

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alenka MIRNIK

**IDENTIFIKACIJA RECEPTORJA ZA PRENOS MOLEKULE IgY IZ  
KRVI V JAJČNI RUMENJAK**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF THE RECEPTOR WHICH TRANSFERS  
CHICKEN IgY INTO THE CHICKEN EGG YOLK**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Diplomaska naloga je bila opravljena v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete na Rodici pri Domžalah.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Mojca Narat ter za recenzentko prof. dr. Vladka Čurin-Šerbec.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Recenzentka: prof. dr. Vladka Čurin-Šerbec

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednik: prof. dr. Romana MARINŠEK-LOGAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

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

Datum zagovora: 2. 9. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostava do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Alenka MIRNIK

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Dn
DK	UDK 616-097:577.27.083(043)=163.6
KG	imunoglobulini/imunoglobilini razreda Y/protitelesa/encimskoimunski test/ receptor Fc
AV	MIRNIK, Alenka
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	2015
IN	IDENTIFIKACIJA RECEPTORJA ZA PRENOS MOLEKULE IgY IZ KRVI V JAJČNI RUMENJAK
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 45 str., 6 pregl., 14 sl., 36 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	IgY so imunoglobulini, ki se nahajajo v serumu in rumenjaku ptic, plazilcev in dvoživk. Pri pticah in plazilcih se IgY iz krvi matere prenesejo najprej v jajčni rumenjaki, v pozni fazi embrionalnega razvoja pa nato skozi membrano jajčnega folikla še v kri zarodka. Receptor, ki omogoča prenos IgY iz jajčnega folikla v zarodkov krvni obtok je FcRY in ima podobne lastnosti vezave, ki je odvisna od pH, kot sesalski FcRn. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti kateri protein v membrani jajčnega folikla veže kokošje Ig razreda Y. Iz jajčnega folikla kokoši smo s setom že pripravljenih kemikalij izolirali kokošje Ig razreda Y, jih razgradili s papainom nato pa z imunoafiniteno kromatografijo in HPLC kromatografijo ločili posamezne fragmente IgY. Prisotnost posameznih komponent molekule IgY v frakcijah smo preverjali s posrednim encimskoimunskim testom. Membrano zrelega jajčnega folikla kokoši smo lizirali in proteine ločili z NaDS-PAGE. Z western blot analizo in encimskoimunskim testom smo ugotovili, da dva proteina vežeta Fc del IgY, ter da je vezava odvisna od pH. Večji protein ima molekulsko maso okrog 180 kDa in je najverjetneje že dokazan receptor FcRY. Drugi je manjši z molekulsko maso okrog 85 kDa. Za oba je značilno, da vežeta IgY pri pH 6, pri pH 8 pa ne.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

- DD Dn
- DC UDC 616-097:577.27.083(043)=163.6
- CX immunoglobulins/immunoglobulins of the Y class/antibodies/immunoassay/  
Fc receptor
- AU MIRNIK, Alenka
- 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 2015
- TI IDENTIFICATION OF THE RECEPTOR WHICH TRANSFERS CHICKEN IgY  
INTO THE CHICKEN EGG YOLK
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 45 p., 6 tab., 14 fig., 36 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB IgY are serum immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians. In birds and reptiles is IgY first transferred from mother to the egg yolk and at the late phase of embryogeny through the yolk sac membrane into the embryo's blood. Transfer of IgY from chicken egg yolk to embryo enables receptor FcRY, that has similar characteristics of pH binding as mammalian FcRn. The aim of graduation thesis was to determine the proteins in chicken follicular membrane that bind IgY. We isolated chicken IgY from egg yolk with a set of already prepared chemicals and digested it with papain. We separated different fragments with immunoaffinity chromatography and HPLC chromatography and tested their presence in separate fractions with indirect immunoassay. We lysed chicken yolk sac membrane and separated proteins with NaDS-PAGE electrophoresis with western blot analysis and immunoassay. We determined two receptors, that bind Fc part of IgY pH dependently. Larger protein of about 180 kDa is probably previously determined FcRY receptor. The other is a protein of 85 kDa. They both bind IgY at pH 6 but not at pH 8.

**KAZALO VSEBINE**

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
	KAZALO VSEBINE.....	V
	KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
	KAZALO SLIK.....	VIII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN DELA .....	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1	IMUNSKI SISTEM IN PROTITELESA .....	3
2.1.1	Zorenje limfocitov B pri pticah .....	4
2.1.2	IgG in IgY .....	6
2.1.3	Podenote protiteles.....	7
2.2	RECEPTORJI ZA Fc REGIJO .....	9
2.2.1	FcRn .....	10
2.2.2	FcRY .....	12
2.2.2.1	Zgradba FcRY .....	13
2.2.2.2	Mehanizem vezave IgY na FcRY.....	15
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>16</b>
3.1	PRIPRAVA PROTEINOV JAJČNEGA FOLIKLA KOKOŠI.....	16
3.1.1	Priprava lizata membrane jajčnega folikla kokoši.....	16
3.1.2	Elektroforeza.....	17
3.1.3	Prenos proteinov iz gela na membrano .....	18
3.2	PRIPRAVA DETEKCIJSKEGA REAGENTA ZA FcRY .....	19
3.2.1	Izolacija kokošnjih IgY iz rumenjaka kokoši.....	19
3.2.1.1	Preverjanje uspešnosti izolacije kokošnjih IgY z DIBA .....	20

<b>3.2.2</b>	<b>Razgradnja kokošnjih IgY s papainom .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Izolacija Fc fragmenta kokošnjih IgY.....</b>	<b>22</b>
3.2.3.1	Imunoafinitetna CNBr kromatografija .....	22
3.2.3.1.1	Preverjanje uspešnosti CNBr kromatografije z DIBA.....	24
3.2.3.2	HPLC kromatografija .....	26
3.2.3.2.1	Preverjanje uspešnosti HPLC kromatografije z DIBA.....	26
3.3	DETEKCIJA Fc RECEPTORJA ZA KOKOŠJE IgY.....	27
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
4.1	USPEŠNOST IZOLACIJE KOKOŠJIH IgY IZ JAJČNEGA RUMENJAKA	29
4.2	USPEŠNOST PRIPRAVE Fc FRAGMENTOV KOKOŠJIH IgY .....	30
<b>4.2.1</b>	<b>Testiranje frakcij na prisotnost protiteles po CNBr kromatografiji .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Izolacija Fc fragmentov s HPLC kromatografijo.....</b>	<b>32</b>
4.2.2.1	Testiranje frakcij na prisotnost protiteles po HPLC kromatografiji .....	33
4.3	IDENTIFIKACIJA Fc RECEPTORJA ZA KOKOŠJE IgY V LIZATU.....	35
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>37</b>
5.1	RAZPRAVA.....	37
5.2	SKLEPI.....	40
<b>6</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>42</b>

**ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primarna mišja mAb proti kokošnjim IgY, ki smo jih uporabili pri testu DIBA.....	25
Preglednica 2: Shema encimskoimunskih testov za identifikacijo FcRY v lizatu membrane jajčnega folikla.....	27
Preglednica 3: Pričakovani rezultati testa DIBA po CNBr kromatografiji. ....	30
Preglednica 4: Rezultati preverjanja uspešnosti ločitve Fab in Fc fragmentov (ločenih s HPLC kromatografijo) s posrednim encimskoimunskim testom.....	33
Preglednica 5: Rezultati preverjanja delovanja konjugata A 3673 z vezavo na mišja mAb CH31, 4E4/G11, 1F5/3G2 z neposrednim encimskoimunskim testom.....	34
Preglednica 6: Rezultati preverjanja delovanja konjugata A 3673 z vezavo na protitelesa različnih razredčin frakcij 3 in 4 z neposrednim encimskoimunskim testom.....	34

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Razvoj Fabricijeve burse (Aliahmad in sod., 2005).....	5
Slika 2: Primerjava zgradb IgG in IgY (Suzuki in Lee, 2004; Tini in sod., 2002).....	6
Slika 3: Encimska razgradnja protitelesa s papainom in pepsinom (Papain- Enzyme..., 2007; Vozelj, 2000) .....	8
Slika 4: Mehanizem prenosa IgG preko posteljice in črevesne sluznice z FcRn, ki je odvisen od pH (Simister in Story, 1997).....	11
Slika 5: Mehanizem prenosa in homeostaze IgG v serumu s pomočjo FcRn (Kacskovics, 2004; Simister in Story, 1997).....	12
Slika 6: Shema strukture FcRn, MHC razreda I, FcRY in PLA2R (West in sod., 2004) .....	13
Slika 7: Shema gradnikov FcRY in njihova sposobnosti vezave IgY (West in sod., 2004). .....	14
Slika 8: Mehanizem spremembe konformacije molekule FcRY, ki je odvisna od pH (West in sod., 2004) .....	15
Slika 9: Shema neposrednega encimskoimunskega testa.....	20
Slika 10: Shema posrednega encimskoimunskega testa.....	24
Slika 11: Rezultat testa DIBA za kokošje IgY, izolirane iz jajčnega rumenjaka .....	29
Slika 12: Rezultati testa DIBA za frakciji 13 in 17, pridobljenih s CNBr kromatografijo. ....	31
Slika 13: Elucijski profil po HPLC kromatografiji .....	32
Slika 14: Profil proteinov membrane jajčnega folikla kokoši na PVDF membrani in identifikacija Fc receptorja, katerega vezava na IgY je odvisna od pH.....	35



**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

ch IgY	imunoglobulin razreda Y pri kokoši
CNBr	cianogen bromid
CTLD	lektinom podobna domena C- tipa
C $\gamma$	konstantna domena težke verige imunoglobulina razreda G
C $\nu$	konstantna domena težke verige imunoglobulina razreda Y
DEAE	kromatografska kolona z anionskim nosilcem ( <u>D</u> iethyl <u>a</u> mino <u>e</u> thyl exchanger)
DIBA	encimskoimunski test ( <u>D</u> ot <u>I</u> mmunobinding <u>A</u> ssay)
EBP	pufer za prenos proteinov iz gela na membrano ( <u>E</u> lektro <u>b</u> loting <u>P</u> ufer)
EDTA	etilen diamin tetrocetan
Fab	podenota imunoglobulina sestavljena iz dela težke in celotne lahke verige, ki veže antigen ( <u>F</u> ragment <u>A</u> ntigen <u>B</u> inding)
Fc	podenota imunoglobulina sestavljena iz konstantnih domen obeh težkih verig ( <u>F</u> ragment <u>C</u> rystallizable region)
Fc IgY	Fc podenota imunoglobulina razreda Y
FcR	receptor za Fc del imunoglobulinov
FcRn	neonatalni prenašalec za imunoglobulin razreda G
FcRY	prenašalec za imunoglobulin razreda Y
HPLC	tekočinska kromatografija z visoko ločljivostjo ( <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
Ig	imunoglobulin, protitelo
IgG	imunoglobulin razreda G
IgM	imunoglobulin razreda M
IgY	imunoglobulin razreda Y
kDa	kilodalton, enota za molekulsko maso
L $\nu$	lahka veriga imunoglobulina
mAb	monoklonsko protitelo ( <u>M</u> onoclonal <u>A</u> ntib <u>o</u> dy)
MHC	poglavitni sistem tkivne skladnosti ( <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex)
pIgAR	poli IgA receptor
PLA $_2$	sekretorna fosfolipaza A $_2$
PLA $_2$ R	receptor za sekretorno fosfolipazo A $_2$
PBS	fosfatni pufer ( <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> olution)
NaDS-PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom
sIg	protitelo vezano na površini celice
T-PBS	fosfatni pufer s Tween-om
T $\nu$	težka veriga imunoglobulina
V $_H$	variabilna regija težke verige IgG (ali IgY)
V $_L$	variabilna regija lahke verige IgG (ali IgY)

## 1 UVOD

Imunoglobulini razreda Y (IgY) so imunoglobulini (Ig), ki se nahajajo v serumu in v jajčnem rumenjaku ptic, plazilcev in dvoživk. IgY je homolog sesalskim imunoglobulinom razreda G (IgG) z malo drugačnimi lastnostmi. V primerjavi s sesalskim IgG je IgY zaradi svojih biokemijskih lastnosti in enostavne produkcije *in vivo* včasih celo bolj uporaben v diagnostiki, zdravljenju in raziskavah (Narat, 2003). Kokoši zaradi evolucijske oddaljenosti omogočajo boljši imunski odziv na konzervirane sesalčje antigene. Poleg tega je zbiranje in shranjevanje jajc neinvazivna in poceni metoda pridobivanja protiteles (Zhang, 2003).

Prenos imunoglobulinov iz matere na zarodek je lastnost mnogih vretenčarjev (Brambell, 1970). Pri sesalcih se imunoglobulini prenašajo prenatalno v maternici ali po porodu z zaužitim materinim mlekom. V obeh primerih se IgG transcitotično prenesejo preko celične bariere s pomočjo neonatalnega Fc receptorja (FcRn), ki veže Fc del IgG (Ghetie in Ward, 2000). Prvi FcRn so bili izolirani in okarakterizirani iz tankega črevesa mladičev, membrane jajčnega folikla zarodka, mlečnih žlez ter endotelija dihalnega trakta (Simister in Mostov, 1989; Spiekerman in sod., 2002). Pri ljudeh se glavni FcRn posredovan transport IgG vrši preko posteljice.

