PrP). Izolirali so kokošja mAb proti sintetičnemu govejemu PrP B204. Po celični fuziji so detektirali 19 mAbs, ki so specifično reagirala z B204. Zaključili so, da so kokoši primerne živali za pripravo specifičnih protiteles proti sesalskim PrP ter, da so kokošja mAbs veliko bolj primerna za imunološke raziskave kot mišja mAb, kadar so preiskovani antigeni sesalskega izvora evolucijsko ohranjeni (Matshushita, 1998).

Kasneje so kokoši imunizirali s humanim prionskim proteinom H25 in ponovno prišli do podobnih zaključkov, kakor že pred tem (Matsuda in sod., 1999).

Leta 2004 je Nakamura s sodelavci opisal pripravo kokošnjih monoklonskih protiteles specifičnih za sesalske PrP. Pri tem so uporabili rekombinantne PrP, sintetične PrP in PrP, izolirane iz možganov. Kokoši so bile imunizirane z rekombinantnim mišjim PrP. Nastala kokošja mAbs so razdelili v tri večje skupine glede na sposobnost prepoznavanja PrP. Njihova dognanja so prinesla k napredku pri pripravi kokošnjih mAbs, hkrati pa k imunološkim raziskavam in diagnostiki prionskih bolezni (Nakamura in sod., 2004).

Uporaba kokošnjih mAb proti sesalskim antigenom se je izkazala za zelo učinkovito, tako v testiranjih, kot tudi v diagnostiki. Vendar pa kokošji hibridomi proizvajajo relativno majhne količine protiteles v primerjavi z mišjimi hibridomi. Da bi obšli ta problem so vpeljali dva ekspresijska vektorja za produkcijo funkcionalnih rekombinantnih kokošnjih monoklonskih protiteles. Vektorja sta bila izdelana tako, da sta vsebovala enoverižni fragment variabilne regije protitelesa (scFv). Nastala scFv mAb, ki so se izražala v teh vektorjih, so imela enake vezavne lastnosti kot protitelesa, nastala iz celične linije HUC2-13. Ti rezultati so pokazali, da je tak sistem lahko tudi alternativa pri pridobivanju kokošnjih monoklonskih protiteles, pri tem pa ni potrebno vzdrževati hibridomov v kulturi (Nakamura in sod., 2003).

2.2.1.1 Uporaba kokošnjih monoklonskih protiteles

V spodnji preglednici so našeta nekatera do sedaj uspešno pripravljena in izolirana kokošja monoklonska protitelesa in njihova uporaba.

Preglednica 2: Kokošja monoklonska protitelesa in njihova uporaba (Narat, 2003)

Antigen	Mielomska celična linija	Uporaba	Reference
Newcastle disease virus	HU3R27	Raziskovalno	Nishinaka in sod., 1989
Hemocianin iz školjke	R27H1 - 4	Raziskovalno	Nishinaka in sod., 1991
Hanganutziu-Deicher antigen	R27H4	Diagnostika	Asaoka in sod., 1991
<i>Eimeria acervulina</i>	R27H4	Raziskovalno, diagnostika	Matsuda in sod., 1999; Constantinoiu in sod., 2003
Humani IgG	MuH1, MuH4	Raziskovalno	Nishinaka in sod., 1996
Humani CFTR protein	R27H4	Raziskovalno, detekcija antigena	Michael in sod., 1998
Goveji PrP B204	MuH1	Raziskovalno, detekcija antigena, diagnostika	Matsushita in sod., 1998
Humani PrP H25	MuH1	Raziskovalno, detekcija antigena, diagnostika	Matsuda in sod., 1999
Različni sesalski PrP	MuH1	Detekcija antigena	Nakamura in sod., 2004

2.3 ANTIGEN

Protitelesa so sintetizirana proti tujkom v organizmu, vendar imajo tudi svojo vlogo v smislu zaščite zarodka in novorojenca. Pri sesalcih se Ig prenašajo preko posteljice v zarodek in kasneje preko celic mlečne žleze v mleko. Pri pticah se IgY prenaša preko membrane jajčnega rumenjaka najprej iz krvi v rumenjaka, kasneje pa iz rumenjaka v zarodek.

Imunoglobulini se preko membran prenašajo z vezavo Fc dela Ig na njihove receptorje, imenovane Fc receptor (FcR). V času neonatalnega razvoja ta receptor označimo z FcRn (Vozelj, 2000).

Pri poskusu smo kot antigen uporabili rekombinanten protein govejega FcRn (Kacskovics, 2005).

2.3.1 Receptorji za Fc

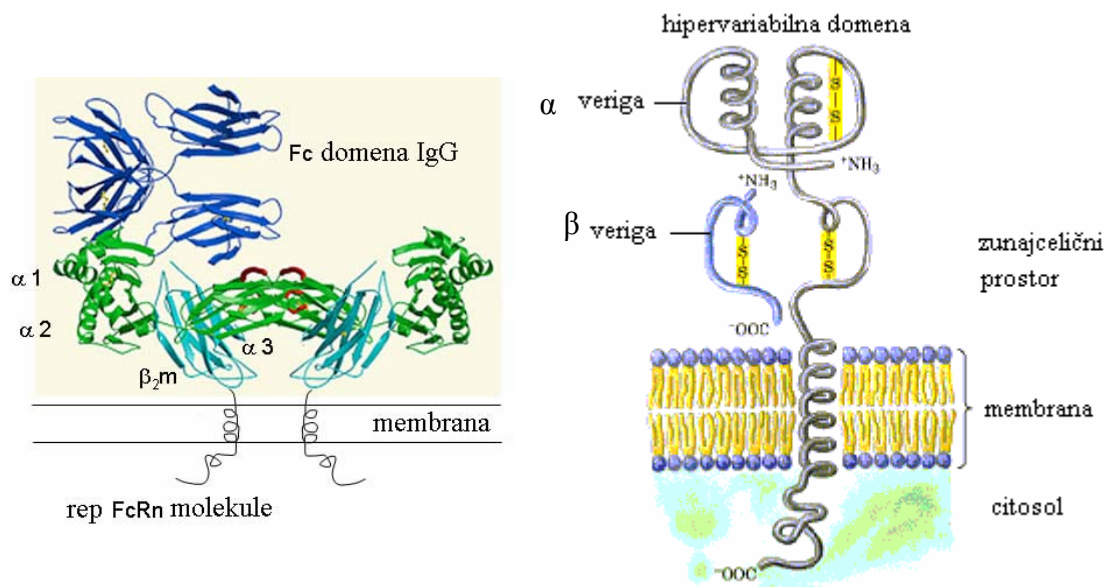
Konstantna regija (Fc) imunoglobulinov je del molekule, ki posreduje efektorske funkcije protiteles. Del Fc je tudi tisti del Ig molekule, ki sodeluje pri prenosu molekul skozi membrane, in sicer je to del, ki se veže na svoj receptor (Vozelj, 2000). Receptorji za Fc del (FcR) so površinske molekule na efektorskih celicah ali na celicah membran in epitopov preko katerih se Ig prenašajo. Receptorje razdelimo v več družin, vsak predstavnik iz posamezne družine pa prepozna Ig le enega izotipa. Glede na funkcijo razdelimo FcR v dve skupini; prvi razred receptorjev je prisoten na površini efektorskih celic in sproži različne odzive po vezavi z antigenom. V to skupino uvrščamo receptorje za IgG (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII in goveji Fc γ 2R), receptorja za IgE (Fc ϵ RI, Fc ϵ RII) in receptor za IgA (Fc α RI). V drugi razred pa spadajo receptorji, ki so odgovorni za transport imunoglobulinov skozi epitelne celice. V tem razredu sta receptor za IgA (pIgR) in neonatalni transporter za IgG (FcRn) (Kacskovics, 2004).

2.3.2 Neonatalni Fc receptor (FcRn)

Transport IgG molekul preko celic in različnih celičnih barier je ključnega pomena za učinkovit imunski odziv. Molekula FcRn sodeluje pri transportu IgG v času neonatalnega razvoja in po rojstvu, odgovorna pa je tudi za uravnavanje količine serumskega IgG v času celotnega življenja odrasle živali (Dickinson in sod., 1999; Ober in sod., 2004; Raghavan in sod., 1995; Shah in sod., 2003).

2.3.2.1 Zgradba FcRn

Molekula FcRn je heterodimer in je strukturno podobna molekulam poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK) razreda I (slika 2, 3). Sestavljena je iz membransko razpete glikozilirane težke verige s tremi ekstracelularnimi domenami ($\alpha 1$, $\alpha 2$ in $\alpha 3$), ki so nekovalentno vezane na lahko verigo β_2 -mioglobulina (Kacs Kovics in sod., 2000; Raghavan in sod., 1995). Težke verige glodalskih FcRn imajo molekularno maso 51 kDa, humanih FcRn 40–45 kDa, lahka veriga humanih FcRn pa ima molekularno maso 12 kDa (Zhu in sod., 2001). Vezava med IgG in FcRn zahteva kontakt med C_{V2} in C_{V3} domeno IgG (slika 1) ter $\alpha 1$ in $\alpha 2$ domeno receptorja (Dickinson in sod., 1999). Te vezavne domene na IgG molekulah so zelo ohranjene pri različnih organizmih (Ober in sod., 2002).



Slika 2 (levo): Struktura FcRn molekule (Raghavan in sod., 1995).

Z zeleno so označeni deli težke verige, $\alpha 1$, $\alpha 2$ in $\alpha 3$, s svetlo modro pa lahka veriga β_{2m} . S temno modro barvo je označeno vezavno mesto za IgG, z rumeno disulfidne vezi v molekuli, z rdečo pa cisteinski ostanki. Membrana leži vodoravno glede na lego FcRn.

Slika 3 (desno): Struktura molekule PHK razreda 1 (Robertus, 2002).