Sesalski FcRn je heterodimer z dvema polipeptidnima verigama: membransko vezana težka veriga je homologna težkim verigam molekul poglobitnega sistema tkivne skladnosti razreda I (MHC) in peptidne verige,  $\beta_2$ -mikroglobulina, ki je homologna lahkim verigam MHC razreda I (Simister in Mostov, 1989). Biokemijske študije vezave na membrano so pokazale, da je vezava IgG na FcRn odvisna od pH. Pri pH 6 FcRn močno veže IgG, pri pH 7,4 ali več pa vezave ni (Ghetie in Ward, 2000).

Ptice in nekateri plazilci akumulirajo IgY v jajčnem rumenjaku. Od tukaj se prenese preko membrane jajčnega folikla v kri razvijajočega se zarodka (Kowalczyk in sod., 1985). Protein, ki je odgovoren za ta prenos IgY, ima podobne lastnosti vezanja kot sesalski FcRn. Imenujemo ga FcRY (West in sod., 2004).

## 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil določiti molekule v membrani jajčnega folikla kokoši, ki vežejo kokošje imunoglobuline razreda Y (ch IgY). Glede na objavljene rezultate smo domnevali, da se v membrani jajčnega folikla nahajajo specifični receptorji, ki prenašajo IgY iz krvi v jajčni rumenjak. Prav tako smo domnevali, da je ta transport odvisen od pH. Domnevali smo, da bomo uspešno lizirali membrano jajčnega folikla kokoši in proteine iz lizata ločili s pomočjo enodimenzionalne poliakrilamidne elektroforeze z natrijevim dodecil sulfatom (NaDS-PAGE). Nadalje smo domnevali, da bomo z imunoblot metodo lahko ugotovili, na katere od teh proteinov in pri kakšnih pogojih (predvsem pri kakšni pH vrednosti) se veže IgY oziroma njegov Fc fragment.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 IMUNSKI SISTEM IN PROTITELESA

Imunski sistem predstavlja različne obrambne mehanizme pred vdirajočimi tujimi snovmi ali mikroorganizmi. Nekateri od teh mehanizmov so pridobljeni in specifični, drugi so prirojeni (naravni) in nespecifični.

Prva in takojšna obramba gostitelja proti mikroorganizmom je prirojena in nespecifična imunost, ki vključuje telesne pregrade, nespecifične baktericidne snovi, fagocitozo, aktivacijo komplementnega sistema. Nasprotno pa mehanizmi pridobljene imunosti specifično prepoznajo in odstranijo tuje snovi ali mikroorganizme. Dodatno se deli na humoralno in celično posredovano imunost. Za humoralno imunost, kjer imajo glavno vlogo celice B, je značilno pojavljanje protiteles, ki specifično spoznajo in odstranijo antigene. Celično posredovano imunost posredujejo limfociti T. Limfociti B in limfociti T pa ne delujejo neodvisno drug od drugih. Pri stiku z antigenom mora priti do učinkovitih interakcij med antigen predstavitvenimi celicami, limfociti B in limfociti T. Normalen imunski odziv je kompleksen splet interakcij med antigen predstavitvenimi celicami, limfociti B in limfociti T, ki se kažejo v prepoznavanju in odstranitvi antigena (Likar, 1985; Vozelj, 2000).

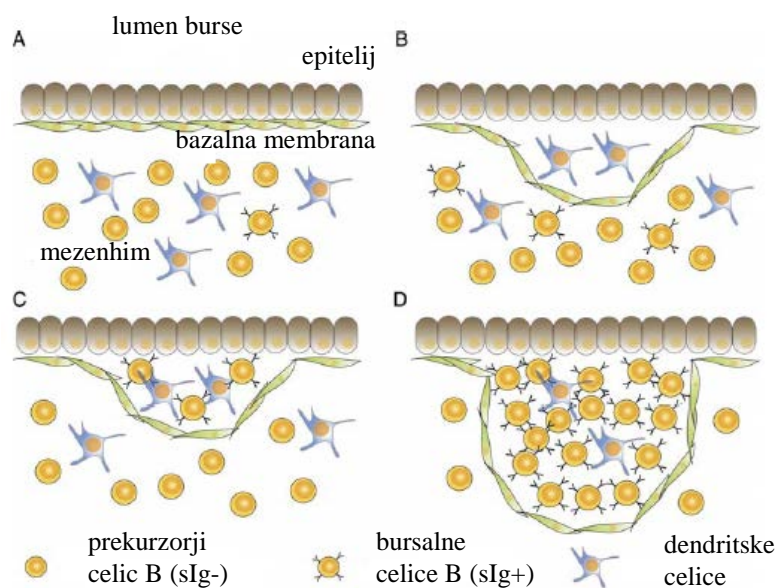
Razvoj limfocitov B obsega od antigena neodvisno zorenje v kostnem mozgu in od antigena odvisno aktivacijo in diferenciacijo zrelih celic B v perifernih limfatičnih organih, pri čemer nastajajo plazmatke, ki izločajo protitelesa in spominske celice B. Limfociti B pred rojstvom nastajajo najprej v jajčnem foliklu, kasneje v jetrih razvijajočega se ploda in končno v kostnem mozgu, kjer nastajajo tudi po rojstvu. Razvijejo se iz matične celice, usmerjene v B-celično vrsto, ki pa še ne izdeluje protiteles. To prvo celico B imenujemo progenični limfocit B. Predhodne celice B izražajo membranski imunoglobulin, sestavljen iz težke verige  $\mu$  in surogatne lahke verige. Po stadiju predhodne celice B sledijo spremembe v prepisu RNA težke verige, ki privedejo do sinteze membranskega IgM in IgD v zreli celici B. Zreli, naivni limfociti B potujejo v sekundarne ali periferne limfatične

organe in tkiva (bezgavke, vranica, limfatična tkiva sluznic, imunski sistem kože), kjer se z antigeni aktivirajo. Ko vdre antigen v telo, izbere celico z najustreznejšim receptorjem, se z njo veže in jo spodbudi k mitotskemu razmnoževanju, kar pripelje do nastanka klona spominskih in efektorskih celic. Vse celice v nastalem klonu so enake in imajo istovetne specifične receptorje za antigensko determinanto, ki so drugačni od receptorjev na celicah drugih klonov. Celoten proces, v katerem antigen povzroči ekspanzijo specifičnega klona limfocitov, imenujemo klonska selekcija (Likar, 1985; Vozelj, 2000; Ihan, 2002).

### **2.1.1 Zorenje limfocitov B pri pticah**

Pri pticah je rast in diferenciacija limfocitov B nekoliko drugačna kot pri sesalcih. Limfociti B nastajajo v limfatičnem organu, imenovanem Fabricijeva bursa. Ta se nahaja ob kloaki in ima glede razvoja limfocitov B enako vlogo kot kostni mozeg pri sesalcih. Med embrionalnim razvojem v mezenhimu burse prihaja pri zorenju limfocitov B do preureditev genov za imunoglobuline (Sayegh in sod., 1999).

Pri pticah se razvoj limfocitov B začne v hematopoetskih tkivih (slika 1), kjer se prekursorji usmerijo v B celično linijo z razvojem površinskih Ig in njihove preureditve genov za lahke in težke verige. Fabricijeva bursa predstavlja selektivno mikro okolje v katerem celice B, ki na svoji površini izražajo protitelesa (sIg), potujejo iz mezenhima preko bazalne membrane v folikle razvijajoče se burse, kjer z mitotsko delitvijo nastanejo oligokloni. Tiste celice B, ki ne izražajo sIg, se ne delijo in so odstranjene med embrionalnim razvojem. Ta faza predstavlja prvo kontrolno točko oz. negativno selekcijo pri razvoju limfocitov B v bursalnih foliklih (Sayegh in sod., 1999; Aliahmad in sod., 2005).

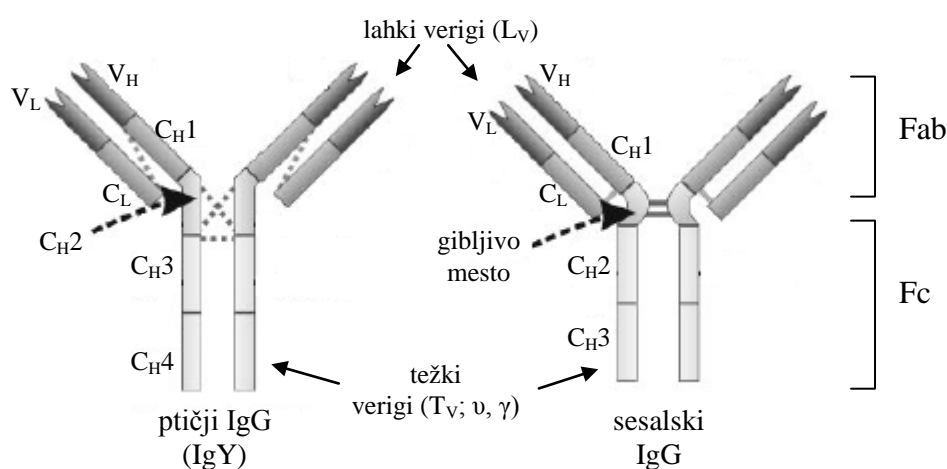


**Slika 1:** Razvoj Fabricijeve burse (Aliahmad in sod., 2005). **(A)** Mezenhim burse najprej kolonizirajo velike bazofilne dendritske celice in prekurzorji limfocitov B. **(B)** Prve celice, ki prehajajo skozi bazalno membrano in tvorijo folikel so dendritske celice. **(C)** Vsak folikel kolonizirata dva do trije limfociti B s sIg. Samo limfociti B, ki na svoji površini izražajo Ig, preidejo v folikel burse. **(D)** Mitotska delitev limfocitov B s sIg.

Po izvalitvi jajc potujejo limfociti B iz burse v periferna tkiva, kjer se odzovejo na zunanje antigene, folikli burse pa prehajajo skozi številne strukturne spremembe, ki vodijo v zakrnelost tega organa. Epitelne celice, ki so med folikli in lumnem burse, se spremenijo v tkivo, ki je odgovorno za pinocitozo in transport komponent lumna burse v limfoidne folikle. Nekatere celice B pa iz foliklov burse migrirajo nazaj preko bazalne membrane, kjer tvorijo zunanjo skorjo hitro delečih se celic B (Sayegh in sod., 1999; Aliahmad in sod., 2005).

### 2.1.2 IgG in IgY

IgG so najštevilčnejše zastopana protitelesa v normalnem humanem serumu, kjer jih je okoli 70 % izmed vseh Ig. Osnovno enoto IgG sestavljata dve lahki in dve težki verigi  $\gamma$  (slika 2). Vsaka molekula ima dve vezišči za antigen (Fab) in konstantni del molekule (Fc). Mesto, kjer sta Fab fragmenta pritrjena na Fc fragment je gibljivo in omogoča, da se kot med Fab fragmentoma lahko spreminja od 0 do 180 ° (Vozelj, 2000).



**Slika 2:** Primerjava zgradb IgG in IgY (Tini in sod., 2002). Težka veriga IgY vsebuje 5 domen:  $V_H$  (variabilna regija),  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$  (konstantne regije). Domene lahkih verig so označene z  $V_L$  (variabilna regija) in  $C_L$  (konstantna regija). Za razliko od ptičjih IgY težke verige sesalskih IgG sestavljajo 4 domene;  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  in  $C_{H3}$  (Suzuki in Lee, 2004).

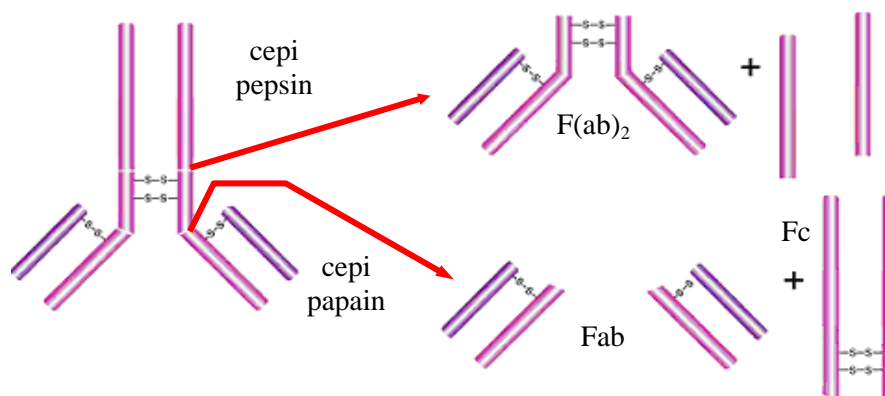
Tako kot človek so tudi ptice s protitelesi razvile učinkovito obrambo pred različnimi okužbami. Pri pticah se protitelesa iz krvi prenesejo v jajčni rumenjaki, kjer predstavljajo pasivno zaščito razvijajočemu se zarodku (Tini in sod., 2002).

IgG pri pticah označujemo z IgY in je homolog sesalskemu imunoglobulinu razreda G. Osnovna struktura molekule IgY je enaka kakor pri sesalskemu IgG (slika 2). Sestavljata jo dve težki verigi ( $T_v$ ) z molekulsko maso 67-70 kDa in dve lahki verigi ( $L_v$ ) z molekulsko maso okrog 20 kDa. Molekulska masa celotne molekule IgY znaša okrog 180 kDa. Glavna razlika med IgY in IgG molekulama je v številu konstantnih regij (Fc). Težke verige molekul IgY imajo 4 konstantne regije ( $C_v1 - C_v4$ ), IgG pa le 3 konstantne regije ( $C_\gamma1 - C_\gamma3$ ) in posledično nižjo molekulsko maso (150 kDa). Primerjava C- regije pri IgG in IgY je pokazala, da sta domeni  $C_\gamma2$ ,  $C_\gamma3$  IgG sorodni domenam  $C_v3$  in  $C_v4$  IgY, medtem ko ekvivalentna domeni  $C_v2$  v molekuli IgG ni. Razlog za manjkajočo domeno v IgG je najverjetneje kondenzacija te verige v pregibno regijo, ki je značilna samo za IgG sesalcev. Tudi IgY je zaradi prolinskih in glicinskih ostankov v regiji med  $C_v1$ - $C_v2$  in  $C_v2$ - $C_v3$  gibljiv, vendar je gibanje omejeno. Molekula IgY ima izoelektrično točko med pH 5,7 in 7,6 in je v primerjavi z IgG hidrofobnejša (Narat, 2003; Warr in sod., 1995; Tini in sod., 2002; Suzuki in Lee, 2004).

### 2.1.3 Podenote protiteles

Če molekulo IgG izpostavimo delovanju različnih proteaz, dobimo fragmente z različnimi lastnostmi. Pri cepljenju s papainom (slika 3) dobimo tri podenote: dve Fab podenoti in Fc podenoto. Nobena od teh podenot ne deluje več kot celotno protitelo, vendar pa še vedno ohranja določene lastnosti. Fab fragment ima vezišče za antigen, medtem ko Fc fragment nima možnosti vezave antigena, ima pa druge pomembne biološke vloge, npr. vezanje komplementa, vezanje na celice idr. Pri podaljšanem razkroju s papainom nastane poleg Fab fragmenta





**Slika 3:** Encimska razgradnja protitelesa s papainom in pepsinom (Papain- Enzyme..., 2007). Papain cepi IgG pod disulfidnimi povezavami v gibljivem mestu, tako da dobimo tri fragmente: dva Fab in en Fc. Pri razgradnji s pepsinom, ki cepi nad disulfidnimi povezavami, pa dobimo  $F(ab)_2$  fragment (Vozelj, 2000).

Pri razgradnji IgY s papainom, ki sta jo opisala Suzuki in Lee v svojem članku iz leta 2004, so podatki o velikosti cele molekule IgY in Fab podenote primerljivi z že opisanimi vrednostmi. Fc fragmenti so se po NaDS-PAGE v reducirajočih pogojih pokazali kot ena ostra proga, v nereducirajočih pogojih pa kot tri proge, ki so se vse obarvale s protitelesi, specifičnimi za Fc del IgY. Drugačna mobilnost treh Fc fragmentov je posledica delne redukcije disulfidnih vezi in/ali alternativnega cepljenja IgY s papainom (Suzuki in Lee, 2004).

## 2.2 RECEPTORJI ZA Fc REGIJO

Protitelesna imunost je najpomembnejši zaščitni specifični imunski odziv na zunajcelične patogene. IgG nastaja pri naravni okužbi ali po imunizaciji z virusi, bakterijami ali njihovimi produkti, kjer pospešuje njihovo fagocitozo. Zato je njegov transport preko celic na mesto vnetja ključnega pomena za učinkovit imunski odziv. Imunoglobulini se preko membran prenašajo z vezavo Fc dela imunoglobulina na njihove receptorje, imenovane Fc receptorji (Vozelj, 2000).

Receptorji za Fc regijo imunoglobulinov (FcR) so površinske molekule na efektorskih in epiteljskih celicah. Delimo jih v dva razreda, pri čemer vsak predstavnik iz posameznega razreda prepozna imunoglobulin enega izotipa ali nekaj ozko sorodnih izotipov. Prvi razred receptorjev najdemo na površinah efektorskih celic (eozinofilci, mastociti, naravne celice ubijalke) in sprožijo različne odgovore kot posledico vezanja antigena na protitelo (fagocitoza, od protiteles odvisna celična citoksičnost, sproščanje citokinov in drugih mediatorjev vnetja). Mednje uvrščamo Fc receptorje, ki vežejo IgG (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII in goveji Fc $\gamma$ 2R), IgE (Fc $\epsilon$ RI, Fc $\epsilon$ RII) in IgA (Fc $\alpha$ RI). Ti receptorji so izraženi na vseh hematopoetskih celicah in omogočajo ključno povezavo med humoralno in celično imunostjo. V drugi razred receptorjev uvrščamo poli IgA receptor in FcRn, ki sta odgovorna za transport imunoglobulinov skozi epiteljske celice. Po zgradbi vsi FcR spadajo v imunoglobulinsko superdružino, razen Fc $\epsilon$ RII, ki je soroden C-tipu lektinov (Ravetch, 1997; Kacs Kovics, 2004).

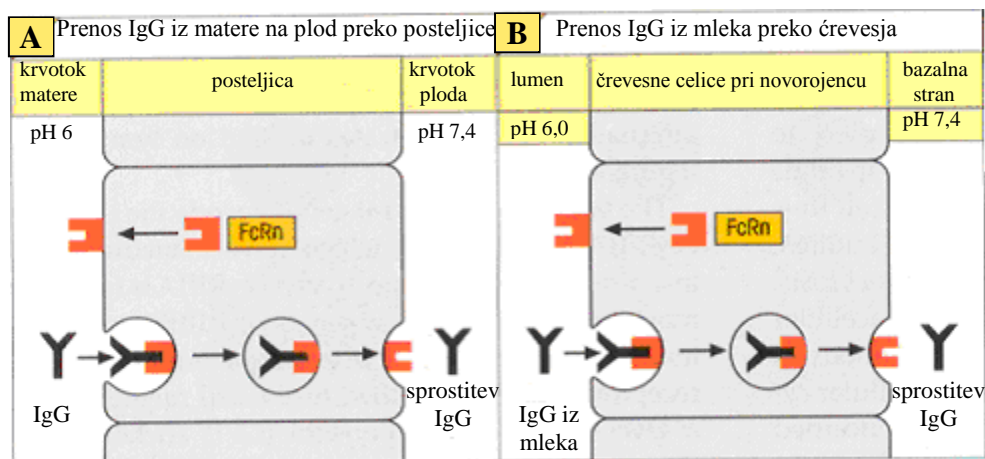
### 2.2.1 FcRn

Molekula FcRn veže IgG v dveh pomembnih fizioloških procesih: prenos IgG iz matere na plod/otroka ter uravnavanje količine serumskega IgG v času celotnega življenja odrasle živali (Vaughn in Bjorkman, 1997).

Receptor FcRn je strukturno podoben molekulam MHC razreda I (slika 6) in je sestavljen iz transmembranske polipeptidne verige, homologne težkim verigam molekul MHC razreda I in peptidne verige,  $\beta_2$ -mikroglobulin, homologne lahkim verigam MHC razreda I (West in Bjorkman, 2000).

IgG se iz matere na plod začne prenašati preko posteljice že v 12. tednu nosečnosti. Med 22. in 26. tednom nosečnosti koncentracija IgG v krvi zarodka močno naraste in je v času rojstva, predvsem koncentracija IgG3 ter IgG4, enaka kot pri materi (Dancis in sod., 1961; Gitlin in Biasucci, 1969; Wang in sod., 1970).

Prenos imunoglobulinov iz matere na plod z FcRn je odvisna od pH (slika 4). IgG se prenese skozi scintiotrofoblast posteljice in kapilarni endotelij ploda. Vezava je najmočnejša pri pH 6, ne veže se pa več pri pH vrednostih enakih ali večjih od 7,5. Ker je pH materine krvi in posledično posteljice okoli 7, se IgG ne more vezati na membrano scintiotrofoblasta. Na apikalni strani membrane so vezikli z FcRn, v katerih je kisel pH. Imunoglobulini se tako prenesejo preko tkiv posteljice z endocitotskimi vezikli (Vaughn in Bjorkman, 1998).

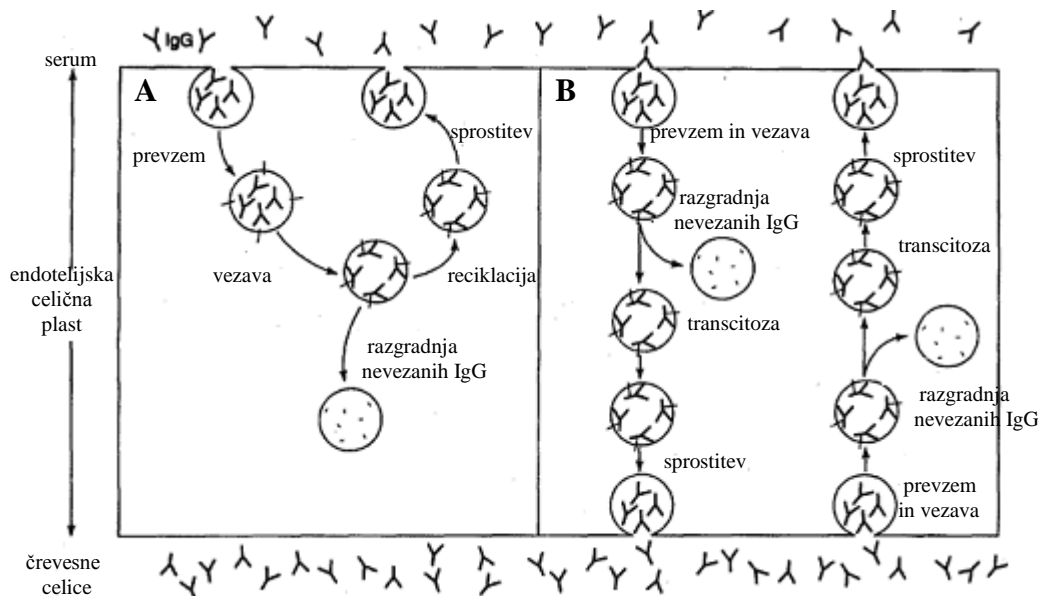


**Slika 4:** Mehanizem prenosa IgG preko posteljice in črevesne sluznice z FcRn, ki je odvisen od pH (Simister in Story, 1997). **(A)** Prikaz prenosa IgG z FcRn iz matere na plod preko posteljice. **(B)** Prikaz prenosa IgG z FcRn iz mleka preko črevesne sluznice novorojenih glodalcev.

FcRn se izraža pri človeku tudi v jetrih, mlečnih žlezah, črevesju, ledvicah in pljučih, kjer naj bi tudi ta tkiva oskrboval z IgG (Ghetie in Ward, 2000).

Pri glodalcih se prenos imunoglobulinov vrši predvsem po porodu (slika 4), s pomočjo FcRn posredovanega transporta materinih IgG v zaužitem kolostrumu in mleku, preko sluznice tankega črevesa novorojenih glodalcev (West in Bjorkman, 2000). FcRn so prav tako našli v mlečnih žlezah miši, kar kaže tudi na regulacijsko vlogo FcRn pri prenosu IgG v mleko (Kacs Kovics, 2004).

Poleg prenosa imunoglobulinov v pre- in postnatalnem obdobju FcRn uravnava tudi količino IgG v različnih delih telesa (slika 5). FcRn ščiti IgG pred lizosomsko razgradnjo v serumu in omogoča prenos preko različnih celičnih barrier (npr. pljučni epitelij) (Ghetie in Ward, 2000).



**Slika 5:** Mehanizem prenosa in homeostaze IgG v serumu s pomočjo FcRn (Simister in Story, 1997). **(A)** Prikaz prevzema, recikliranja in razgradnje IgG iz seruma. Endotelijske celice z endocitozo najprej prevzamejo IgG iz seruma. Vezikli z FcRn vežejo IgG in jih reciklirajo nazaj v serum. Tisti IgG, ki se niso vezali na FcRn, vstopijo v lizosomalno pot in so razgrajeni. **(B)** Prikaz prevzema in transcitoze IgG iz seruma v lumen črevesnih celic ter obratno. IgG, ki so vezani na FcRn se prenesejo skozi epitelijsko celično steno. IgG, ki niso vezani na FcRn se razgradijo (Kacskovics, 2004).