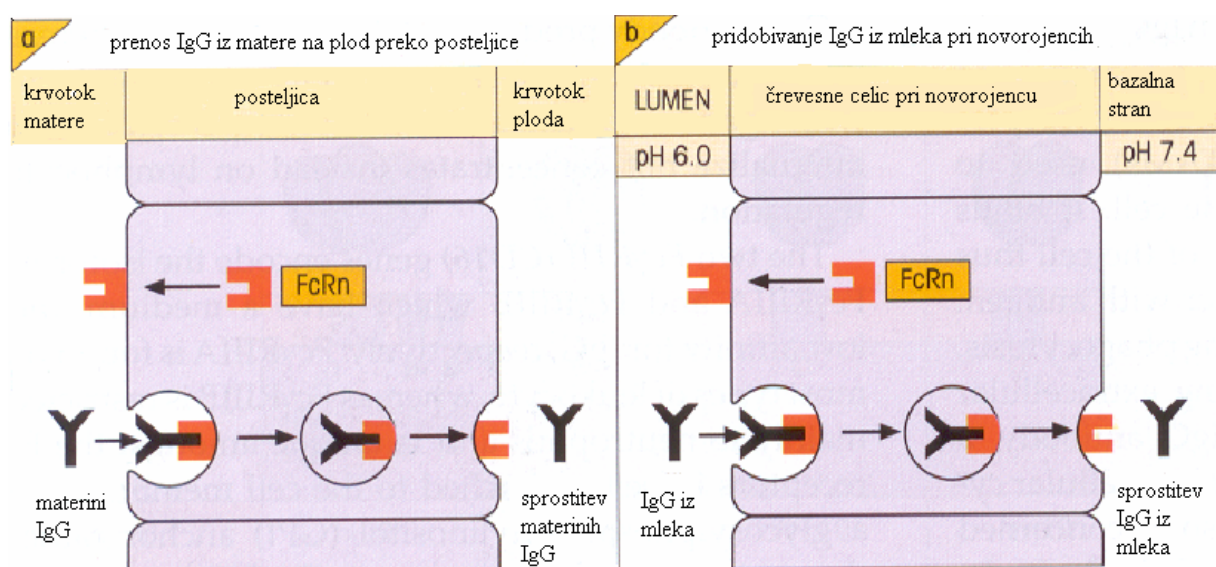
Na molekuli sta označeni α in β veriga (modra barva) ter hipervariabilna regija v zunajceličnem prostoru. Z rumeno so označene disulfidne vezi v molekuli. Membrana leži vodoravno glede na lego molekule PHK.

2.3.2.2 Vloga FcRn pri prenosu in homeostazi IgG

Prenos IgG poteka po dveh poteh in pri obeh sodeluje FcRn. Pri človeku je FcRn odgovoren za transport IgG preko posteljice na plod. Prenos materinih IgG poteka v 22. tednu nosečnosti. Pri samem prenosu mora IgG preiti dve celični barieri v posteljici: sincitiotrofoblast in kapilarni endotelij plodu. Sincitiotrofoblast je del posteljice, ki je v stiku z materinim krvotokom in ima na površini številne mikrovile. Optimalni pH za vezavo IgG na membrani posteljice je med 5,0 in 6,5. Ker je vrednost pH materine in plodove krvi okoli 7,0, se IgG ne more vezati z FcRn na površini sincitiotrofoblasta ali kapilarnega endotelija. FcRn se zato nahaja v specializiranih acidofilnih endocitotskih veziklih na apikalni strani membrane, kjer je vrednost pH manj kot 6,5 in pride do prevzema in prenosa IgG (Story in sod., 1994).

Drug način prenosa protiteles pri novorojenčkih pa je preko materinega mleka. Raziskave so pokazale, da v času materine laktacije (izločanja mleka) pride do izražanja FcRn na celicah mlečnih žlez nekaterih sesalcev. Receptor ima pomembno vlogo pri regulaciji prenosa IgG v materino mleko pred in po porodu. Receptor naj bi vezal IgG na bazalni strani žleznega epitelija in prenesel IgG na luminalno stran celic in posledično v mleko. Materino mleko, bogato z imunoglobulini, imenujemo kolostrum (Adamski in sod., 2000; Mayer in sod., 2002; Mayer in sod., 2005). Ko novorojenec pri materi sesa mleko, to potuje po prebavnem traktu do črevesnega epitelija. Na apikalni strani črevesnih celic je lokaliziran FcRn, ki se veže z Fc delom IgG molekule pri pH vrednosti 6,0–6,5. Kompleks se z endocitozo prenese na bazolateralno stran črevesnih celic in tako vstopi v krvotok. Zaradi rahlo bazične vrednosti pH vrednosti v krvi (pH = 7,5), se IgG odcepi od FcRn in tako sprostijo materine imunoglobuline v kri novorojenca (Dickinson in sod., 1999; Kacskovics, 2004; Mayer in sod., 2002; Ober in sod., 2001; Raghavan in sod., 1995).

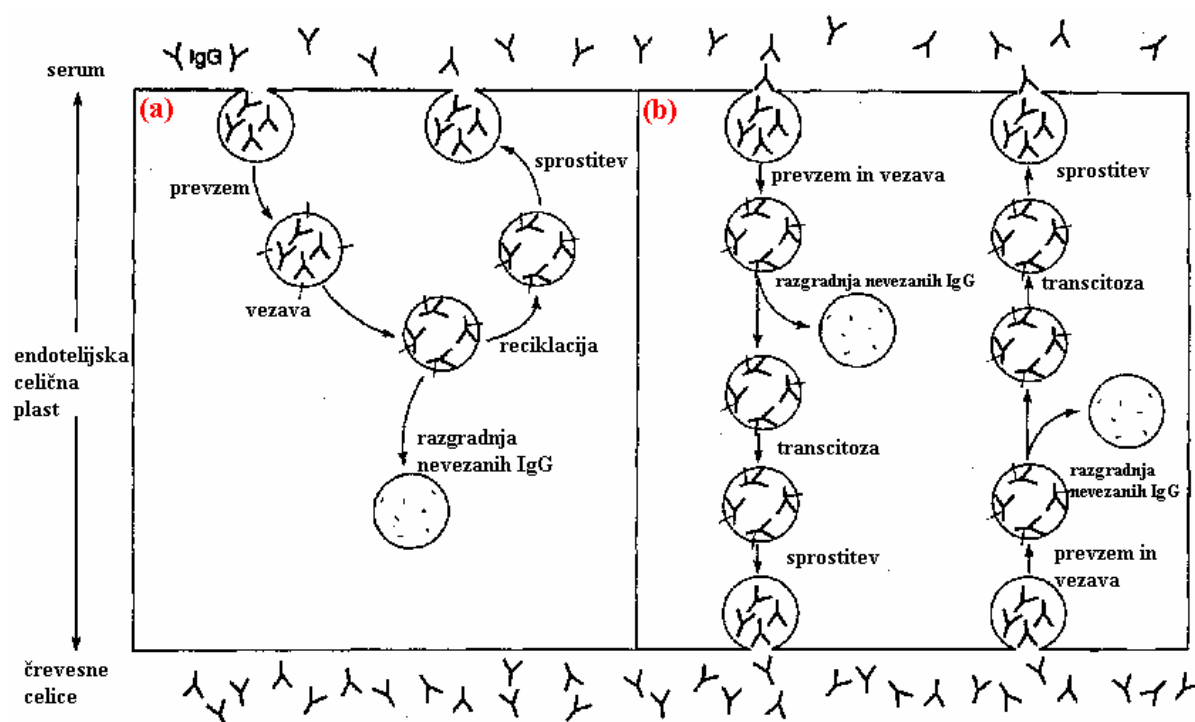
Slika 4 prikazuje oba načina prenosa molekul IgG.



Slika 4: Prenos IgG skozi posteljico in črevesne celice s pomočjo receptorja FcRn (Leese, 2003). (a) Prikaz prenosa materinih protiteles na plod preko posteljice. S črno so označeni IgG, z rdečo pa FcRn. (b) Prikaz prenosa IgG iz mleka v kri novorojenca. Sprostitev IgG molekul je odvisna od vrednosti pH.

FcRn pri sesalcih odraslih živali zaščiti IgG v serumu pred razgradnjo. V krvi se poleg ostalih proteinov nahajajo tudi imunoglobulini, ki so prevzeti s strani celic. Večina teh proteinov se razgradi posebnih celičnih predelih. FcRn pa na svojo površino veže Ig, jih s tem zaščiti pred razgradnjo in prenese naprej na drugo stran celic (Ghetie in Ward, 2000; Ober in sod., 2001).

Poleg prenosa in zaščite imunoglobulinov je FcRn odgovoren tudi za uravnavanje količine IgG v serumu (slika 5). IgG molekule so najprej prevzete s strani endotelijskih celic. Tiste IgG, ki se vežejo na FcRn, receptor razporedi v sortirne endosome, kompleks FcRn-IgG pa se nato reciklira ali pa se s transcitozo prenese na drugo stran celic. Tisti IgG, ki se ne vežejo z FcRn, pa vstopijo v lizosomalno pot in so na koncu razgrajeni (Kacskovics in sod., 2006; Ober in sod., 2004; Ward in sod., 2003).



Slika 5: Mehanizem prenosa in homeostaze IgG v serumu (Leese, 2003). (a) Prikaz reciklacije IgG in razgradnje nevezanih IgG. (b) Prikaz prevzema, transcitoze in sprostitve vezanih IgG v lumen črevesnih celic in v serum. Na ta način FcRn regulira uravnavanje količine serumskega IgG (Kacskovics, 2004; Ober in sod., 2004).

Pri nekaterih sesalcih je izražanje FcRn na celicah mlečnih žlez zelo kratkotrajno in časovno točno določeno. Pri govedu je ta receptor aktiven le nekaj ur po skotitvi mladiča. Ker mleko proučujejo tudi kot biotehnološki produkt, v katerem bi se lahko kopičile najrazličnejše substance, je študij govejega FcRn kot prenašalne molekule zelo pomemben. V zadnjem času smo zaznali velik porast na področju transgene tehnologije farmskih živali. Ena izmed glavnih smeri te tehnologije je tudi produkcija različnih proteinov v mlečnih žlezah transgenih živali. Mlečne žleze na ta način služijo kot produkcijski sistem za pridobivanje od 23 do 250 g proteina/ kg telesne teže v času laktacije živali. S transportom proteinov preko FcRn bi lahko dobili mleko, obogateno z različnimi zdravilnimi in koristnimi produkti. Mleko je namreč telesna tekočina, ki jo dobimo na zelo preprost način, posebej pri prežvekovalcih in je hkrati pomembna sestavina v prehrani ljudi.

Podobno velja tudi za kokošja jajca in kokošji FcRn preko katerega bi se lahko v jajčni rumenjaku prenesli biotehnološki produkti (Wall in sod., 1997).

FcRn se zaradi svoje vloge uporabljajo tudi v terapevtske namene. Molekule so odgovorne za ohranjanje IgG v serumu, saj jih zaščitijo pred razgradnjo. Rezultati so pokazali, da so različna terapevtska protitelesa in drugi proteini, ki imajo na svoji površini izražen Fc del IgG molekul v serumu bolj zaščitena in se ohranjajo dlje časa, za kar so odgovorni prav FcRn receptorji. Receptorji se namreč vežejo na te molekule, jih na ta način zadržijo in s tem pripomorejo k njihovi terapevtski učinkovitosti (Roopenian in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 CELIČNE LINIJE

3.1.1 Trajne celične linije

Pri celični fuziji smo uporabili transformirano celično linijo kokošnjih limfocitov B MuH1, ki nima encima timidin kinaze, je občutljiva na aminopterin in odporna na ouabain. Mielomske celice MuH1 so suspenzijska celična linija. Pri presajanju celic smo suspenzijo centrifugirali 10 minut pri 800 obratih/min supernatant odstranili, celice pa prenesli v sveže gojišče. Celice smo gojili v Iscove`s modified Dulbecco`s medium (IMDM; Sigma, ZDA) z 10 % fetalnim govejim serumom (FBS; HyClone, ZDA), 0,1 % gentamicinom (Sigma, ZDA) v CO₂ inkubatorju s 5 % CO₂ na 38,5 °C. Celice smo vzdrževali v eksponentni fazi rasti (Matsuda in sod., 1999).