### 2.2.2 FcRY

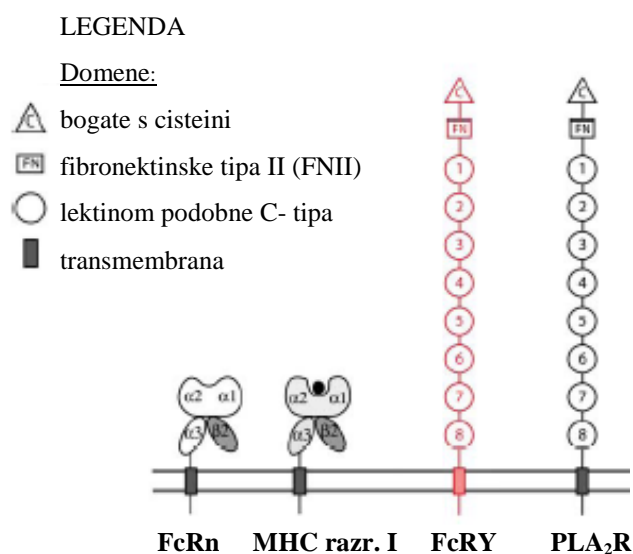
Prenos imunoglobulinov iz matere na plod ni omejen samo na sesalce. Pri pticah in plazilcih se IgY iz krvi matere prenese najprej v jajčni folikel, nato pa še skozi membrano jajčnega folikla v kri zarodka. Receptor, ki omogoča prenos IgY iz odrasle kokoši na plod, je FcRY in ima podobno vlogo kot sesalski FcRn, strukturno pa pripada drugemu tipu receptorja (Ward, 2004).

Obstajata dve poti prenosa IgY iz kokoši v plod. Najprej se IgY iz krvnega obtoka odrasle kokoši akumulira v rumenjaku oocite in se nato okrog 7. dneva inkubacije začne prenašati preko FcRY v kri razvijajočega se zarodka. FcRY specifično veže samo IgY in ne IgG, zato v krvi zarodka najdemo le IgY in ne IgG (West in sod., 2004).

IgY se prenaša skozi membrano jajčnega folikla podobno kot sesalski IgG preko posteljice. Veže se na specifične receptorje na apikalni strani plazemske membrane, kjer je zajet in z endocitozo prenesen na bazolateralno stran celic in sproščen v kri zarodka (Tressler in Roth, 1987).

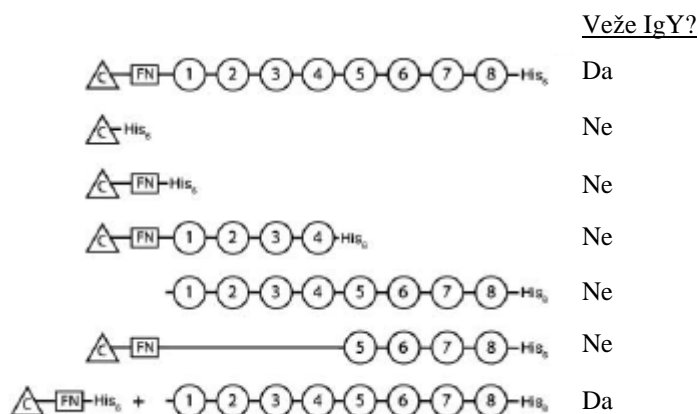
### 2.2.2.1 Zgradba FcRY

Kljub podobni vlogi si FcRY in sesalski FcRn nista strukturno sorodna (slika 6). FcRY (180 kDa) je s 55- odstotnim enakim aminokislinskim zaporedjem homolog sesalskemu sekretornemu receptorju fosfolipaze A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>R), ki veže in omogoča endocitozo fosfolipaze (PLA<sub>2</sub>). PLA<sub>2</sub>R vsebuje ektodomeno, ki je bogata s cisteini, fibronektinske II (FNII) ponovitve in 8 do 10 lektinom podobne domene C-tipa (CTLD) (East in Isacke, 2002).



**Slika 6:** Shema strukture FcRn, MHC razreda I, FcRY in PLA<sub>2</sub>R (West in sod., 2004).

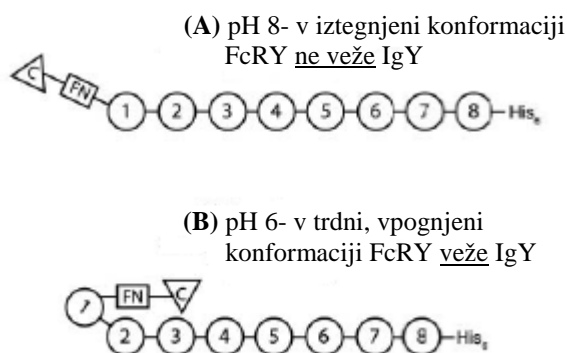
Tako kot PLA<sub>2</sub>R tudi ektodomena FcRY (slika 7) vsebuje s cisteini bogato domeno, tip II fibronektinske ponovitve in osem CTLD domen. V študijah iskanja katera domena FcRY je odgovorna za prepoznavo FcY, so ugotovili, da so to cisteinski ostanki s FNII (CysR-FNII regija) in CTLD1-8. Ti dve regiji sami zase ne vežeta IgY, ampak tvorita kompleks, ki v kislem pH veže IgY (West in sod., 2004).



**Slika 7:** Shema gradnikov FcRY in njihova sposobnosti vezave IgY (West in sod., 2004).

### 2.2.2.2 Mehanizem vezave IgY na FcRY

Membrana jajčnega folikla kokoši ima podobne lastnosti vezave IgY kot vezava IgG na sesalski FcRn. Oba mehanizma vezave sta odvisna od pH (slika 8). IgY se močno veže na FcRY (v razmerju FcRY:IgY=2:1) pri pH 6, medtem ko se pri pH 7,4 in pH 8 ne veže. Vzrok za to sta dve regiji v FcRY, ki se konformacijsko spreminjata pri različnih vrednostih pH. Pri pH 6 se CysR-FNII regija upogne in veže na CTLD1-8, medtem ko je pri pH 8 CysR-FNII regija iztegnjena in tako onemogočena vezava na CTLD1-8 (West in sod., 2004).



**Slika 8:** Mehanizem spremembe konformacije molekule FcRY, ki je odvisna od pH (West in sod., 2004).

(A) FcRY ima pri pH 8 iztegnjeno konformacijo in tako ne more priti do povezave med regijo CysR-FNII in CTLD1-8. (B) Pri pH 6 se CysR-FNII regija upogne in veže na CTLD1-8. Rezultat te povezave je trdna konformacija, ki lahko veže IgY.

Northern blot analize so pokazale, da se FcRY ne nahaja samo v membrani jajčnega folikla, ampak tudi v drugih tkivih kokoši (jetra, jajčnik, jajcevod, vranica) in tako kaže na možno vlogo FcRY pri zaščiti IgY pred katabolizmom (West in sod., 2004).



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA PROTEINOV JAJČNEGA FOLIKLA KOKOŠI

Za dokaz proteinov v membrani jajčnega folikla, ki vežejo kokošji IgY, je bilo potrebno najprej lizirati membrano jajčnega folikla, proteine v lizatu z elektroforezo med seboj ločiti in jih prenesti na membrano.

##### 3.1.1 Priprava lizata membrane jajčnega folikla kokoši

Protokol za pripravo lizata jajčnega folikla kokoši smo delno povzeli po protokolu West in sod. (2004).

Membrano zrelega kokošjega jajčnega folikla smo ločili od rumenjaka in jo večkrat spirali s fosfatnim pufrom (PBS). Membrano smo lizirali najprej s homogenizatorjem v PBS z dodatkom 3 mM raztopine etilen diamintetrocetan (EDTA) in 0,5 µg/mL leupeptina nato pa še z ultra zvokom, 5 ciklov po 30 sekund. Pri tem smo vzorec ves čas hladili z ledom, da bi zmanjšali delovanje proteinaz. Sledilo je centrifugiranje pri 15000 obr/min, 1 h in pri temperaturi 4 °C. Dobljeno vsedlino smo strli v tekočem dušiku, resuspendirali v supernatantu, ki smo ga dobili pri centrifugiranju in vse skupaj ponovno zmleli s homogenizatorjem in ultra zvokom. Sledilo je ponovno centrifugiranje, 15000 obr/min, 1 h, pri temperaturi 4 °C. Usedlino smo nato resuspendirali v 1 mL fosfatnega pufru pH 8 in ponovno homogenizirali. Lizatu jajčnega folikla smo dodali fosfatni pufer z 2 % Triton-X100, 2 mM EDTA in 0,04 % NaN<sub>3</sub>, tako da smo dobili volumen vzorca 2 mL. Lizat smo do uporabe shranili na -20 °C.

### 3.1.2 Elektroforeza

Uporabili smo NaDS-PAGE, s katero ločujemo proteine, hkrati pa jim tudi lahko določimo molekulsko maso. Proteine, ki jih želimo ločiti in jim določiti molekulsko maso, najprej denaturiramo s pomočjo anionskega detergenta natrijevega dodecil sulfata (NaDS). Razvite proteinske molekule vežejo NaDS in dobijo negativen naboj, velikost naboja pa je odvisna od velikosti molekule. Hitrost potovanja je tako odvisna le od velikosti molekul, ker ima večja molekula večji negativni naboj (Sepčić in sod., 2002). NaDS-PAGE smo izvedli tako kot so opisali Benčina in sod. (1999).

#### ▪ Priprava vzorcev

Vzorec je bil nerazredčen lizat membrane jajčnega folikla, kateremu smo dodali nalagalni pufer v razmerju 3:2. Vzorce smo nato segrevali 4 minute pri temperaturi 100 °C. Uporabili smo glavnik z enotnimi stezami, ki ustrezajo 14 stezam navadnega glavnika. Na gel smo tako nanesti skupno 650 µL pripravljenega vzorca.

#### ▪ Proteinski markerji

Na začetek steze gela smo nanesti 50 µL vzorca mešanice standardov za določitev molekulskih mas, ki vsebuje 10 proteinov z razponom molekulskih mas od 10 kDa do 170 kDa (Fermentas, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, # SM0671). Pred nanašanjem jih ni bilo potrebno toplotno denaturirati.

#### ▪ Elektroforetski pogoji

Elektroforezo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Med dve pokončni stekleni plošči smo vlili 10 % ločevalni gel, ga prekrili z n-butanolom, nasičenim z vodo, in počakali da je gel popolnoma polimeriziral. Pred nanosom 4 % nabijalnega gela smo odlili n- butanol in ločevalni gel dobro sprali z destilirano vodo, ga obrisali in posušili. Še v nestrjen 4 % nabijalni gel smo vstavili glavnik z enotnimi stezami, odstranili mehurčke, ki so morebiti nastali ob vstavitvi glavnika in pustili da se je strdil. Plošči z geloma smo zaprli s parafilmom in folijo ter čez noč shranili v hladilniku na temperaturi 4 °C. Kot elektroforetski pufer smo uporabili mešanico 250 mM Tris glicinat in 0,1 % NaDS.

Za ločevanje proteinov iz jajčnega folikla smo uporabili naslednje pogoje: ločevanje v 4 % koncentracijskem gelu pri 30 mA, 150 V, 3 ure in ločevanje v ločevalnem gelu pri 60 mA, 300 V, 6 ur (Benčina in sod., 1999).

### **3.1.3 Prenos proteinov iz gela na membrano**

Po končani elektroforezi smo ločene proteine iz gela prenesli na membrano. Tehnika prenosa proteinov temelji na uporabi električnega toka, ki povzroči prehod ločenih makromolekul iz gela na površino posebnih membran, ki vežejo prenesene molekule (Sepčić in sod., 2002).

Metodo za prenos proteinov iz poliakrilamidnega gela na polivinil difluoridno (PVDF) membrano (Immobilon-P Transfer Membrane, Milipore, ZDA) smo izvedli po že opisanem protokolu (Benčina in sod., 1999). Na anodno ploščo smo najprej položili 4 filter papirje enakih dimenzij kot so dimenzije gela. Vse filtre, ki smo jih uporabili, smo predhodno namočili v elektroblotting pufru (EBP), pripravljenem iz 10 mM CAPS (Sigma, ZDA) v 10 % metanolu. Na filtre smo položili PVDF membrano, ki smo jo predhodno aktivirali z nekaj sekundnim namakanjem v 100 % metanolu (Fluka, Nemčija), nato pa jo še namakali v EBP. Membrano smo položili tako, da je bilo lice obrnjeno proti gelu, torej navzgor. Na membrano smo položili gel, namočen za 5 min v EBP pufer. Membrano in gel smo označili na enakih mestih. Na gel smo položili še 4 filter papirje, enakih dimenzij kot gel. Pri nalaganju plasti smo pazili, da smo odstranili morebitne nastale zračne mehurčke, ki bi ovirali prenos proteinov iz gela na membrano. Plasti smo prekrili s katodno ploščo in priklopili na električno napetost. Sam prenos proteinov je tekel 1 uro in pri napetosti, ki smo jo izračunali iz razmerja: površina gela x 0,8 mA.

Po končanem prenosu smo del membrane z markerji in 0,5 cm širok trak prenesenih proteinov našega vzorca pobarvali in tako preverili uspešnost prenosa proteinov. Membrano smo najprej sprali v destilirani vodi, jo za nekaj sekund potopili v 100 % metanol, nato pa barvali nekaj minut v barvilu Coomassie Brilliant blue R-250 (Pharmacia, ZDA). Sledilo je razbarvanje v 50 % metanolu, nato pa še v destilirani vodi.

Preostali del membrane smo namakali 30 minut v 0,5 % TPBS, da smo blokirali nezasedena vezna mesta na membrani, jo posušili, razrezali na 0,5 cm dolge trakove in spravili na temperaturo 4 °C. Tako pripravljeno membrano smo uporabili za encimskoimunske teste, s katerimi smo ugotavljali reakcije z proteini lizata membrane jajčnega folikla kokoši in imunoglobulini.

### 3.2 PRIPRAVA DETEKCIJSKEGA REAGENTA ZA FcRY

Za detekcijo FcRY v membrani jajčnega folikla kokoši smo uporabili kokošji IgY oziroma njegov Fc fragment. Da bi izločili morebitne reakcije med Fab delom kokošjih IgY in molekulami na membrani jajčnega folikla, smo morali pridobiti in uporabiti samo Fc fragment.

#### 3.2.1 Izolacija kokošjih IgY iz rumenjaka kokoši

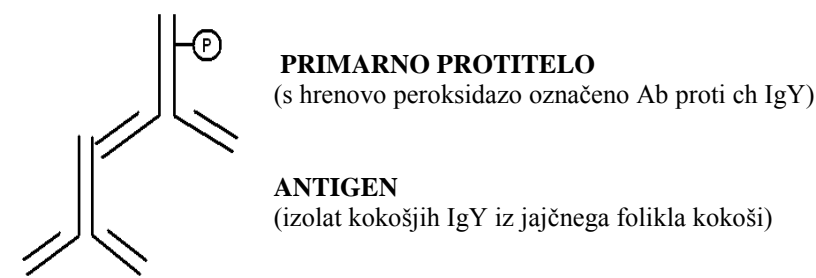
Kokošje IgY smo izolirali iz rumenjaka po enostavnem postopku, priloženemu setu kemikalij GammaYolk<sup>TM</sup> (Pharmacia, ZDA), ki vsebuje 30 mL separacijskega reagenta 1, 15 mL puferske raztopine 2 in 15 mL separacijskega reagenta 3. Izolat smo pozneje uporabili pri encimski razgradnji IgY na Fab in Fc podenote.

Jajčni rumenjak smo ločili od beljaka in pri tem pazili, da nismo poškodovali membrane jajčnega folikla. Ostanek beljaka smo sprali z destilirano vodo. Rumenjaki smo posesali iz jajčnega folikla, izmerili njegov volumen ( $V_0$ ) in dodali  $0,5 \times V_0$  PBS, pH 7,2. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo dodali 1,5 mL separacijskega reagenta 1. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje, pri temperaturi 10 °C in 15000 g. Usedlino smo odstranili, supernatantu z raztopljenimi IgY smo izmerili prostornino ( $V_1$ ) ter dodali enako količino puferske raztopine 2. Raztopino smo dobro premešali, inkubirali 15 minut in ji dodali dvakratno prostornino ( $2 \times V_1$ ) separacijskega reagenta 1. Po 15 minutnem mešanju na magnetnem mešalu smo ponovno centrifugirali 15 minut pri temperaturi 10 °C in 10000 g. Supernatant smo odstranili, usedlino z oborjenimi IgY raztopili v  $V_1$  destilirane vode in pustili 15 minut na sobni temperaturi. Po ponovnem 15 minutnem mešanju na magnetnem

mešalu in 15 minutnem centrifugiranju pri temperaturi 10 °C in 10000 g, smo odstranili supernatant, usedlino z IgY pa raztopili v 1 x PBS, pH 9,1 da smo preprečili obarjanje kokošjih IgY. Končno koncentracijo kokošjih IgY smo izmerili spektrofotometrično pri 280 nm.

### 3.2.1.1 Preverjanje uspešnosti izolacije kokošjih IgY z DIBA

Z **neposrednim encimskoimunskim testom** (DIBA, slika 9) smo preverjali prisotnost kokošjih IgY, izoliranih iz jajčnega rumenjaka (Erhard in sod.,1992). Izolat smo kasneje uporabili pri encimski razgradnji protiteles na Fab in Fc fragmente. Ime testa, DIBA, izhaja iz načina izvedbe, saj antigen naneseemo na membrano s pipeto v obliki pike.



**Slika 9:** Shema neposrednega encimskoimunskega testa. Na nitrocelulozno membrano je vezan antigen-katerakoli proteinska molekula ali protitelo. Antigen specifično prepozna primarno protitelo, ki je konjugirano z encimom peroksidaza. Po dodatku kromogenega substrata (TrueBlue) poteče reakcija in razvije se modra barva.

Test smo izvajali na nitrocelulozni membrani Immobilon PVDF (Millipore, ZDA), na predhodno narisani mreži kvadratov velikosti 0,5 mm<sup>2</sup>. Membrano smo najprej 20 minut namakali v destilirani vodi. Na osušeno membrano smo na vsak kvadratek nanegli po 2 µL razredčin izolata kokošjih IgY iz jajčnega folikla (1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000), pripravljenih v PBS pufri, pH 7,2. Membrano smo inkubirali 40 minut v 0,5 % Tween 20-PBS (TPBS) in s tem blokirali preostala prosta vezna mesta. Sledila je 40 minutna inkubacija v kunčjih protitelesih proti kokošjim IgY, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (Sigma, A 9046, ZDA), redčenih v PBS 1:10000. Membrano smo po inkubaciji spirali

dvakrat po 10 minut v 0,05 % TPBS in enkrat 10 minut v PBS s pH 7,2. Po spiranju smo dodali substrat TrueBlue™ (Kirkegaard & Perry Laboratories, 50-78-02, ZDA), počakali, da se je razvila modra barva, nato pa zaustavili reakcijo z destilirano vodo. Modro obarvanje je dokaz prisotnosti IgY v testiranem vzorcu. Glede na intenziteto in prisotnost obarvanja smo reakcijo opredelili kot: zelo močno +++++, močno +++++, srednje močno +++, manj močno ++, šibko +, negativno -.

### 3.2.2 Razgradnja kokošnjih IgY s papainom

IgY, izolirane iz rumenjaka, kljub dobri rezultatom neposrednega encimskoimunskega testa nismo nadalje uporabili. V izolatu je namreč bilo tudi po dializi veliko ostankov rumenjaka, kar je onemogočilo izvedbo testov. Tako smo za encimsko razgradnjo s papainom uporabili kokošje IgY, predhodno izolirane iz jajčnega rumenjaka z istim setom kemikalij v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete (Biček, 2004).

Izolirane kokošje IgY smo encimsko razgradili na Fab in Fc fragmente po protokolu (Pierce, 20341, ZDA). Za razgradnjo smo uporabili na agarozni gel imobiliziran papain.

#### Raztopine

- pufer za vzorec: 20 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA; pH 7,0
- pufer za razgradnjo: 20 mM cistein-HCl v pufru za vzorec; pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl; pH 7,5

#### ▪ Priprava vzorca IgY in raztopine imobiliziranega papaina

Redčen vzorec kokošnjih IgY smo najprej dializirali proti pufru za vzorec (20 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA; pH 7,0), nato pa koncentrirali do koncentracije 12 mg/mL. To smo preverili s predhodni merjenjem absorbance s spektrofotometrom pri 280 nm. Pri tem smo upoštevali podatek, da vrednost absorbance 1,35 ustreza koncentraciji proteinom 1mg/mL (Harlow in Lane, 1988).

Pufer za razgradnjo smo tik pred uporabo pripravili tako, da smo k pufru za vzorec dodali cistein-HCl v končni koncentraciji 20 mM in uravnali pH na 7,0. Prisotnost cisteina je pomembna za aktivnost encima. V stekleno epruveto smo prenesli 0,5 mL 50 % mešanice gela z imobiliziranim papainom, ki smo jo predhodno dobro premešali. Imobiliziran papain smo nato uravnotežili z dodatkom 4 mL pufra za razgradnjo. Sledilo je centrifugiranje, da smo ločili gel s papainom od pufra. Postopek smo ponovili še enkrat. Gel s papainom smo na koncu resuspendirali v 0,5 mL pufra za razgradnjo.

#### ▪ **Razgradnja**

0,5 mL pripravljene vzorca smo dodali enako količino (0,5 mL) pufra za razgradnjo. Nato smo 1 mL vzorca s pufrom za razgradnjo prenesli v epruveto z imobiliziranim papainom. Sledila je inkubacija prek noči pri temperaturi 37 °C in močnem stresanju. Zjutraj smo encimsko razgradnjo zaustavili z dodatkom 1,5 mL 10 mM Tris-HCl s pH 7,5. Mešanico Fab, Fc fragmentov ter morebiti nerazgrajenih protiteles IgY smo ločili od gela s centrifugiranjem. Usedlino z imobiliziranim papainom smo odstranili, supernatant s fragmenti IgY pa do nadaljne obdelave shranili pri 4 °C.

### **3.2.3 Izolacija Fc fragmenta kokošnjih IgY**

Fragmente kokošnjih IgY, Fab in Fc, smo izolirali z imunoafinitetno kromatografijo na cianogen bromid (CNBr) nosilcu ter s tekočinsko kromatografijo z visoko ločljivostjo (HPLC) z dietil aminoetil sefarozo (DEAE).

#### **3.2.3.1 Imunoafinitetna CNBr kromatografija**

Za ločitev Fc in Fab fragmentov smo izbrali že opisano metodo (Narat, 2003) za izolacijo IgY iz različnih virov (jajčnega rumenjaka, seruma kokoši, supernatanta hibridomov). Na sefarozni nosilec kolone z aktivno skupino CNBr smo vezali mišja mAb 3C10/F6, ki specifično vežejo lahko verigo kokošnjih IgY, in torej prepoznajo epitop v Fab fragmentu IgY. Mišja mAb 3C10/F6 so bila proizvedena v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete (Biček, 2004).

#### Pufri za pripravo imunoafinitetne kolone:

- pufer 1 (za vezavo): 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3 + 0,5 M NaCl
- pufer 2 (za aktivacijo gela): 1 mM HCl, pH 2-3
- pufer 3 (za blokiranje ostalih aktivnih skupin sefaroze): 0,1 M Tris HCl, pH 8,0
- pufer 4 (za spiranje pH 4): 0,1 M acetatni pufer, pH 4,0 + 0,5 M NaCl
- pufer 5 (pufer za spiranje pH 8): 0,1 M Tris HCl, pH 8,0 + 0,5 M NaCl

#### ▪ **Priprava imunoafinitetne kolone: CNBr – aktivirana sefaroza**

Po navodilih (Pharmacia, 71-7086-00, ZDA) iz 1 g suhega gela, na katerega lahko vežemo 5 mL protiteles v priporočeni koncentraciji 5 do 10 mg/mL, dobimo približno 3,5 mL kolone. Pripravili smo 1,7 mL vzorca mišjih mAb 3C10/F6 v pufru 1 s koncentracijo 7 mg/mL.

Izhajajoč iz teh podatkov smo za pripravo 1,2- mililitrske kolone (V) zatehtali 0,34 g suhega gela- s CNBr aktivirana sefaroza B4<sup>®</sup> (Sigma, C-9142, ZDA), ga namakali in spirali na presesalni buči v 100 mL pufru 2 približno 15 minut. Nabrekel in osušen gel smo prenesli v 1,7 mL mišjih mAb 3C10/F6 in suspenzijo prenesli v kolono. Tako pripravljeno kolono smo spirali s 5V (6 mL) pufru 1. Za blokado ostalih aktivnih mest smo kolono spirali z 2V (2,4 mL) pufru 3. Gel smo premešali in ga v tem pufru pustili stati 2 uri pri sobni temperaturi. Sledili so trije cikli spiranja po naslednjem postopku: 5V pufru 4 in 5V pufru 5. Sledilo je spiranje s PBS, pH 8,0 (10V).

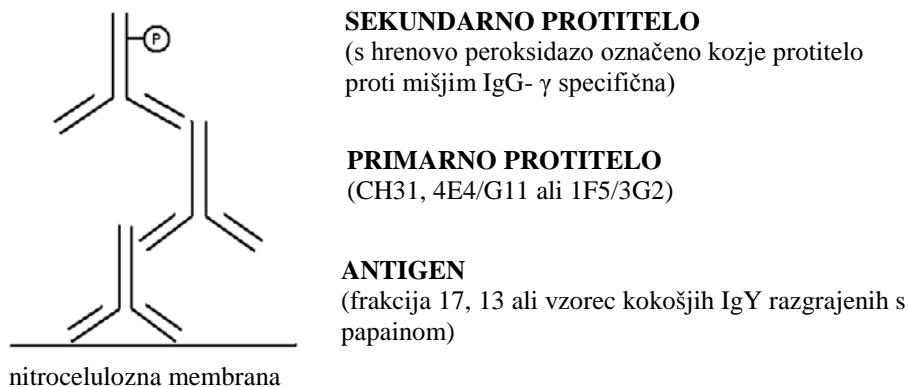
#### ▪ **Izvedba kromatografije**

Na 1,2 mL kolono smo nanesti 1 mL vzorca (skupni volumen 4 mL) razgrajenih kokošjih IgY. Sledilo je spiranje kolone z 10V pufru PBS, pH 8. Frakcije po 1 mL smo začeli pobirati takoj, saj se Fc fragment na kolono ne bi smel vezati. Vezane Fab fragmente IgY smo spirali iz kolone s PBS s padajočim pH: najprej s 3V PBS, pH 3 in nadaljevali s 3V PBS, pH 2,5. Zbranim frakcijam smo dodali razredčen NaOH, da smo popravili pH na vrednost blizu nevtralnemu. Vsem frakcijam smo spektrofotometrično izmerili absorbanco pri 280 nm. Spektrofotometer smo predhodno umerili s pufrom PBS, pH 8,0. Frakciji 13 in 17 sta imeli najvišjo izmerjeno absorbanco, zato smo ju nadalje preverili s posrednim DIBA testom (poglavje 3.2.3.1.1) za vsebnost lahkih in težkih verig.