Celice B4 so trajna celična linija (Bick in Davidson, 1974), ki izraža rekombinantni protein FcRn. Lizat teh celic smo uporabili kot antigen. Celice so adherentne in se pritrdijo na podlago stekleničke. Rastejo toliko časa, dokler ne prerastejo celotne podlage, ki jim je na voljo. Pri presajanju celic smo s pomočjo 0,25 % tripsina (Sigma, ZDA) celice odlepili od podlage in jih centrifugirali 10 minut pri 800 obratih/min. Supernatant smo odstranili, usedlino celic pa ustrezno razredčili in jo prenesli v novo gojišče. Celice B4 smo gojili v Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM; Sigma, ZDA) z 10 % FBS, 0,2 % streptomicina-penicilina (Sigma, ZDA), 5 µg/ml govejega inzulina v koncentraciji 4 mg/ml (Sigma, ZDA) in 6 µl/ml geneticina (Gibco, ZDA). Celice smo gojili v CO₂ inkubatorju s 5 % CO₂ na 37 °C.

3.1.1.1 Odtajevanje celic

Celice, ki smo jih uporabili pri poskusih, so bile shranjene v tekočem dušiku pri -196 °C, kjer ohranijo viabilnost (Goding, 1986). Pri postopku odtajevanja smo dali ampulo s

celicami v vodno kopel, segreto na 37 °C. Vsebino ampule smo prenesli v 10 ml ogretega gojišča ter celice centrifugirali 10 minut pri 800 obratih/min. Supernatant smo odstranili, usedlino s celicami pa prenesli v stekleničke z ustreznim svežim gojiščem.

3.1.2 Primarna celična linija

Uporabili smo kokošje vranične celice, ki smo jih takoj po žrtvovanju živali pripravili za celično fuzijo (točka 3.4). S sterilnimi škarjami in pinceto smo vranico očistili od vseh open in maščobe, jo razrezali in nežno potiskali skozi najlonsko sito, da se tkivo razpustilo v posamezne celice. Celice smo dvakrat sprali v DMEM in jih nato prenesli v DMEM gojišče, ki je bilo ogreto na 37 °C (Goding, 1986). Limfocite smo ločili z metodo ločevanja na fikolu (Histopaque; Sigma, ZDA) po navodilih proizvajalca. Celično suspenzijo smo nanegli nad plast fikola v volumskem razmerju 8:3. Celice smo centrifugirali 30 minut pri 400 g/min. Po končanem centrifugiranju so bile v centrifugirki 4 plasti, čisto spodaj v sedimentu so bili eritrociti, nad njimi plast fikola, nad fikolom vranične celice in nad njimi plazma. Najprej smo odstranili zgornjo plast plazme in v čisto epruveto odpipetirali vranične celice. Celice smo resuspendirali v PBS s pH 7,2 in jih ponovno centrifugirali 10 minut pri 800 obratih/min. Po centrifugiranju smo supernatant odstranili in dobili celice, pripravljene za celično fuzijo.

3.2 PRIPRAVA ANTIGENA

Antigen je bil lizat celic B4, ki izražajo rekombinanten protein FcRn (recFcRn). Pri pripravi antigena smo celice iz dveh velikih gojitvenih stekleničk, katerih celotni volumen je bil 500 ml, s pomočjo 0,25 % tripsina najprej odlepili od podlage in jih centrifugirali 10 minut pri 800 obratih/min. Supernatant smo odstranili, usedlino pa resuspendirali v 10 ml fosfatnega pufra (PBS), pH 7,2. Celice smo ponovno centrifugirali 10 minut pri 800 obratih/min in odstranili supernatant, da smo se znebili vseh ostankov gojišča. Usedlino celic smo na koncu resuspendirali v 4 ml PBS pH 7,2 in dobili zelo koncentriran vzorec.

Tako pripravljen vzorec smo s pomočjo homogenizatorja Ultra-turax T8, IKA Labortechnik (Merck, Nemčija) homogenizirali, saj je bilo potrebno celice dobro razbiti,

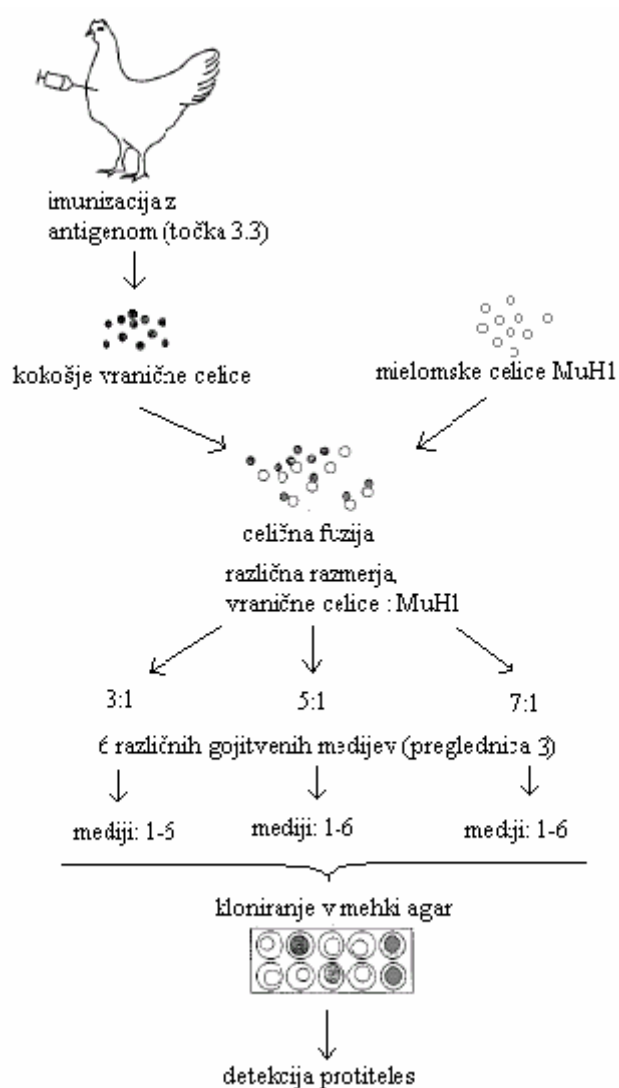
da bi izpostavili recFcRn. Postopek homogeniziranja smo ponovili 2-krat po tri minute pri največji hitrosti. Z aparatom Ultrasonic Disruptor smo z ultrazvokom celice še dodatno razbili. V vzorec smo potopili sondo, postopek pa je trajal pet ciklov, v intervalih po 30 sekund. Tak vzorec smo shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ga kasneje uporabili kot antigen pri imunizaciji.

3.3 IMUNIZACIJA

Za poskus smo uporabili kokoš, pasme Slovenska rjava kokoš, ki so jo vzdrževali v ustreznih prostorih Biotehniške fakultete, Oddelek za zootehniko. Za imunizacijo smo pripravili približno 1 ml imunizacijske mešanice, sestavljene iz 500 μl antigena (točka 3.2) in 500 μl kompletnega Freundovega adjuvansa (Sigma, ZDA). Mesta, kamor smo injicirali antigen, smo najprej dezinficirali s 70 % etanolom, nato pa smo intramuskularno vbrizgali antigen v prsne mišice, na dva ali tri mesta. Imunizacijo smo izvajali v mesečnih časovnih presledkih. Pri drugi imunizaciji smo namesto kompletnega uporabili nekompletni Freundov adjuvans (Sigma, ZDA), ki je bil v enakem volumskem razmerju z antigenom, kakor kompletni adjuvans. Pri zadnjih »poživitvenih« imunizacijah smo v prsne mišice vbrizgali čisti antigen (Goding, 1986; Nishinaka in sod., 1991).

Po četrti, poživitveni imunizaciji smo kokoši iz prsne mišice vzeli kri, jo centrifugirali in v serumu testirali imunski odgovor živali.

Slika 6 prikazuje postopek celične fuzije.



Slika 6: Postopek priprave kokošjih monoklonskih protiteles.

3.4 CELIČNA FUZIJA

Kokošje vranične celice, ki smo jih izolirali na fikolu, smo pomešali z mielomskimi celicami MuH1 v razmerjih 3:1, 5:1 in 7:1. Koncentracija vraničnih celic je bila $1,8 \times 10^8$, koncentracija MuH1 celic pa 6×10^7 , tako da smo dobili razmerje 3:1. Pri ostalih razmerjih je bila koncentracija vraničnih celic enaka kakor prej, koncentracijo mielomskih celic pa smo ustrezno prilagodili. Pri razmerju 5:1 smo uporabili $3,6 \times 10^7$, pri razmerju 7:1 pa 2,6

$\times 10^7$ MuH1 celic. Različna razmerja smo izbrali zato, da bi preverili, kako vplivajo na uspešnost fuzije.

Mešanico celic smo centrifugirali 10 minut pri 800 obratih/min, nato pa čim bolj odstranili supernatant. Usedlino s celicami smo nežno stresli, da se je odstranila s sten epruvete, epruveto pa smo ves čas inkubirali v vodni kopeli, ogreti na 38,5 °C. Predhodno smo pripravili 50 % raztopino polietilenglikola (PEG; Sigma, ZDA) v IMDM in 10 % FBS, ogreto na temperaturo 38,5 °C. V eni minuti smo postopoma dodajali 1 ml PEG. PEG povzroči spremembe na membrani celic in omogoča fuzijo celic. Med dodajanjem raztopine smo epruveto rahlo stresali, da smo zagotovili enakomernejšo porazdelitev PEG. Zatem smo počakali 1 minuto, nato pa smo med stalnim mešanjem in inkubacijo celic na vodni kopeli pri temperaturi 38,5 °C dodajali IMDM; v eni minuti 1 ml in v naslednjih petih minutah 20 ml. Mešanico celic smo potem centrifugirali 10 minut pri 200 g/min in nato odstranili supernatant. Usedlino celic smo resuspendirali v 100 ml HAT medija; 98 ml IMDM z 10 % FBS in 0,1 % gentamicinom, 1 ml HAT₅₀ (Sigma, ZDA) in 1 ml HT₅₀ (Sigma, ZDA). Selektivni medij HAT vsebuje aminopterin, hipoksantin in timidin, kar omogoča preživetje tistim hibridomom, ki so nastali s fuzijo vraničnih in mielomskih celic. Glede na HAT medij, ki se uporablja za mišje celice, smo uporabljali polovično koncentracijo HAT medija, saj so mielomske celice MuH1 občutljive na aminopterin in mora biti njegova koncentracija manjša.