### 3.2.3.1.1 Preverjanje uspešnosti CNBr kromatografije z DIBA

S **posrednim encimskoimunskim testom** (Erhard in sod.,1992) na nitrocelulozni membrani smo preverili aktivnost protiteles v posameznih frakcijah (13 in 17) ter v vzorcu razgrajenih kokošjih IgY pred kromatografijo (slika 10).



**Slika 10:** Shema posrednega encimskoimunskega testa. Na nitrocelulozno membrano je vezan antigen-katerakoli proteinska molekula ali protitelo. Antigen specifično prepozna primarno protitelo, na katerega se veže sekundarno protitelo, ki je konjugirano z encimom peroksidaza. Po dodatku kromogenega substrata (TrueBlue) poteče reakcija in razvije se modra barva.

Nitrocelulozno membrano (NC-extra, Sartorius) smo namakali 20 minut v destilirani vodi. Še na nepopolno osušene trakove z mrežo kvadratkov velikosti  $0,5 \text{ mm}^2$  smo nanegli po  $2 \mu\text{L}$  vzorca frakcij 17 in 13 ter vzorec kokošjih IgY razgrajenih s papainom, ki smo ga shranili pred nanosom na kromatografsko kolono. To smo storili v treh ponovitvah.

Ko so se vzorci vpili v membrano, smo trakove ob stresanju inkubirali 40 minut pri sobni temperaturi v 0,5 % TPBS (pH 7,2). V naslednji stopnji smo posamezne trakove 40 minut ločeno inkubirali v treh različnih primarnih mišjih mAb proti kokošjim IgY, redčenih s PBS, pH 7,4 (preglednica 1).

**Preglednica 1:** Primarna mišja mAb proti kokošjim IgY, ki smo jih uporabili pri testu DIBA

Oznaka mAb	Specifičnost mAb	Redčitev
CH31	lahka veriga kokošjih IgY (Sigma, C-7910)	1:1000
4E4/G11*	lahka in težka veriga kokošjih IgY (Biček, 2004)	1:10
1F5/3G2*	težka veriga kokošjih IgY; verjetno Fc del (Biček, 2004)	1:10

Opomba: \* mAb so bila proizvedena v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete

Sledilo je spiranje v 0,05 % TPBS trikrat po 10 minut in 40 minutna inkubacija v s peroksidazo vezanimi kozjimi protitelesi proti mišjim IgG-  $\gamma$  (Sigma, A 3673, ZDA), redčenih s PBS, pH 7,2 v razmerju 1:10000. Trakove smo nato spirali še dvakrat po 10 minut v 0,05 % TPBS, pH 7,2 in enkrat v 1 x PBS, pH 7,2. Po spiranju smo dodali substrat TrueBlue™ (Kirkegaard & Perry Laboratories, 50-78-02, ZDA), počakali da se je razvila modra barva nato pa smo reakcijo zaustavili z destilirano vodo. Glede na intenziteto in prisotnost obarvanja smo reakcijo opredelili kot: zelo močno +++++, močno +++++, srednje močno +++, manj močno ++, šibko +, negativno -.

Z neposrednim encimskoimunskim testom (poglavje 3.2.1.1) smo pred nanosom vzorca razgrajenih kokošjih IgY na kromatografsko kolono preverili vezavo mišjih mAb 3C10/F6 na CNBr- aktivirano sefarozo. Iz kromatografske kolone smo odvzeli 15  $\mu$ L gela z vezanimi mišjimi mAb 3C10/F6, kot konjugat pa uporabili s peroksidazo označena kozja protitelesa proti mišjim IgG-  $\gamma$  (Sigma, A 3673, ZDA), redčena s PBS, pH 7,2 v razmerju 1:3000. Metodo smo izvedli po enakem postopku kot je že opisan v poglavju 3.2.1.1, le da smo pred vsakim spiranjem s PBS ali TPBS vzorec centrifugirali in odstranili supernatant (testa nismo izvajali na nitrocelulozni membrani, ampak kar v epruvetki).

### 3.2.3.2 HPLC kromatografija

Rezultati encimskoimunskega testa so pokazali, da v frakcijah, pridobljenih z imunoafinitetno CNBr kromatografijo, nismo uspeli pridobiti Fc fragmentov IgY (poglavje 3.2.3.1.1). Zato smo se odločili, da jih bomo ločili še na drug način. Prijazno so nam pomagali v BIA Separations d.o.o., kjer so izvedli HPLC kromatografijo z DEAE diskom. Podoben eksperiment je bil že opisan v članku avtorjev Suzuki in Lee (2004).

Nanešeni vzorec razgrajenih kokošjih IgY (koncentracije 6 mg/mL) je bil 200 µL. Za spiranje smo uporabili pufer A (50 mM Tris, pH 8,5) in pufer B (50 mM tris + 1 M NaCl, pH 8,5). Pretok je bil 3 mL/min, trajanje kromatografije pa 5 minut. V prvi minuti je spiranje potekalo s pufrom A, v drugi in tretji spiranje s pufrom B (od 0 do 40 %), v četrti minuti s 40% pufrom B, v peti minuti pa ponovno s pufrom A. Hkrati je potekalo merjenje absorbance pri 280 nm.

#### 3.2.3.2.1 Preverjanje uspešnosti HPLC kromatografije z DIBA

**S posrednim encimskoimunskim testom** (poglavje 3.2.3.1.1) smo preverili prisotnost Fab in Fc fragmenov kokošjih IgY v frakcijah 3 in 4. Na nitrocelulozno membrano smo nanesli nerazrečeni frakciji 3 in 4 ter njihove redčitve v PBS, pH 7,3 (1:10, 1:20, 1:40). Posamezne trakove smo inkubirali v CH31 (redčen v PBS, pH 7,2; 1:1000), 4E4/G11 (redčen v PBS, pH 7,2; 1:10) ter v 1F5/3G2 (redčen v PBS, pH 7,2; 1:10). Kot konjugat smo uporabili s hrenovo peroksidazo označena kozja protitelesa proti mišjim IgG-  $\gamma$  (Sigma, A 3673, ZDA) redčena s pufrom PBS v razmerju 1:10000.

**Z neposrednim encimskoimunskim testom** (poglavje 3.2.1.1) smo preverili delovanje konjugata A 3673 (Sigma). Na nitrocelulozno membrano smo tako kot pri posrednem encimskoimunskem testu nanesli neredčene in redčene vzorce frakcij 3 in 4 ter že znane redčitve CH31, 4E4/G11, 1F5/3G2. Trakove smo inkubirali v s peroksidazo označenih kozjih protitelesih proti mišjim IgG-  $\gamma$  (Sigma, A 3673, ZDA) ter redčenih s pufrom PBS v razmerju 1:10000.

### 3.3 DETEKCIJA Fc RECEPTORJA ZA KOKOŠJE IgY

S posrednim encimskoimunskim testom smo v lizatu membrane jajčnega folikla iskali specifične proteine, ki kot Fc receptorji (FcR) specifično reagirajo z Fc delom kokošjih IgY pri pH 6, ne pa pri pH 8. V tem primeru so antigene predstavljali z NaDS-PAGE ločeni in na PVDF membrano preneseni proteini lizata membrane jajčnega folikla (poglavje 3.1.3).

Kot primarna protitelesa nismo uporabili Fc fragmentov IgY, ki smo jih poskušali s kromatografijo izolirati sami, ampak smo uporabili komercialni kokošji Fc fragment IgY (Jackson Immuno Research, 003-000-008). V preglednici 2 so prikazani izvedeni encimskoimunski testi.

**Preglednica 2:** Shema encimskoimunskih testov za identifikacijo FcRY v lizatu membrane jajčnega folikla. Trakce membrane z ločenimi proteini lizata membra jajčnega folikla smo inkubirali v Fc fragmentu, kokošjem serumu ali PBS (negativna kontrola). Sledila je inkubacija v raztopini kunčjih protiteles proti Fc delu kokošjih IgY, konjugirana s peroksidazo in nato nanos kromogenega substrata TrueBlue.

Primarno protitelo	Redčitev	Konjugat	Redčitev	pH
Fc fragment IgY <sup>1</sup>	1:50	Kunčja protitelesa proti Fc delu kokošjih IgY, konjugirana s preoksidazo (Jackson Immuno Research, 303-035-008, ZDA)	1:10000	6
Kokošji serum <sup>2</sup>	1:40			8
PBS	-			6
				7,2
				8

Opomba: 1) komercialni kokošji Fc fragment IgY (Jackson Immuno Research, 003-000-008)  
2) proizveden v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete

Trakce membrane smo inkubirali 45 minut v razredčini (1:50) vzorca kokošjih Fc fragmentov IgY (Jackson Immuno Research, 003-000-008), pripravljenega v PBS pufri pri pH 6 in pH 8. Ker je vezava kokošjih Fc fragmentov IgY na FcR odvisna od pH, smo morali vse pufre in razredčine protiteles v katerih smo inkubirali trakce, uravnati na pH 6,

oziroma na pH 8. Po inkubaciji v razredčini vzorca kokošjih Fc fragmentov IgY (Jackson Immuno Research, 003-000-008) smo trakce trikrat po 10 minut spirali v 0,05 % pufu TPBS (pH 6 oziroma pH 8) in popivnali. Sledila je 45 minutna inkubacija v razredčini (1:10000) kunčjih protiteles proti kokošjim Fc IgY, konjugiranih s peroksidazo (Jackson Immuno Research, 303-035-008, ZDA). Ponovno smo pH uravnali na 6, oziroma na pH 8. Sledilo je dvakratno spiranje po 10 minut v pufu 0,05 % TPBS (pH 6 oz. pH 8), nato pa še 10 minutno spiranje v PBS (pH 6 oz. pH 8). Na koncu smo na trakce membrane nakapljali še substrat TrueBlue™ (Kirkegaard & Perry Laboratories, 50-78-02, ZDA), počakali da se pojavi modra obarvanost proteinskih lis nato pa zaustavili reakcijo s spiranjem v destilirani vodi.






Kontrola specifične vezave konjugata sta bila trakova s proteini, ki smo ju namesto v kokošjih Fc IgY inkubirali v PBS (pH 6 oz. pH 8). Na ta način smo preverili, da se sam konjugat ne veže na antigen.

Prav tako smo po enaki metodi izvedli posredni encimskoimunski test, le da smo trakce namesto v kokošjih Fc IgY inkubirali v kokošjem serumu (1:40) pri pH 6 in pH 7,2. Kokošji serum je bil proizveden v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete.

## 4 REZULTATI

### 4.1 USPEŠNOST IZOLACIJE KOKOŠJIH IgY IZ JAJČNEGA RUMENJAKA

Uspešnost izolacije kokošjih IgY iz jajčnega rumenjaka smo preverili z neposrednim DIBA testom (poglavje 3.2.1.1). Naredili smo različne razredčine izolata kokošjih IgY (1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000) ter na njih vezali s hrenovo peroksidazo označena kunčja protitelesa proti kokošjim IgY. Rezultati so prikazani na sliki 11.

	Redčitev	Rezultat reakcije
	1:1000	+
	1: 500	++
	1:100	+++
	1:50	++++
	1:10	+++++

**Slika 11:** Rezultat testa DIBA za kokošje IgY, izolirane iz jajčnega rumenjaka. Vzorec izoliranih kokošjih IgY smo redčili v PBS pufru pH 7,2 v razmerju 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000. Po inkubaciji v konjugatu in dodatku substrata TrueBlue smo glede na intenziteto in prisotnost obarvanja reakcijo opredelili kot: zelo močno +++++, močno +++++, srednje močno +++, manj močno ++, šibko +, negativno -.

Na podlagi rezultatov, prikazanih na sliki 11, lahko zaključimo, da so v vzorcu prisotna kokošji IgY, ki so reagirala s kunčjimi protitelesi proti kokošjim IgY. Intenziteta reakcije z naraščajočo razredčino izolata pada, kar je pričakovan rezultat, saj je pri višjih redčitvah protiteles manj in tako dajo šibkejšo reakcijo.

Kljub dobrim rezultatom testa teh protiteles nismo uporabili v nadaljnjih testih. V izolatu je namreč bilo tudi po dializi veliko ostankov rumenjaka, kar je onemogočilo izvedbo testov. Tako smo za encimsko razgradnjo s papainom uporabili kokošje IgY, predhodno izolirane iz jajčnega rumenjaka z istim setom kemikalij v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete (Biček, 2004).

## 4.2 USPEŠNOST PRIPRAVE Fc FRAGMENTOV KOKOŠJIH IgY

Fab in Fc fragmente kokošjih IgY, ki smo jih dobili po razgradnji s papainom smo ločili z imunoafinitetno kromatografijo in HPLC kromatografijo. Uspešnost izolacije smo preverili z encimskoimunskim testom.