Po 50 μ l celične suspenzije v HAT mediju smo prenesli v mikrotitrne plošče s 96 luknjicami. Fuzijske celice, nastale pri zlitju različnih razmerij obeh vrst celic, smo razdelili v različne gojitvene medije, saj smo želeli preveriti, kako medij vpliva na preživetje hibridomov. Vsi mediji so vsebovali IMDM z 10 % FBS in 0,1 % gentamicina, kar smo poimenovali osnovni medij. Tem medijem smo dodali bodisi rekombinantni kokošji IL-6 (v končni koncentraciji 0,1 %) (Nishimichi in sod., 2005) ali makrofagni IL-6 (v končni koncentraciji 1 %) ali pa kokošji serum (v končni koncentraciji 10 %) (Ch serum; Sigma, ZDA). Iz kombinacije teh dodatkov smo naredili 6 različic gojitvenih medijev za celice. Celični suspenziji smo dodali 50 μ l določene različice gojitvenega medija ter plošče postavili v CO₂ inkubator s 5 % CO₂ na 38,5 °C.

V preglednici 3 so opisani različni gojitveni mediji.

Preglednica 3: Sestava različnih gojitvenih medijev za gojenje fuzijskih celic

Oznaka medija	Sestava medija				
	Osnovni medij			Dodatki	
	IMDM	10 % FBS	0,1 % gentamicin	10 % Ch serum	IL-6
1	+	+	+	-	-
2	+	+	+	-	0,1 % rec IL-6
3	+	+	+	-	1 % makrofagni IL-6
4	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	0,1 % rec IL-6
6	+	+	+	+	1 % makrofagni IL-6

Tri dni po celični fuziji smo dodali 100 µl HAT medija z ouabainom (Sigma, ZDA) v koncentraciji 4×10^{-5} M. Ouabain je selekcijski medij, ki omogoča preživetje hibridomov nastalih pri fuziji kokošnjih vraničnih celic in mielomske celične linije MuH1, ki je odporna na ouabain.

Sedem dni po fuziji smo odstranili polovico medija in dodali 100 µl HT medija z ouabainom v koncentraciji 2×10^{-5} M. HT medij je vseboval IMDM z 10 % FBS in 0,1 % gentamicinom ter 2 % HT₅₀. Po dveh ali treh dneh smo začeli postopoma zmanjševati koncentracijo ouabaina v HT mediju, dokler ta ni bil več prisoten v gojišču. Postopno smo zmanjševali tudi vsebnost HAT₅₀ in HT₅₀ v gojitvenih medijih.

Rast in oblikovanje hibridomov smo spremljali vsak dan, redno smo jim menjali gojišče, supernatante pa spravljali za testiranja. Končno gojišče, v katerem so rasli hibridomi, je vsebovalo IMDM z 10 % FBS in 0,1 % gentamicina.

Supernatante hibridomov smo z neposrednim imunskim testom testirali na prisotnost kokošnjih IgY (točka 3.4.3.1). Hibridome, pri katerih smo določili pozitiven rezultat, smo ponovno izpostavili ouabainu in na ta način preverili uspešnost celične fuzije.

3.4.1 Kloniranje hibridomov

Približno mesec dni po celični fuziji smo zrasle hibridome klonirali z metodo vlivanja v mehki agar (Goding, 1986; Nishinaka in sod., 1991). Najprej smo pripravili medij za kloniranje, ki je vseboval IMDM, 10 % FBS in 20–40 % supernatanta celične kulture MuH1. Medij smo segreli na 38 do 40 °C in v 4,5 ml tega medija suspendirali 25, 50, 100 ali 150 hibridomskih celic, odvisno od števila nastalih klonov. Pripravili smo raztopino 3,5 % Noble agarja (Sigma, ZDA) v PBS pH 7,2 in jo segreli na 45 °C, da je agar postal tekoč. Agarsko raztopino smo nato ohladili na okrog 37 °C in 0,5 ml dodali suspenziji celic ter premešali. Mešanico smo hitro vlili v 6 cm petrijeve posode, jih pokrili in dali v CO₂ inkubator s 5 % CO₂ na 38,5 °C (Nishinaka in sod., 1991).

Po sedmih do desetih dneh je bila že vidna rast kolonij hibridomov. Vsako posamezno kolonijo smo s pomočjo mikroskopa in Pasteurjeve pipete presadili v svojo luknjico mikrotitrne plošče s 96 luknjicami v gojišču IMDM z 10 % FBS, 0,1 % gentamicina in 0,2 % streptomicina-penicilina. Spremljali smo rast kloniranih hibridomov, jim menjali gojišče ter zbirali supernatante.

3.4.1.1 Zamrzovanje hibridomov

Supernatante smo testirali na prisotnost kokošnjih IgY, pozitivne klone smo namnožili in jih nekaj tudi zamrznili. Pri postopku zamrzovanja smo celice najprej centrifugirali 10 minut pri 800 obratih/min, supernatant odlili v drugo epruveto, usedlino celic pa smo resuspendirali v IMDM z 10 % FBS in 10 % dimetilsulfoksida (DMSO; Sigma D-2650, ZDA), tako da je bila koncentracija celic približno 1×10^6 celic/ml. Suspenzijo celic smo dali v posodo za zamrzovanje, v kateri je izopropil alkohol, ki omogoča kontinuirano postopno ohlajevanje celic po 1 °C na minuto. Zamrzovalno posodo smo postavili v zamrzovalno omaro na – 70 °C, čez 24 ur pa smo ampule s celicami prenesli v tekoči dušik, na – 196 °C. Supernatante smo shranili na – 20 °C.

3.5 DETEKCIJA PROTITELES

Kokošje imunske serume in supernatante hibridomov smo testirali na prisotnost protiteles IgY ter preverjali specifičnost protiteles proti recFcRn.

3.5.1 Neposredni imunski test

Z neposrednim encimskoimunskim testom smo preverjali prisotnost kokošnjih protiteles IgY v supernatantih hibridomov (Erhard in sod., 1992).

Test smo izvajali na nitrocelulozni membrani Immobilon PVDF (Millipore, ZDA), na katero smo predhodno narisali mrežo kvadratkov velikosti $0,75 \text{ mm}^2$. Membrano smo 20 minut inkubirali v destilirani vodi, nato pa na osušene kvadratke nanесли 3 μl razredčine supernatantov hibridomov (1:2, 1:20, 1:100) pripravljenih v PBS pufru pH 7,2. Membrano smo zatem 40 minut blokirali v 0,5 % Tween-PBS, nato pa 40 minut v sekundarnih protitelesih, ki so bila kunčja protitelesa proti kokošnjim IgG, konjugirana s peroksidazo (Sigma A 9046, ZDA), redčena s PBS pH 7,2 v razmerju 1:3000. Po inkubaciji smo membrano še dvakrat po 10 minut spirali v 0,05 % Tween.-PBS in enkrat 10 minut v PBS pH 7,2. Po spiranju smo dodali substrat True Blue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA) in počakali, da se pojavi modra barva na kvadratih, kjer je prišlo do reakcije. Kjer smo zaznali zelo intenzivno obarvanje, smo reakcijo označili s +++, pri manj intenzivnem s ++, pri rahlem obarvanju s + in pri zelo šibki reakciji s (+). Za negativno kontrolo smo uporabili fetalni goveji serum (FBS; HyClone, ZDA), za pozitivno pa kokošji serum (HyClone, ZDA). Rezultate smo ocenjevali v primerjavi z negativno kontrolo. Vse inkubacije so potekale pri sobni temperaturi.

3.5.2 Posredni imunski test

S posrednim encimskoimunskim testom smo preverjali vsebnost specifičnih protiteles proti našemu antigenu. Test smo izvajali na nitrocelulozni membrani Immobilon PVDF (Millipore, ZDA), na katero smo narisali kvadratke velikosti $0,75 \text{ mm}^2$ in na membrani, ki smo jo po prenosu proteinov blokirali v 0,5 % Tween-PBS.

Membrano smo namakali 20 minut v destilirani vodi. Na dobro osušene kvadratke smo nanесли približno 3 μ l antigena na kvadratek. Antigen smo redčili s pufrom PBS pH 7,2 v razmerjih 1:2, 1:4 in 1:8. Uporabili smo redčitve kokošnjih imunskih serumov in supernatante hibridomov.

Počakali smo, da se vzorci antigena dobro vpijejo, nato smo membrano 40 minut inkubirali v 0,5 % Tween-PBS ter tako blokirali nevezana mesta na njej. V nadaljevanju smo membrano 45 minut inkubirali v kokošnjih imunskih serumih oziroma v supernatantih hibridomov. Supernatanti hibridomov so bili neredčeni, kokošje imunske serume pa smo redčili s PBS pH 7,2 v razmerjih 1:10, 1:20, 1:40 in 1:80. Za negativno kontrolo smo uporabili pufer PBS pH 7,2, ki ne vsebuje protiteles.

Po inkubaciji smo membrano spirali trikrat po 10 minut v sveže pripravljenem 0,05 % Tween-PBS. V naslednji stopnji smo membrano 40 minut inkubirali v sekundarnih protitelesih, ki so bila kunčja protitelesa proti kokošnjim IgG konjugirana s peroksidazo, redčena s PBS pH 7,2 v razmerju 1:3000 in sveže pripravljena. Stopnje, ki so sledile so bile enake kot pri neposrednem testu. Rezultate smo ocenjevali v primerjavi z negativno kontrolo. Vse inkubacije so potekale pri sobni temperaturi.

3.5.3 Western blot analiza

3.5.3.1 Elektroforeza

S postopkom elektroforeze lahko ločimo proteine med seboj. Uporabili smo enodimenzionalno poliakrilamidno elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS), kjer smo ločili proteine glede na različne molekulske mase (O'Farrell, 1974). SDS-PAGE elektroforezo smo izvedli, kot so opisali Benčina in sod., 1999.

Naš vzorec je bil protein recFcRn v celicah B4, ki smo jih morali predhodno razbiti. Za dobro ločitev molekule FcRn od ostalih celičnih komponent smo na gel nanесли lizat celic B4.

Priprava vzorcev

Vzorec je bil neredčen lizat celic B4 (točka 3.1.2), kateremu smo dodali nanašalni pufer. Volumsko razmerje vzorca in nanašalnega pufra je bilo 3:2. Epico z mešanico smo dobro zaprli in jo segrevali 4 minute na 100 °C. Uporabili smo glavnik z enotno stezo, kar ustreza 14 stezam običajnega glavnika. Nanesli smo 700 µl vzorca na celotno stezo.

Referenčni markerji za določitev molekularskih mas

Kot referenčne markerje smo uporabili mešanico štirinajstih markerjev z molekularskimi masami 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 70 kDa, 85 kDa, 100 kDa, 120 kDa, 150 kDa in 200 kDa (Fermentas, Protein Ladder, SM0661), ki jih pred nanašanjem ni bilo potrebno kuhati.

Pogoji elektroforeze

Elektroforezo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Med dve plošči smo najprej vlili 10 % ločevalni gel z že pripravljeno mešanico 30 % akrilamida/ bis-akrilamida (Sigma, A-3574, ZDA), ga prekrili z 1 ml z vodo nasičenega n-butanola (volumsko razmerje n-butanol : voda je bilo 1:1) in počakali, da se gel strdi. Ko se je gel strdil smo odlili butanol in nanj nalili 4 % koncentracijski gel z že pripravljeno mešanico 30 % akrilamida/ bis-akrilamida. Plošči z vlitima geloma smo zaprli s parafilmom in čez noč shranili na 4 °C.

Za ločevanje beljakovin v gelu smo uporabili naslednje pogoje; ločevanje v koncentracijskem gelu 30 mA, 150 V, 3 ure in ločevanje v ločevalnem gelu 60 mA, 300 V in 5 ur (Benčina in sod., 1999).

3.5.3.2 Prenos proteinov iz gela na membrano

Pri postopku prenosa proteinov iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano Immobilon PVDF (Millipore, ZDA) dobimo na membrani enak vzorec ločenih proteinov, kakor je bil na gelu (Towbin in sod., 1979).

Proteine, ki smo jih ločili z elektroforezo, smo na nitrocelulozno membrano prenesli po že opisanem postopku (Benčina in sod., 1994). Na anodno stran smo najprej položili 4 filter papirje (Munktell, Nova Blot, Švedska) enakih dimenzij kakor gel. Filter papirje smo namočili v elektroblotting pufri (EBP), 10mM CAPS (tri-cikloheksamino ena-propansulfonska kislina; Sigma, ZDA) v 10 % metanolu, da so se prepojili. Na filter papirje smo dali nitrocelulozno membrano Immobilon PVDF (Millipore, ZDA), ki smo jo predhodno nekaj sekund aktivirali v 100 % metanolu (Fluka, Nemčija), nato pa namočili v EBP, da se je prepojila. Membrano smo obrnili tako, da je lice gledalo proti gelu, torej navzgor. Na membrano smo položili gel, ki smo ga predhodno pustili 5 minut v EBP. Tako membrano kot tudi gel smo na enem koncu označili. Na gel smo dali še 4 filter papirje, prav tako enakih dimenzij kakor gel. ter priklopili katodno ploščo. Pri nalaganju plasti smo pazili, med njimi ni bilo zračnih mehurčkov in da so se vse plasti dobro in tesno prilegale. Po končanem nalaganju smo priklopili napetost, ki smo jo izračunali iz razmerja; površina gela $P \times 0,8 \text{ mA}$. Prenos na membrano je tekel približno 1 uro.

Po končanem prenosu smo en del membrane (približno 0,5 cm širok trak) pobarvali, da bi preverili uspešnost prenosa in identificirali posamezne proteine. Najprej smo jo sprali v destilirani vodi, nato smo jo za nekaj sekund dali v 100 % metanol. Membrano smo potem nekaj minut pustili v barvilu, in sicer smo uporabili Brilliant blue R250 (Pharmacia, ZDA). Na koncu smo membrano razbarvali, najprej v 50 % metanolu, nato pa še v destilirani vodi.

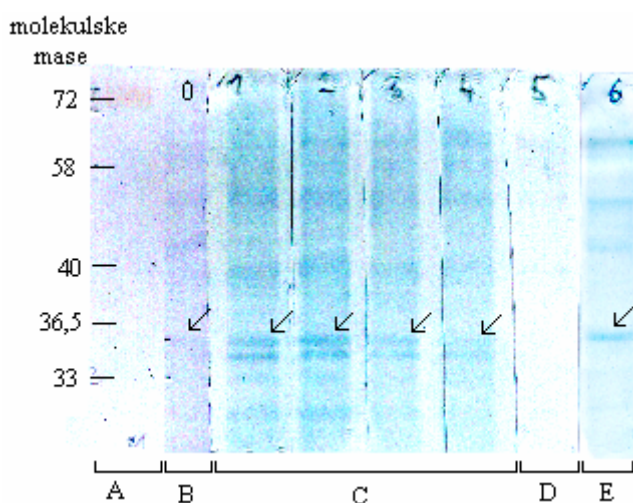
Drugi del membrane smo uporabili za imunoencimski test, ki smo ga izvajali po postopku, ki je bil že opisan v literaturi (Benčina in sod., 1994). Po 30 minutni inkubaciji v 0,5 % Tween PBS, s katero smo blokirali nezasedena mesta na membrani, smo membrano razrezali na trakove in jih kasneje uporabili v testih. Testirali smo prisotnost specifičnih protiteles proti FcRn v kokošnjih serumih in v supernatantih hibridomov. Postopek tega

testa je bil enak kot je opisano pod točko 3.5.2, le da je v tem primeru antigen proteinski band na traku membrane. Za negativno kontrolo smo uporabili neimunski serum oziroma gojišče za celice. Za pozitivno kontrolo smo imeli v vseh primerih kunčji imunski serum proti FcRn. V tem primeru smo za detekcijo uporabili anti-kunčja protitelesa, konjugirana s peroksidazo (Sigma, ZDA).

4 REZULTATI

4.1 USPEŠNOST IMUNIZACIJE

Uspešnost imunizacije smo preverjali s testiranjem imunskega seruma na prisotnost specifičnih protiteles proti FcRn. Na sliki 7 so predstavljeni rezultati testiranja imunskih serumov po četrti pozitivni imunizaciji. Test je bil opravljen z Western blot analizo.



Slika 7: Določanje reakcije med antigenom in protitelesi v kokošjem imunskem serumu. Puščice označujejo reakcijo na mestu, kjer je rekombinantni protein FcRn.

- A- proteinski markerji na katerih so označene molekulske mase. Ločili smo jih z SDS elektroforezo in obarvani z barvilom Brilliant blue.
- B- vzorec, ki smo ga nanegli na gel in ločili z SDS poliakrilamidno elektroforezo ter obarvali z barvilom. Na membrani vidimo ceoten proteinski profil vzorca.
- C- kokošji imunski serum, redčeni v PBS pH 7,2. Redčitve serumov so 1:20, 1:40, 1:80 in 1:160.
- D- kokošji neimunski serum, redčen s PBS pH 7,2 v razmerju 1:50.
- E- kunčja anti-FcRn poliklonska protitelesa, sveže pripravljena in redčena v razmerju 1:50.

Iz slike lahko vidimo, da so v serumu prisotne komponente, ki so reagirale z našim izbranim antigenom. Intenziteta reakcije z redčitvijo serumov pada, kar je pričakovan rezultat, saj je pri višjih redčitvah prisotnih manj protiteles oziroma so le-ta razredčena. Neimunski serum ni dal nobene reakcije, saj smo ga uporabili kot negativno kontrolo in v njem nismo pričakovali prisotnosti protiteles. Kunčji imunski serumu je predstavljal pozitivno kontrolo, ki zagotovo reagira z našim antigenom. Tu je reakcija najmočnejša.

4.2 USPEŠNOST CELIČNE FUZIJE

Uspešnost celične fuzije smo ocenjevali s številom živih hibridomov 6 in 12 dni po fuziji in sicer v glede na uporabljeno gojišče in od razmerja števila celic pri fuziji.

4.2.1 Vpliv gojitvenega medija

Po fuziji smo celice gojili v šestih različnih gojitvenih medijih (preglednica 3), saj smo preverjali, kako le-ti vplivajo na rast hibridomov. Število preživelih hibridomov smo izrazili številčno in v odstotkih, pri čemer 100 odstotkov predstavlja rast v vseh luknjicah mikrotitrne plošče s 96 luknjicami.

Preglednica 4: Število zraslih hibridomov 6 in 12 dni po celični fuziji v različnih gojitvenih medijih

Oznaka medija* / Št. hibridomov	1	2	3	4	5	6
6 dni po celični fuziji	11 / 96 (11,5 %)	10 / 96 (10,4 %)	8 / 96 (8,3 %)	6 / 96 (6,3 %)	4 / 96 (4,2 %)	4 / 96 (4,2 %)
12 dni po celični fuziji	9 / 96 (9,4 %)	8 / 96 (8,3 %)	5 / 96 (5,2 %)	4 / 96 (4,2 %)	0 / 96 (0 %)	4 / 96 (4,2 %)

* oznake medijev so enake kakor v točki 3.4, preglednica 3

V vseh šestih ploščah z različnimi gojitvenimi mediji je po celični fuziji zraslo 43 hibridomov. Kljub temu so le štirje hibridomi ostali živi in so izločali ustrezna protitelesa. Stabilne hibridome smo poimenovali 1A11, 1B6, 1C6 in 2H2. Ostali hibridomi so po 25. dneh celične fuzije propadli.

Prisotnost kokošnjega seruma ne vpliva na večje število hibridomov, hkrati pa bistveno otežuje testiranje na prisotnost specifičnih protiteles. Iz rezultatov je celo opazno, da je boljši izkupiček, kadar smo uporabljali le FBS, vendar tega ne moremo zagotovo trditi, saj nismo uporabili statističnih orodij. Tudi dodatek rekombinantnega IL-6 in makrofagnega IL-6 nima bistvenega vpliva na rast hibridomov. Dinamika propadanja klonov znotraj 12

dni je približno enaka kot pri mišjih hibridomih, vendar pa je odstotek zraslih hibridomov nedvomno nižji.

4.2.2 Vpliv razmerja med vraničnimi in mielomskimi celicami

Pri celični fuziji smo uporabili tudi različna razmerja med kokošnjimi vraničnimi celicami in mielomskimi celicami MuH1, saj smo želeli preveriti, kako dano razmerje vpliva na število nastalih hibridomov in na uspešnost fuzije. Koncentracija vraničnih celic je bila povsod $1,8 \times 10^8$ celic, koncentracijo mielomskih celic pa smo ustrezno preračunali, da so bila dana razmerja 3:1, 5:1 in 7:1. V preglednici 5 je prikazana uspešnost fuzije v odvisnosti od razmerja obeh vrst celic.

Preglednica 5: Število zraslih hibridomov v vseh šestih različicah gojitvenih medijev glede na različna razmerja med kokošnjimi vraničnimi celicami in mielomskimi celicami MuH1

vranične celice : mielomske celice	3:1	5:1	7:1
število zraslih hibridomov	43 / 576	0 / 576	0 / 576

Celična fuzija je bila uspešna le, ko smo uporabili razmerje med vraničnimi in mielomskimi celicami 3:1 (Matsuda in sod., 1999). Nekateri članki navajajo tudi razmerje celic 5:1 (Nishinaka in sod., 1996), vendar pri naših poskusih pri tem razmerju ni bilo vidne nobene celične rasti.

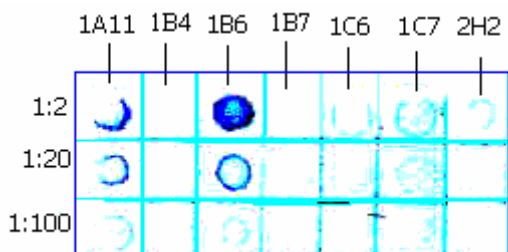
4.3 TESTIRANJE HIBRIDOMOV

Po celični fuziji smo ugotavljali, če hibridomi izločajo protitelesa IgY in ali so le-ta specifična za izbrani antigen.