### 4.2.1 Testiranje frakcij na prisotnost protiteles po CNBr kromatografiji

Pred samim nanosom vzorca IgY- razgrajenih s papainom, smo preverili uspešnost vezave mišjih monoklonskih protiteles proti lahkim verigam kokošjih IgY (3C10/F6) na CNBr, ki smo jih uporabili kot ligand za vezavo Fab fragmentov kokošjih IgY. Rezultat neposrednega encimskoimunskega testa je bil pozitiven, s čimer smo dokazali vezavo mišjih mAb 3C10/F6 na CNBr nosilec.

Encimskoimunski test smo izvedli samo za frakciji 13 in 17, ker sta imeli največjo vrednost absorbance, izmerjene pri 280 nm. Iz preglednice 3 so razvidne pričakovane reakcije med testiranimi vzorci in primarnimi mišjimi mAb.

**Preglednica 3:** Pričakovani rezultati testa DIBA po CNBr kromatografiji. Fc in Fab fragmente v frakcijah 17 in 13 ter v vzorcu s papainom razgrajenih kokošjih IgY smo dokazali z vezavo mišjih mAb CH31, 4E4/G11 in 1F5/3G2

Št. traku	Testirani vzorci			Mišja mAb proti kokošjim IgY	
	Frakcija 17	Frakcija 13	K*	Oznaka	Specifičnost
1	+	-	+	CH31	Lahka veriga
2	+	-	+	4E4/G11	Lahka in težka veriga
3	-	+	+	1F5/3G2	Težka veriga (verjetno Fc del)

Opombe: \* kontrola: vzorec kokošjih IgY po razgradnji s papainom, ki ga nismo nanесли na kolono  
+ pomeni pozitivno reakcijo, - odsotnost reakcije

Glede na to, da smo na CNBr nosilec vezali mišja mAb, ki vežejo lahke verige kokošjih IgY in ne Fc, smo domnevali, da se v 13 frakciji nahajajo Fc fragmenti IgY, ki so se sprali s PBS pufrom, pH 8. Reakcija z Fc fragmenti v frakciji 13 naj bi bila pozitivna samo v primeru z mišjimi mAb 1F5/3G2, v ostalih primerih (CH31, 4E4/G11) pa negativna. V frakciji 17 naj bi bile prisotne le lahke verige in morda celotne IgY molekule, sprane s pufrom PBS, pH 2,5. Zato naj bi bili reakciji s CH31 in 4E4/G11 pozitivni, medtem ko naj bi bila reakcija z 1F5/3G2 negativna. Papain razgradi protitelesa na Fab in Fc podenote, vendar se lahko v vzorcu razgrajenih protiteles nahajajo tudi nerazgrajena. Zato naj bi bile reakcije vzorca s papainom razgrajenih kokošjih IgY s CH31, 4E4/G11 in 1F5/3G2 pozitivne.

Testirani vzorci			Testirani vzorci			Mišja mAb proti kokošjim IgY	
fr. 17	fr. 13	K	fr. 17	fr. 13	K	Oznaka	Specifičnost
			+++++	+	+++	CH31	Lahka veriga
			+++++	+	+++	4E4/G11	Lahka in težka veriga
			+++++	+	+++	1F5/3G2	Težka veriga (verjetno Fc del)

**Slika 12:** Rezultati testa DIBA za frakciji 13 in 17, pridobljenih s CNBr kromatografijo. Trakove nitrocelulozne membrane (1-3) s frakcijo 17, frakcijo 13 in vzorcem razgrajenih kokošjih IgY s papainom (K) smo inkubirali v treh različnih mišjih mAb, ki specifično prepoznajo lahke ali težke verige kokošjih IgY (CH31, 4E4/G11, 1F5/3G2). Po inkubaciji v konjugatu in dodatku substrata TrueBlue smo glede na intenziteto in prisotnost obarvanja reakcijo opredelili kot: zelo močno +++++, močno +++++, srednje močno +++, manj močno ++, šibko +, negativno -.

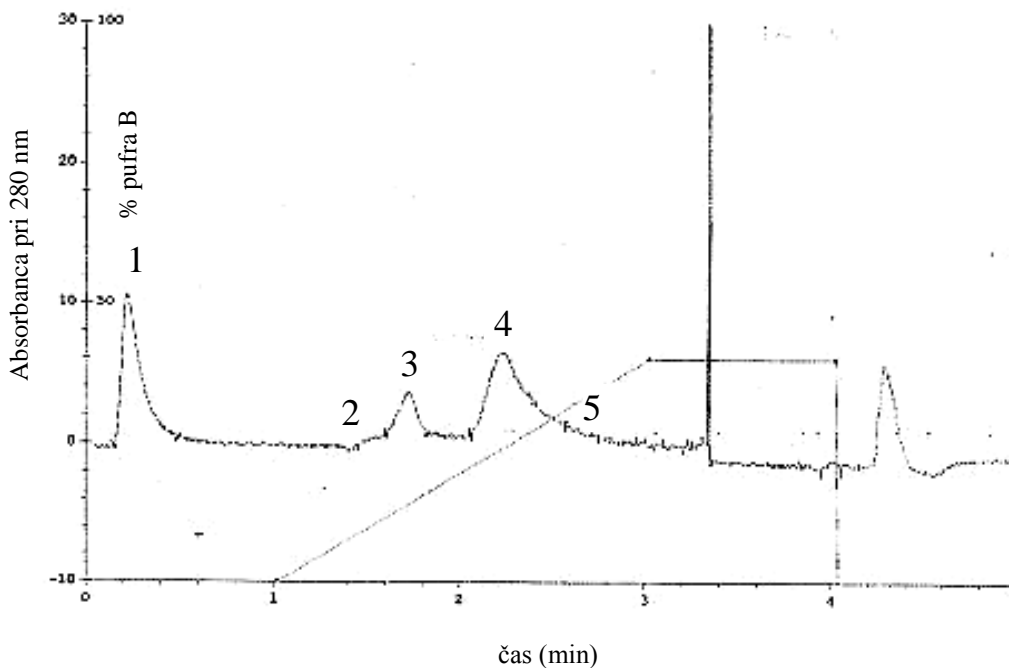
Rezultati (slika 12) odstopajo od pričakovanj. Vse reakcije so bile pozitivne. To smo pričakovali le pri kontroli; vzorcu s papainom razgrajeni kokošjih IgY. Reakcija med protitelesi v frakciji 17 in mišjimi mAb 1F5/3G2 bi morala biti negativna, saj z mišjimi mAb 1F5/3G2 dokazujemo Fc podenote kokošjih IgY. Tudi reakcije med protitelesi v frakciji 13 in mAb odstopajo od pričakovanj. Vse reakcije so bile rahlo pozitivne, vendar bi morali biti reakciji z 4E4/G11 in CH31 negativni. Takšen rezultat pomeni, da frakcije 13 ni bilo mogoče uporabiti v nadaljevanju, saj ni vsebovala čistega Fc fragmenta.



#### 4.2.2 Izolacija Fc fragmentov s HPLC kromatografijo

Zaradi slabih rezultatov z imunoafinitetno CNBr kromatografijo, smo se odločili IgY, ki smo jih razgradili s papainom, ločiti s HPLC kromatografijo. Prijazno so nam pomagali v BIA Separations d.o.o., kjer so izvedli HPLC kromatografijo z DEAE diskom in nam izdelali elucijski profil.

Elucijski profil (slika 13), ki smo ga dobili, je drugačen od naših pričakovanj. Na podlagi rezultatov, objavljenih v članku avtorjev Suzuki in Lee (2004) smo domnevali, da se bodo v elucijskem profilu izrisali trije vrhovi. Prvi vrh naj bi predstavljal frakcijo 1 z eluiranimi Fab fragmenti IgY, drugi vrh pa frakcijo 2- mešanico Fab in Fc fragmentov IgY. Fc fragmenti naj bi se sprali čisto nazadnje (vrh 3 oz. frakcija 3).



**Slika 13:** Elucijski profil po HPLC kromatografiji. Kromatografija je potekala 5 minut. Od 1 do 5 so označeni posamezni vrhovi oziroma frakcije. Druga krivulja predstavlja potek spiranja kolone z naraščajočim gradientom NaCl, ki je nastal kot posledica mešanja pufra A (50 mM Tris, pH 8,5) in pufra B (50 mM Tris + 1 M NaCl, pH 8,5). V prvi minuti so kolono spirali s 100 % pufrom A, v drugi in tretji minuti z linearnim gradientom pufra B (0 – 40 %), v četrti minuti s 40 % pufrom B in nazadnje, v peti minuti s 100 % pufrom A

Na našem elucijskem profilu (slika 13) je izrisanih pet vrhov. Od tega so bili trije (1, 3 in 4) najizrazitejši po vsebnosti proteinov. Sklepali smo, da je vrh 1 vseboval Fab fragment, medtem ko bi v vrhu 3 in 4 lahko bil prisoten Fc fragment (Suzuki in Lee, 2004). Zato smo s testom DIBA testirali frakciji 3 in 4.

#### 4.2.2.1 Testiranje frakcij na prisotnost protiteles po HPLC kromatografiji

S posrednim encimskoimunskim testom smo preverili prisotnost Fab in Fc fragmentov kokošnjih IgY v frakcijah 3 in 4, za katere smo domnevali, da bi lahko bili iskani Fc fragmenti IgY. Iz preglednice 4 lahko vidimo, da so bile vse reakcije s frakcijo 3 negativne. Rahlo pozitivne reakcije smo dobili samo s koncentrirano frakcijo 4, kjer smo pričakovali pozitivno reakcijo samo z 1F5/3G2.

**Preglednica 4:** Rezultati preverjanja uspešnosti ločitve Fab in Fc fragmentov (ločenih s HPLC kromatografijo) s posrednim encimskoimunskim testom. Na nitrocelulozno membrano smo nanесли različne koncentracije (neredčeni vzorec ter naslednje redčitve: 1:10, 1:20, 1:40) frakcij 3 in 4. Kot primarno protitelo smo uporabili mišja mAb CH31, 4E4/G11, 1F5/3G2, sekundarna protitelesa pa so bila s peroksidazo označena kunčja protitelesa proti mišjim IgG-  $\gamma$  (Sigma, A 3673). Po inkubaciji v konjugatu in dodatku substrata TrueBlue smo glede na intenziteto in prisotnost obarvanja reakcijo opredelili kot: zelo močno +++++, močno +++++, srednje močno +++, manj močno ++, šibko +, negativno -.

Redčitev frakcij s PBS		Konc.	1:10	1:20	1:40	
Mišja mAb proti kokošnjim IgY						
Oznaka	Specifičnost					
CH31	Lahka veriga	-	-	-	-	<b>Frakcija 3</b>
		+	-	-	-	<b>Frakcija 4</b>
4E4/G11	Lahka in težka veriga	-	-	-	-	<b>Frakcija 3</b>
		+	-	-	-	<b>Frakcija 4</b>
1F5/3G2	Težka veriga (Fc del)	-	-	-	-	<b>Frakcija 3</b>
		+	-	-	-	<b>Frakcija 4</b>

Z neposrednim encimskoimunskim testom smo preverjali delovanje konjugata A 3673 (s peroksidazo označena kunčja protitelesa proti mišjim IgG-  $\gamma$  specifični). Reakcije z mišjimi mAb (preglednica 5) so bile po pričakovanjih pozitivne, saj smo uporabili konjugat proti mišjim mAb. Reakcije konjugata A 3673 z imunoglobulini v frakciji 3 in 4 (preglednica 6) so bile po pričakovanjih negativne, ker frakciji 3 in 4 vsebujeta kokošje IgY, na katere konjugat A 3673 ne deluje.

**Preglednica 5:** Rezultati preverjanja delovanja konjugata A 3673 z vezavo na mišja mAb CH31, 4E4/G11, 1F5/3G2 z neposrednim encimskoimunskim testom. Po inkubaciji v konjugatu in dodatku substrata TrueBlue smo glede na intenziteto in prisotnost obarvanja reakcijo opredelili kot: zelo močno +++++, močno +++++, srednje močno +++, manj močno ++, šibko +, negativno -.

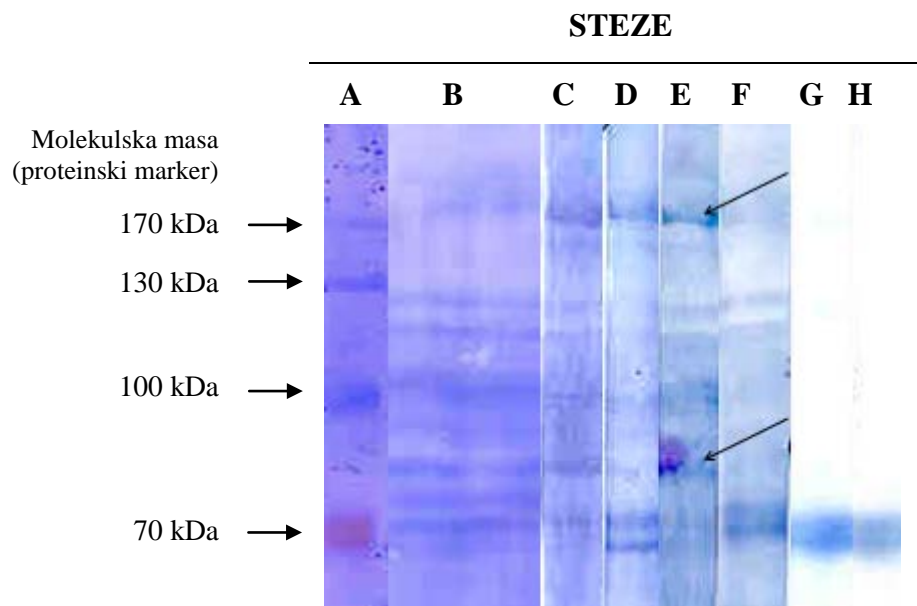
Mišja mAb proti kokošjim IgY		Rezultat reakcije
Oznaka	Specifičnost	
CH31	Lahka veriga	+++++
4E4/G11	Lahka in težka veriga	++++
1F5/3G2	Težka veriga (Fc del)	+++

**Preglednica 6:** Rezultati preverjanja delovanja konjugata A 3673 z vezavo na imunoglobuline različnih razredčin frakcij 3 in 4 z neposrednim encimskoimunskim testom. Po inkubaciji v konjugatu in dodatku substrata TrueBlue smo glede na intenziteto in prisotnost obarvanja reakcijo opredelili kot: zelo močno +++++, močno +++++, srednje močno +++, manj močno ++, šibko +, negativno -.