4.3.1 Testiranje na prisotnost IgY

Z neposrednim imunskoencimskim testom smo na nitrocelulozni membrani preverili prisotnost protiteles IgY v supernatantih hibridomov. Na membrano smo nanegli ustrezne redčitve supernatantov, jo večkrat spirali ter inkubirali v sekundarnih protitelesih. Na koncu smo nanegli še substrat in počakali na pojav modre barve, kjer je prišlo do reakcije. Ker barva na membrani sčasoma zbledi, smo iste rezultate ovrednotili še s + in – oznakami, kar je prikazano v legendi k sliki 8.

Slika 8 prikazuje rezultate testa.



Slika 8: Preverjanje prisotnosti protiteles v supernatantih hibridomov. Supernatante smo redčili v PBS pufru pH 7,2 v razmerjih 1:2, 1:20 in 1:100.

Legenda k sliki 8:

Redčitev supernatanta	Oznaka hibridoma						
	1A11	1B4	1B6	1B7	1C6	1C7	2H2
1:2	+++	-	+++	-	+	+	+
1:20	++	-	++	-	(+)	(+)	-
1:100	+	-	+	-	-	-	-

Opomba: +++ = zelo močna reakcija

++ = močna reakcija

+ = manj močna reakcija

(+) = šibka reakcija

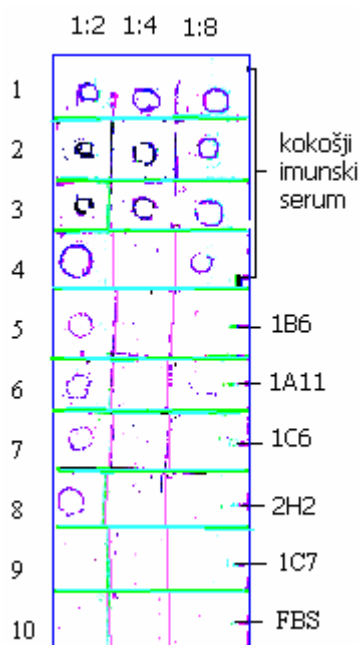
- = negativna reakcija

Pozitivna reakcija je bila vidna pri petih klonih: 1A11, 1B6, 1C6, 1C7 in 2H2. Z višanjem redčitve supernatantov intenziteta reakcije pada, kar smo tudi pričakovali. Pri višjih redčitvah je v supernatatih prisotnih manj protiteles, kakor v neredčenih. Negativna kontrola testa je bil FBS, kjer smo pričakovali in dobili negativno reakcijo.

4.3.2 Specifičnost protiteles

Supernatante hibridomov smo testirali tudi z posrednim imunskoencimskim testom (točka 3.5.2), kjer smo preverjali specifičnost protiteles, določenih v supernatantih hibridomov, proti našemu antigenu, recFcRn. Rezultati so prikazani na sliki 9 in v legendi k sliki 9.

Legenda k sliki 9:



		Redčitve antigena			
Redčitve serumov	Oznaka traku	1:2	1:4	1:8	
	1:10	1	+++	+++	+++
	1:20	2	+++	+++	+++
	1:40	3	+++	+++	+++
	1:80	4	+++	++	+++
Oznaka hibridomov	1B6	5	++	-	-
	1A11	6	++	-	-
	1C6	7	++	-	-
	2H2	8	++	-	-
	1C7	9	-	-	-
	FBS	10	-	-	-

Opomba: +++ = zelo močna reakcija

++ = močna reakcija

+ = manj močna reakcija

(+) = šibka reakcija

- = negativna reakcija

Slika 9 (levo): Preverjanje aktivnosti in specifičnosti protiteles v supernatantih hibridomov proti antigenu FcRn. Redčitve antigena so označene vodoravno na membrani (1:2, 1:4, 1:8). Posamezni trakovi 1-4 so bili inkubirani v kokošjem imunskem serumu, redčenim v PBS pH 7,2 (1:10, 1:20, 1:40, 1:80), trakovi 5-9 v neredčenih supernatantih hibridomov in trak 10 v neredčenem FBS.

Pozitivna reakcija na trakovih 1-4 je bila pričakovana, saj so bili inkubirani v kokošnjem imunskem serumu, za katerega smo že v času imunizacije ugotovili, da reagira z antigenom. Pozitivna reakcija je bila tudi na trakovih 5–8, s čemer smo potrdili specifičnost protiteles v supernatantih hibridomov. Trak 10 smo inkubirali v neredčenem FBS, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo in je zato reakcija po pričakovanjih negativna.

4.4 USPEŠNOST KLONIRANJA IN TESTIRANJE KLONOV

Po celični fuziji smo z metodo vlivanja v mehki agar klonirali celične linije hibridomov 1A11, 1B6, 1C6, 2H2, saj so ti dali pozitiven rezultat z izbranim antigenom. Po 10. dneh, ko je bila rast celic že vidna, smo vsako posamezno kolonijo s Pasteurjevo pipeto prenesli v svojo luknjico mikrotitrne plošče s 96 luknjicami. Rezultate smo ovrednotili številčno in v odstotkih, kjer 100 odstotkov predstavlja rast v vseh luknjicah mikrotitrne plošče s 96 luknjicami.

Spodnja preglednica prikazuje uspešnost kloniranja in število zraslih klonov.

Preglednica 6: Število zraslih klonov po kloniranju

Oznaka celične linije hibridomov	1A11	1B6	1C6	2H2
Število klonov [%]	2 / 96 (2,1 %)	6 / 96 (6,3 %)	9 / 96 (9,4 %)	0 / 96 (0 %)

V štirih ploščah je skupaj zraslo le 17 klonov. Tako število klonov je v primerjavi s številom pri mišjih hibridomih zelo nizko, vendar glede na dinamiko propadanja kokošnjih hibridomov pričakovano.

4.4.1 Testiranje klonov

Po kloniranju smo določali, če klonirani hibridomi izločajo protitelesa IgY in ali so ta specifična za naš antigen.

Z neposrednim imunskoencimskim testom smo v supernatantih kloniranih hibridomov preverjali prisotnost protiteles IgY. Membrano smo inkubirali v neredčenih supernatantih, vendar nismo detektirali nobene reakcije.

Prisotnost specifičnih protiteles proti recFcRn smo v supernatantih kloniranih hibridomov testirali s posrednim imunskoencimskim testom. Tudi tokrat nismo dobili nobene pozitivne reakcije.

Glede na to, da je sposobnost izločanja protiteles pred kloniranjem padala že pri celičnih linijah hibridomov, ti rezultati niso bili presenetljivi.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Za diagnostiko, raziskave in terapijo se uporabljajo protitelesa, ki so večinoma sesalskega izvora (mišja, kunčja, humana). Danes se uveljavljajo tudi kokošji imunoglobulini razreda Y (IgY), ki so precej podobni sesalskim Ig razreda G, se pa nekoliko razlikujejo v strukturi in posledično tudi v biološki vlogi. Prednosti pri pripravi kokošnjih IgY so v tem, da se kokoši običajno bolje odzovejo na antigene, ki izhajajo iz sesalskih organizmov in so evolucijsko ohranjeni in v tem, da se protitelesa kopičijo v jajcih in jih lahko pridobimo na neinvaziven način. Z uvedbo kokošje mielomske celične linije je postalo možno proizvesti kokošja monoklonska protitelesa in tudi rekombinantna protitelesa.

Prva kokošja monoklonska protitelesa (chmAb) so opisali Nishinaka in sod., leta 1989. Pridobili so eno hibridomsko celico, ki je izločala protitelesa specifična za njihov antigen (Nishinaka in sod., 1989). Prve večje raziskave, kjer so se kokošja mAb izkazala kot zelo uporabna, so bile raziskave na področju prionskih proteinov, kjer je bil mišji sistem za pridobivanje mAbs dokaj neprimeren, saj miške največkrat niso razvile imunskega odgovora. Te raziskave so doprinesle tudi k diagnostiki prionskih boleznih (Matshushita in sod., 1998; Matsuda in sod., 1999; Nakamura in sod., 2004).

Kokoši so evolucijsko dovolj oddaljene, da jih lahko v določenih primerih uporabimo za imunizacijo in bo po pričakovanjih njihov odziv precej močnejši kot pri sesalcih. To je bil tudi razlog, da smo za imunizacijo uporabili kokoši.

V naših poskusih smo kot antigen uporabili rekombinanten protein govejega FcRn. FcRn so površinske molekule, ki so pri sesalcih odgovorne za prenos Ig preko epitelnih celic in so med sesalci evolucijsko ohranjene. Antigen, ki smo ga uporabili ni bil čisti ali očiščen protein, ampak je bil rekombinanten protein z majhno molekulsko maso iz celičnega lizata celic B4. Izbira kokoši, kot žival za imunizacijo, je bila pri tem poskusu ključnega pomena.

S tem antigenom so raziskovalci (Kacs Kovics in sod.) najprej imunizirali miške in kunce. Pri miškah niso dobili zadostnega imunskega odziva, pri kuncih pa je bil imunski odziv dober, vendar so protitelesa počasi izgubljala svojo aktivnost (Kacs Kovics, 2005). V našem poskusu smo po tretji in četrti imunizaciji v serumu kokoši zasledili relativno visoke titre specifičnih protiteles. Kokošja protitelesa so v primerjavi z večino sesalskih bolj stabilna pri temperaturi 40 °C in dalj časa ohranjajo aktivnost (Larsson in sod., 1993).

Iz slike 7 lahko razberemo, da je bila reakcija v kokošnjih imunskih serumih dovolj izrazita, saj je naš antigen pri kokoši vzbudil tako velik imunski odziv, da smo ga lahko zaznali. Pozitivno reakcijo smo pričakovali tudi pri inkubaciji s kunčjimi anti-FcRn poliklonskimi protitelesi, ki smo jih uporabili kot pozitivno kontrolo testa. Ta test smo namreč izvajali v času, ko so bila kunčja protitelesa še sveža. Za negativno kontrolo smo uporabili neimunski kokošji serum, kjer smo po pričakovanjih dobili negativno reakcijo na položaju FcRn proteina, videti pa je nekaj nespecifičnih reakcij, ki so skupne imunskemu in neimunskemu serumu.

Po potrditvi reakcije kokošnjih imunskih serumov z antigenom smo žival žrtvovali, ji odvzeli vranico in pripravili celice za fuzijo, kokošnjih vraničnih celic in kokošje mielomske celične linije MuH1 (Nishinka in sod., 1996). Uspešnost fuzije smo preverjali s številom živih hibridomov v odvisnosti od uporabljenega gojišča in od razmerja celic pri fuziji.

Po fuziji smo celice gojili v šestih različnih gojitvenih medijih (preglednica 3). Skupaj je v vseh šestih ploščah zraslo 43 hibridomov, kar je le 7,5 %. Ta odstotek je v primerjavi z rastjo mišjih hibridomov izjemno nizek, saj se tam včasih približamo tudi 100 %. Za nizek odstotek nastalih kokošnjih hibridomov sta možni dve razlagi: i) mielomska celična linija MuH1 morda še ni optimalna tako kot npr. mišja NSO, ii) postopek celične fuzije še ni tako dodelan kot pri mišjih mAbs. Potek celične fuzije namreč ni bistveno drugačen, kot pri pripravi mišjih mAb, le HAT selekcijski medij je uporabljen v polovični koncentraciji, dodan pa je še dodaten selekcijski pritisk in sicer ouabain.

V preglednici 4 je prikazano število zraslih hibridomov 6 in 12 dni po celični fuziji. Rast je bila največja v osnovnem mediju, ki je vseboval le IMDM z 10 % FBS in 0,1 % gentamicina. Rast je bila najslabša v gojišču, ki je poleg osnovnega medija vseboval še 10

% kokošji serum in 1 % makrofagni IL-6. V gojišču, ki je poleg osnovnega medija vseboval 10 % kokošji serum in 0,1 % rec IL-6 so po 12. dneh propadle vse celice.

Glede na dobljene rezultate vidimo, da dodatek kokošjega seruma ni vplival na boljšo rast hibridomov, čeprav smo to pričakovali. Ta rezultat je za proizvodnjo kokošjih mAb pravzaprav ugoden, saj prisotnost kokošjega seruma v gojitvenem mediju ovira kasnejša testiranja prisotnosti specifičnih IgY. Kokošji serum namreč prav tako vsebuje IgY in le ti dajo pri testiranju prisotnosti IgY lažno pozitivne reakcije. Zato bi v primeru, če bi imel kokošji serum ugoden učinek na rast nastalih hibridomov, morali v presejalnih postopkih uporabljati samo posredne teste.

Tudi dodatek rekombinantnega IL-6 in makrofagnega IL-6 ni imel bistvenega vpliva na rast hibridomov, čeprav v literaturi navajajo, da naj bi IL-6 pripomogel k boljši rasti celic *in vitro*. Dodatek IL-6 naj bi vplival tako na proizvodnjo protiteles v kot tudi na nastajanje kokošjih hibridomov pri celični fuziji (Nishimichi in sod., 2005). Rezultati v naših poskusih so celo pokazali, da je bila rast najboljša v osnovnem mediju, vendar tega nismo statistično ovrednotili. Tudi dejstvo, da IL-6 nima bistvenega vpliva na rast, je ugodno za postopek priprave protiteles, ki bi se ob nujnem dodatku te komponente podražil.

V vseh šestih medijih smo opazili tudi dinamiko propadanja hibridomov. To smo glede na izkušnje z mišjimi hibridomi tudi pričakovali, saj je dinamika pri obeh precej podobna.

Drug parameter, ki smo ga preučevali je bilo razmerje vraničnih in mielomskih celic pri fuziji. Koncentracija vraničnih celic je bila povsod $1,8 \times 10^8$ celic, koncentracijo mielomskih celic pa smo preračunali glede na to število. Razmerja med vraničnimi in mielomskimi celicami pri celični fuziji so bila 3:1, 5:1 in 7:1. Tudi iz literature lahko razberemo, da so različni raziskovalci uporabljali različna razmerja. V začetku raziskav so uporabljali razmerje celic v fuziji 5:1 ne glede na uporabljeno mielomsko linijo (Nishinaka in sod., 1989; Nishinaka in sod., 1991; Asaoka in sod., 1991; Nishinaka in sod., 1996; Matsushita in sod., 1998). Prvi, ki je opisal in uporabil razmerje med vraničnimi in mielomskimi celicami 3:1, je bil Matsuda in sod., leta 1998. Pri celični fuziji so uporabili mielomsko celično linijo MuH1, s katero so uspešno izvedli fuzijo (Matsuda in sod., 1998). V nadaljevanju so raziskovalci večinoma ohranili takšno razmerje celic (Nakamura in sod., 2003; Nakamura in sod., 2004).

V preglednici 5 lahko vidimo, da je bila fuzija uspešna le, ko smo uporabili razmerje celic 3:1. Ker smo poskus izvajali le enkrat, ne moremo z gotovostjo trditi, da je to razmerje optimalno.

Po celični fuziji je v vseh gojitvenih medijih zraslo skupaj 43 kokošnjih hibridomov, vendar jih je po 25. dneh večina propadla. Tako intenzivno dinamiko propadanja klonov so opisali tudi že drugi avtorji. V članku, kjer so opisana prva chmAb, je dinamika propadanja zelo velika. Iz 13. mikrotitrskih plošč, kjer so rasli kokošji hibridomi so 30 dni po celični fuziji pridobili le en klon, ki je izločal protitelesa, specifična za njihov antigen (Nishinaka in sod., 1989). V nadaljevanju poskusov pridobivanja chmAb se je število propadlih klonov po fuziji zmanjševalo, saj so postopoma izboljšali metodo pridobivanja chmAb, gojitvene medije in tudi mielomsko celično linijo (Nishinaka in sod., 1989; Nishinaka in sod., 1991; Nishinaka in sod., 1996).

V našem poskusu smo 25 dni po celični fuziji opredelili štiri stabilne kokošje hibridome, ki smo jih poimenovali 1A11, 1B6, 1C6 in 2H2.

Tri tedne po celični fuziji smo zrasle hibridome testirali z imunskeoencimskim testom, saj smo v supernatantih hibridomov želeli preveriti prisotnost protiteles. Najprej smo na nitrocelulozni membrani preverili prisotnost IgY. Pri petih klonih, ki smo jih označili z 1A11, 1B6, 1C6, 1C7 in 2H2, je bila vidna pozitivna reakcija. Pri dveh hibridomih je bila reakcija negativna, saj tam očitno ni bilo protiteles ali pa so bila v prenizkih koncentracijah, da bi jih lahko zaznali s tem testom. Prav tako smo dobili negativno reakcijo pri FBS, ki smo ga uporabili za negativno kontrolo.

Pozitivne reakcije smo dobili tudi pri neposrednem imunskeoencimskem testu, kjer smo preverjali specifičnost protiteles v supernatantih hibridomov. Reakcija je potekala na celičnem lizatu, ki smo ga uporabili za imunizacijo. Pozitivno so reagirali kloni 1A11, 1B6, 1C6 in 2H2, vendar so bile reakcije že precej šibke.

Vseh pet klonov, pri katerih smo določili prisotnost IgY smo približno teden dni zatem ponovno testirali na enak način. Tokrat so bile reakcije že precej bolj šibke ali pa jih sploh ni bilo. Hibridomi so tekom kultivacije počasi izgubljali sposobnost izločanja protiteles. Podobni rezultati so že bili opisani v literaturi (Nishinaka in sod., 1989; Nishinaka in sod., 1991). V ta namen so nekateri raziskovalci v gojitveni medij dodajali rastne faktorje, ki bi

spodbudili izločanje protiteles in hkrati ohranili njihovo aktivnost (Nishinaka in sod., 1989).

Kar nekaj avtorjev je v literaturi opisalo pojav izgubljanja kromosomov v hibridomskih celičnih linijah med samo kultivacijo. Citogenetske analize so pokazale, da je izgubljanje kromosomov povezano z izgubo sposobnosti izločanja protiteles. To so zaznali pri proizvodnji tako mišjih kot tudi humanih mAbs (Köhler, 1980; Nowak, 1985). Ena izmed možnih razlag za slab izkupiček pri proizvodnji kokošnjih mAbs je tudi izguba kromosomov v hibridomih.

Klone 1A11, 1B6, 1C6 in 2H2 smo klonirali z metodo vlivanja v mehki agar. Ko so kolonije hibridomov postale vidne, smo posamezno kolonijo s Pasteurjevo pipeto presadili v ločeno, posamezno luknjico mikrotitrne plošče s 96 luknjicami. Število zraslih klonov je prikazano v preglednici 6. V vseh štirih ploščah, kjer smo gojili klonirane hibridome, je zraslo le 17 klonov oziroma 4,4 %, če privzamemo, da je rast 100 %, kadar kolonije zrastejo v vseh luknjicah posamezne mikrotitrne plošče. Glede na dinamiko propadanja kokošnjih hibridomov je bil tak rezultat pričakovan.

Tudi te klone smo testirali na prisotnost IgY, vendar so bili vsi negativni. Tak rezultat je bil pričakovan glede na to, da so med kultivacijo hibridomi že pred kloniranjem počasi izgubljali sposobnost izločanja protiteles.

5.2 SKLEPI

- V kokoši smo po imunizaciji z lizatoma celic B4 uspeli vzbuditi imunski odziv proti rec FcRn.
- Uspešno smo izvedli fuzijo med kokošnjimi vraničnimi celicami in kokošjo mielomsko linijo MuH1.
- Rast hibridomov je bila najboljša v osnovnem mediju (IMDM, 10 % FBS, 0,1 % gentamicin) brez dodatkov.
- Dodatek kokošnjega seruma ni imel vpliva na rast hibridomov.
- Dodatek IL-6 ni imel vpliva na rast hibridomov.

- Najbolj optimalno razmerje med vraničnimi in mielomskimi celicami je bilo 3:1.
- Pri celični fuziji smo pridobili štiri hibridome, ki smo jih poimenovali 1A11, 1B6, 1C6 in 2H2. Celoten izkupiček je bil torej precej manjši kakor pri pripravi mišjih monoklonskih protiteles.
- Med kultivacijo so hibridomi počasi izgubljali sposobnost izločanja protiteles.
- Prisotnost IgY v supernatantih hibridomov smo zasledili do 25. dneva.
- Klonirani hibridomi niso izločali več IgY.

6 POVZETEK

Živali so za obrambo pred nevarnimi snovmi razvile obrambni ali imunski sistem. En način obrambe predstavljajo protitelesa ali imunoglobulini, ki jih izdelujejo limfociti B. Limfociti B zorijo pri sesalcih v kostnem mozgu, zorenje pa poteka le v času embionalnega razvoja. Pri pticah limfociti B zorijo v Fabricijevi bursi in nastajajo tudi, ko je žival že odrasla. Pri pticah protitelesa iz jajčnega rumenjaka označujemo z IgY in so homologi Ig razreda G pri sesalcih.

Kokoši so evolucijsko precej oddaljene od sesalcev, zato so primerne za imunizacijo, kadar imamo antigen sesalskega izvora, ki je ohranjen v evoluciji. V naših poskusih smo kot antigen uporabili rekombinanten protein FcRn. Ta je pri sesalcih odgovoren za prenos imunoglobulinov skozi epitelne celice in pri miškah najverjetneje ne bi sporožil zadostnega imunskega odziva.

Po imunizaciji kokoši z recFcRn smo žival žrtvovali ter pripravili vranične in mielomske celice za celično fuzijo. Celično fuzijo smo izvedli s polietilenglikolom, volumsko razmerje vraničnih in mielomskih celic pa je bilo 3:1, 5:1 in 7:1. Uspešnost fuzije smo ocenjevali s številom živih hibridomov v odvisnosti od gojišča in od razmerja celic pri fuziji. Hibridome smo gojili v šestih različnih gojitvenih medijih, saj smo preverjali, kako ti vplivajo na njihovo preživetje. V supernatantih hibridomov smo ugotavljali, če hibridomi izločajo protitelesa IgY in če so le-ta specifična za izbrani antigen.

Po celični fuziji smo z metodo vlivanja v mehki agar klonirali preživele hibridome. Rast klonov smo opazovali pod mikroskopom, uspešnost kloniranja pa številčno ovrednotili. Po kloniranju smo določali ali tudi kloni izločajo protitelesa IgY in ali so ta specifična za naš antigen.

Ker je izražanje FcRn pri nekaterih sesalcih zelo kratkotrajno, je proučevanje te molekule zelo koristno. Pri tem so zelo pomembno orodje monoklonska protitelesa, katerih priprava je predmet pričujoče naloge.

7 VIRI

- Adamski F.M., King A.T., Demmer J. 2000. Expression of the Fc receptor in the mammary gland during lactation in the marsupial *Trichosurus vulpecula* (brushtail possum). *Molecular Immunology*, 37, 8: 435-444
- Asaoka H., Nishinaka S., Wakamiya N., Matsuda H., Murata M. 1991. Two chicken monoclonal antibodies specific for heterophil Hanganutziu-Deicher antigens. *Immunology Letters*, 32: 91-96
- Barth C.F., Humphries E.H. 1988. Expression of ν -rel induces mature B-cell lines that Reflect the diversity of avian immunoglobulin heavy and light-chain rearrangements. *Molecular and Cellular Biology*, 8,12: 5358-5368
- Benčina D., Kleven S.H., Elfaki M.G., Snoj A., Dovč P., Dorrer D., Russ I. 1994. Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 23: 19-36
- Benčina D., Narat M., Dovč P., Drobnič V.M., Habe F., Kleven S.H. 1999. The characterization of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal amino acid sequences. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 173: 85-94
- Bick M.D., Davidson R.L. 1974. Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line (mammalian cells). *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 71, 5: 2082-2086
- Carlander D. 2002. Avian IgY antibody: *In vitro* and *in vivo*. Doctoral thesis. Uppsala, Uppsala University, Faculty of Medicine: 53 str.
- Chiou V. 2002. Duck antibodies for IVD applications. *In vitro Diagnostic Technology*: April, 31-36.
<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/02/04/003.html> (01. avg. 2006): 4 str.
- Constantinoiu C., Lillehoj H.S., Matsubayashi M., Tani H., Matsuda H., Sasai K., Baba E. 2004. Characterization of stage-specific and cross-reactive antigens from *Eimeria acervulina* by chicken monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary and Medical Sciences*, 66, 4: 403-408
- Dickinson B.L., Badizadegan K., Wu Z., Ahouse J.C., Zhu X., Simister N.E., Blumberg R.S., Lencer W.I. 1999. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 7: 903-911

- Dourain N.M., Houssaint E., Jotereau F.V., Belo M. 1975. Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 72, 7: 2701-2705
- Erhard M.H., Quistorp Von I., Schraner I., Jüngling A., Kaspers B., Schmidt P., Kühlmann R. 1992. Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay system for the detection of chicken immunoglobulins G, M and A using monoclonal antibodies. *Poultry Science*, 71: 302-310
- Ghetie V., Ward S. 2000. Multiple roles for the major histocompatibility complex class 1-related receptor FcRn. *Annual Review of Immunology*, 18: 739-766
- Goding J. 1986. *Monoclonal antibodies: principles and practise*. 2nd ed. London, Academic Press: 315 str.
- Greunke K., Spillner E., Braren I., Seismann H., Kainz S., Hahn U., Grunwald T., Bredehorst R. 2005. Bivalent monoclonal IgY antibody formats by conversion on recombinant antibody fragments. *Journal of Biotechnology*, 124, 2: 446-456
- Guss B., Eliasson M., Olsson A., Uhlén M., Frej A.K., Jörnvall H., Flock J.I., Lindberg M. 1986. Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *European Molecular Biology Organization Journal*, 5, 7: 1567-1575
- Kacskovics I. 2004. Fc receptors in livestock species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102, 4: 351-362
- Kacskovics I. 2005. »Imunizacija miši in kuncev z recFcRn«. Budapest, Szent István University, Faculty of Veterinary Science, Department of Physiology and Biochemistry. kacskovics.imre@aotk.szie.hu (osebni vir, 2005)
- Kacskovics I., Kis Z., Mayer B., West A.P., Tiangco N.E., Tilahun M., Cervenak L., Bjorkman P.J., Goldsby R.A., Szenci O., Hammarström L. 2006. FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. *International Immunology*, 18, 4: 525-536
- Kacskovics I., Wu Z., Simister N.E., Frenyó L.V., Hammarström L. 2000. Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc receptor. *Journal of Immunology*, 164: 1889-1897
- Köhler G. 1980. Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 77, 4: 2197-2199

Larsson A., Balow R.M., Lindahl T.L., Forsberg P.O. 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution- a review. *Poultry Science*, 72: 1807-1812

Larsson A., Karisson-Parre A., Sjöquist J. 1991. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clinical Chemistry*, 37, 3: 411-414

Larsson A., Sjöquist J. 1988. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. *Journal of Immunological Methods*, 108, 1-2: 205-208 (Abstract)

Leese P. 2003. Human immune protein FcRn: IgG transcytosis and catabolism. Davidson, Davidson College, Department of Biology.
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Immunology/Students/Spring2003/Leese/First%20Page.html> (28. sept. 2006): 6 str.

Matsuda H., Mitsuda H., Nakamura N., Furusawa S., Mohri S., Kitamoto T. 1999. A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. *Immunology and Microbial Microbiology*, 23: 189-194

Matsushita K., Horiuchi H., Furusawa S., Horiuchi M., Shinagawa M., Matsuda H. 1998. Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *Journal of Veterinary and Medical Sciences*, 60, 6: 777-779

Mayer B., Doleschall M., Bender B., Bartyik J., Bosze Z., Frenyó L.V., Kacskovics I. 2005. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Research*, 72: 107-112

Mayer B., Zolnai A., Frenyó L.V., Jancsik V., Szentirmay Z., Hammarström L., Kacskovics I. 2002. Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. *Immunology*, 107: 288-296

Michael N., Accavitti M.A., Masteller E., Thompson C.B. 1998. The antigen-binding characteristics of mAb derived from *in vivo* priming of avian B cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 95: 1166-1171

Nakamura N., Shimokawa M., Miyamoto K., Hojyo S., Horiuchi H., Furusawa S., Matsuda H. 2003. Two expression vectors for the phage-displayed chicken monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods*, 280: 157-164

- Nakamura N., Shuyama A., Hojyo S., Shimokawa M., Miyamoto K., Kawashima T., Aosasa M., Horiuchi H., Furusawa S., Matsuda H. 2004. Establishment of a chicken monoclonal antibody panel against mammalian prion protein. *Journal of Veterinary and Medical Sciences*, 66, 7: 807-814
- Narat M. 2003. Production of antibodies in chickens. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 3: 259-267
- Narat M., Benčina D., Kleven S.H., Habe F. 1998. The hemagglutination-positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chicken more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. *Infection and Immunity*, 66, 12: 6004-6009
- Nishimichi N., Aosasa M., Kawashima T., Horiuchi H., Furusawa S., Matsuda H. 2005. Biological activity of recombinant chicken interleukin-6 in chicken hybridoma cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106: 97-105
- Nishinaka S., Akiba H., Nakamura M., Suzuki K., Suzuki T., Tsubokura K., Horiuchi H., Furusawa S., Matsuda H. 1996. Two chicken B cell lines resistant to ouabain for the production of chicken monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary and Medical Sciences*, 58, 11: 1053-1056
- Nishinaka S., Matsuda H., Murata M. 1989. Establishment of a chicken × chicken hybridoma secreting specific antibody. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 89: 416-419
- Nishinaka S., Suzuki T., Matsuda H., Murata M. 1991. A new cell line for the production of chicken monoclonal antibody by hybridoma technology. *Journal of Immunological Methods*, 139: 27-222
- Nowak J.S. 1985. Loss of antibody production accompanied by chromosome loss in a cloned hybrid line secreting antibodies to sheep red blood cells. *Experientia*, 41, 1: 88-89
- Ober R.J., Martinez C., Lai X., Zhou J., Ward E.S. 2004. Excitotoxicity of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 30: 11076-11081
- Ober R.J., Radu C.G., Ghetie V., Ward S. 2001. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *International Immunology*, 13, 12: 1551-1559
- O'Farrell P.H. 1974. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 10: 4007-4021

Raghavan M., Wang Y., Bjorkman P.J. 1995. Effects of the receptor dimerization on the interaction between the class I major histocompatibility complex-related Fc receptor and IgG. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 92: 11200-11204

Robertus J. 2002. MHC proteins. Austin, University of Texas, Department of Chemistry and Biochemistry.

<http://courses.cm.utexas.edu/archive/Spring2002/CH339K/Robertus/overheads-1.htm>

(27. okt. 2006): 1 str.

Roopenian D.C., Christianson G.J., Sproule T.J., Brown A.C., Akilesh S., Jung N., Petkova S., Avanesian L., Choi E.Y., Shaffer D.J., Eden P.A., Anderson C.L. 2003. The MHC class 1-like IgG receptors controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *The Journal of Immunology*, 170: 3528-3533

Shah U., Dickinson B.K., Blumberg R.S., Simister N.E., Lencer W.I., Walker A. 2003. Distribution of the IgG Fc receptor, FcRn, in the human fetal intestine. *International Pediatric Research Foundation*, 53, 2: 295-301

Story C.M., Mikulska J.E., Simister N.E. 1994. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *The Journal of Experimental Medicine*, 180: 2377-2381

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 9, 76: 4350-4354

Vozelj M. 2000. *Temelji imunologije*. 1 izd. Ljubljana, DZS: 550 str.

Wall R.J., Kerr D.E., Bondioli K.R. 1997. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *Journal of Dairy Science*, 80: 2213-2224

Ward S.E., Zhou J., Ghetie V., Ober R.J. 2003. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *International Immunology*, 15, 2: 187-195

Weill J.C., Reynaud C.A., Lassila O., Pink J.R.L. 1985. Rearrangement of chicken immunoglobulin genes is not an ongoing process in the embryonic bursa of Fabricius. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 82: 3336-3340

Zhu X., Meng G., Dickinson B.L., Li X., Mizoguchi E., Miao L., Wang Y., Robert C., Wu B., Smith P.D., Lencer W.I., Blumberg R.S. 2001. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages and dendritic cells. *Journal of Immunology*, 166: 3266-3276

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Narat Mojci za vodenje pri laboratorijskem delu, pri izdelavi diplomske naloge ter za vse nasvete, pripombe in strokovno pomoč.

Hvala recenzentki prof. dr. Čurin-Šerbec Vladki za temeljit in hiter pregled diplomske naloge.

Hvala vsem sodelavcem Oddelka za zootehniko na Rodici za pomoč pri delu v laboratoriju.

Hvala vsem prijateljem ter predvsem družini, mami, bratu in starim staršem za pomoč, spodbudo in podporo tekom celotnega študija.

HVALA VSEM!