Redčitev frakcij s PBS	konc.	1:10	1:20	1:40
Frakcija 3	-	-	-	-
Frakcija 4	-	-	-	-

#### 4.3 IDENTIFIKACIJA Fc RECEPTORJA ZA KOKOŠJE IgY V LIZATU

Uspešnost specifične reakcije od pH odvisne vezave Fc fragmentov kokošjih IgY z receptorjem v membrani jajčnega folikla smo preverili z Western blot analizo.



**Slika 14:** Profil proteinov membrane jajčnega folikla kokoši na PVDF membrani in identifikacija Fc receptorja, katerega vezava na IgY je odvisna od pH. Na steze gela, od B do H, smo nanegli lizat membrane jajčnega folikla kokoši, na stezo A pa proteinski marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, # SM0671; približne molekulske mase si sledijo od rdečega pasu navzgor: 70 kDa, 100 kDa, 130 kDa in 170 kDa). Proteine smo ločili z NaDS-PAGE in jih prenesli na membrano. Membrana s stezama A in B je bila barvana z barvilom Coomassie Brilliant Blue, membrano s stezo C smo inkubirali v kokošjem serumu, redčenem s PBS pH 6, v razmerju 1:40; membrano s stezo D pa v kokošjem serumu redčenim s PBS pH 7,2, v razmerju 1:40. Membrano s stezo E smo inkubirali v Fc fragmentih kokošjih IgY (Jackson Immuno Research, 003-000-008), redčenih s PBS pH 6, v razmerju 1:50; membrano s stezo F pa v Fc fragmentih kokošjih IgY (Jackson Immuno Research, 003-000-008), redčenih s PBS pH 8, v razmerju 1:50. Negativni kontroli vezave Fc fragmentov IgY na proteine lizata membrane jajčnega folikla pri pH 8 in pH 6 smo naredili tako, da smo membrano s stezo G namesto v Fc fragmentih IgY inkubirali v PBS s pH 8, membrano s stezo H pa v PBS s pH 6. Sledila je inkubacija membran s stezami od C do H v konjugatu kunčjih protitelesih proti kokošjim Fc IgY, konjugirana s peroksidazo in redčena s PBS ustrezne pH vrednosti (pH 6 za membrane s stezami C, E, H; pH 8 za membrani s stezama F in G, in pH 7,2 za membrano s stezo D), v razmerju 1:10000. Na desni strani sta s puščicama označena proteina, ki sta reagirala z Fc fragmenti IgY pri pH 6.

Legenda k sliki 14:

<b>A</b>	Proteinski marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, # SM0671)				
<b>B</b>	Lizat membrane jajčnega folikla kokoši				
<b>Steza</b>	<b>Primarno protiteleso</b>			<b>Konjugat</b>	
		<b>Redčitev</b>	<b>pH</b>		<b>pH</b>
<b>C</b>	Kokošji serum	1:40	6		6
<b>D</b>	Kokošji serum	1:40	7,2		7,2
<b>E</b>	Fc fragment IgY	1:50	6	Kunčja protitelesa proti Fc delu kokošjih IgY, konjugirana s preoksidazo (Jackson Immuno Research, 303-035-008, ZDA), redčitev 1:10000	6
<b>F</b>	Fc fragment IgY	1:50	8		8
<b>G</b>	PBS	-	8		8
<b>H</b>	PBS	-	6		6

Iz slike 14 je razvidno, da se v membrani jajčnega folikla nahajata dva proteina, ki vežeta Fc del kokošnjih IgY pri pH 6 in ne pri pH 8. Večji protein je velik približno 180 kDa, drugi pa okrog 85 kDa. Kokošji serum je predstavljal pozitivno kontrolo, ki da zagotovo pozitivno reakcijo s proteini v membrani jajčnega folikla pri pH 6 in pri pH 8. Pozitivni rezultat, ki smo ga dobili z negativnima kontrolama pa nam pove, da so kunčja protitelesa konjugirana s peroksidazo reagirala s proteini lizata.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Protitelesa IgY imajo pri pticah obrambno vlogo. Njihova naloga je zaščititi organizem pred zunanjimi antigeni, zato je sinteza za antigen specifičnih IgY povečana v času okužbe. Poleg tega se protitelesa IgY iz krvi preko receptorskih in transportnih molekul prenašajo v rumenjaki, kjer predstavljajo zaščito razvijajočemu se zarodku. *In vitro* pa se protitelesa IgY uporabljajo v diagnostiki (proti klamidiji, *Influenza virus*, hepatitisu B), terapiji (imunoterapija proti rakavim obolenjem) in v raziskavah.

Kokošji IgY so precej podobni sesalskim IgG, se pa nekoliko razlikujejo v strukturi in posledično v biološki vlogi. Za uporabo v testih in raziskavah je protitelesa IgY tudi relativno preprosto pripraviti. Poleg tega se kokoši zaradi evolucijske oddaljenosti od sesalcev bolj odzovejo na sesalčje antigene, pridobivanje kokošnjih IgY iz jajčnega rumenjaka pa je, v primerjavi z zbiranjem krvi, neinvazivna in poceni metoda.

Kljub številnim raziskavam kokošnjega imunskega sistema in kljub vse večji proizvodnji kokošnjih IgY za uporabo *in vitro*, je prehajanje IgY iz krvi v rumenjaki in nadalje v kri zarodka le delno pojasnjeno. Linden ter Roth sta leta 1978 dokazala, da je vezava IgY na membrano jajčnega folikla odvisna od pH. Na podlagi tega odkritja so znanstveniki zaključili, da je transport kokošnjih IgY preko membrane jajčnega folikla specifičen in odvisni od pH (Brambell, 1970; Ghetie ter Ward, 2000).

Membrana jajčnega folikla kokoši ima podobne lastnosti vezave IgY kot je vezava IgG na sesalski FcRn. Oba mehanizma vezave sta odvisna od pH. IgY se močno veže na FcRY (v razmerju FcRY:IgY=2:1) pri pH 6, medtem ko pri pH 7,4 in pH 8 vezave ni (Ghetie in Ward, 2000).

Receptor, ki je odgovoren za prenos IgY iz jajčnega folikla v zarodek, so poimenovali FcRY. Analiza aminokislinskega zaporedja je pokazala, da je homolog sesalčjega sekretornega receptorja fosfolipaze A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>R), ki veže in omogoča endocitozo molekule PLA<sub>2</sub> (West in sod., 2004).

Z našim raziskovalnim delom smo želeli dokazati ali obstaja še kakšen drug Fc receptor, ki veže kokošje IgY. To domnevo smo preverili z vezavo Fc fragmentov IgY na lizat membrane jajčnega folikla z encimskoimunsko metodo. Fc fragmente IgY naj bi pridobili z izolacijo IgY iz jajčnega rumenjaka kokoši in kasnejšo razgradnjo s papainom.

Kokošje IgY smo izolirali s komercialnim kompletom kemikalij. Uspešnost izolacije smo preverili z neposrednim encimskoimunskim testom. Iz slike 11 je razvidno, da so v vzorcu prisotni kokošji IgY, ki so reagirali s kunčjimi protitelesi proti kokošjim IgY (A 9046, Sigma). Kljub dobrem rezultatu testa teh protiteles nismo uporabili v nadaljnjih testih. V izolatu je namreč bilo tudi po dializi veliko ostankov rumenjaka, kar je onemogočilo izvedbo testov. Tako smo za nadaljnje metode uporabili že izdelane kokošje IgY iz rumenjaka z istim setom kemikalij.

Sledila je razgradnja izoliranih kokošjih IgY s papainom. Pri cepljenju s papainom naj bi dobili v večini Fab podenote in Fc podenote, lahko pa tudi nerazgrajene IgY. Fab in Fc fragmente kokošjih IgY, ki smo jih dobili z razgradnjo s papainom, smo ločili z imunoafinitetno kromatografijo in HPLC kromatografijo. Uspešnost izolacije pa smo preverili z encimskoimunskim testom.

Rezultati, ki smo jih dobili (slika 12) z izolacijo fragmentov IgY ločenih z imunoafinitetno kromatografijo, odstopajo od napovedanih (preglednica 3). Domnevali smo, da se bodo Fc fragmenti kokošjih IgY sprali s pufrom saj smo kot ligand uporabili mišja mAb proti lahkim verigam kokošjih IgY (C10/F6). Fab fragmenti kokošjih IgY pa naj bi se vezali na mišja mAb 3C10/F6 in se sprali z elucijskim pufrom s pH 2,5. Vendar so naši rezultati pokazali drugače. Vse reakcije s frakcijo 17 in CH31, 4E4/G11 in 1F5/3G2 so bile močno pozitivne. Tudi reakcije med protitelesi v frakciji 13 in mAb odstopajo od pričakovanj. Vse reakcije so bile rahlo pozitivne, vendar bi morali biti reakciji z 4E4/G11 in CH31

negativni. Takšen rezultat pomeni, da frakcije 13 ni bilo mogoče uporabiti v nadaljevanju, saj ni vsebovala čistega Fc fragmenta. Pričakovane rezultate smo dobili samo pri reakcijah med razgrajenimi kokošjimi IgY in primarnimi imunoglobulini, pa še to so bile šibke.

Vzrok za neuspelo ločitev Fc in Fab fragmentov z imunoafinitetno kromatografijo bi lahko bila neuspela razgradnja IgY s papainom, da so bili kot produkti poleg Fab in Fc fragmentov predvsem prisotne še cele molekule IgY in premajhna koncentracija izoliranih kokošjih IgY. Neuspešno razgradnjo podpira tudi dejstvo, da se vzorec med razgradnjo zaradi tehničnih težav ni ves čas mešal, kar je pomembno za vzdrževanje suspenzije uporabljenega, na agarozo vezanega, papaina.

Sledil je ponoven poskus izolacije Fc fragmenta IgY, a ponovno neuspešno. Vzorec razgrajenih kokošjih IgY smo poslali v podjetje Bia Separations d.o.o, kjer so izvedli HPLC kromatografijo. Domnevali smo, da se bodo Fc fragmenti nahajali v frakciji 3 in 4, kot je opisano v že omenjenem članku (Suzuki in Lee, 2004). V preglednici 4 lahko vidimo, da so vse reakcije s frakcijo 3 bile negativne. Rahle pozitivne reakcije so bile samo s koncentrirano frakcijo 4. Morali bi izvesti NADS-PAGE, da bi ugotovili uspešnost cepitve s papainom. V nadaljevanju smo tako za detekcijo Fc receptorja v lizatu membrane jajčnega folikla uporabili komercialni Fc fragment IgY (Jackson Immuno Research, 003-000-008).

Membrano jajčnega folikla kokoši smo lizirali in proteine ločili z NaDS-PAGE, ki smo jih nato prenesli na membrano. Z encimskoimunskim testom smo dokazali (slika 14), da obstajata dva receptorja, ki vežeta Fc del IgY. Večji protein z molekularno maso okrog 180 kDa je naveden receptor FcRY, ki prenaša IgY iz jajčnega folikla v kri zarodka. Drugi protein je nekoliko manjši, z molekularno maso okrog 85 kDa. Tudi ta veže Fc IgY, odvisno od pH. Iz slike 14 (steza E) lahko vidimo, da daje pri pH 6 z Fc IgY pozitivno reakcijo, pri pH 8 pa negativno reakcijo. Ne vemo pa, ali je tudi ta receptor odgovoren za prenos IgY iz rumenjaka v kri zarodka (tako kot FcRY) ali pa je odgovoren za prenos IgY iz krvi kokoši v rumenjaki.



## 5.2 SKLEPI

- Iz jajčnega rumenjaka kokoši smo izolirali kokošja protitelesa razreda Y (IgY).
- Pri podaljšanem razkroju s papainom pride do popolne razgradnje IgY.
- Vezava Fc IgY na Fc receptor je odvisna od pH. IgY se veže na FcRY pri pH 6 in ne pri pH 8.
- Obstajata dva receptorja v membrani jajčnega folikla, ki vežeta Fc del IgY.
- Poleg FcRY receptorja (180 kDa) obstaja še en Fc receptor (85 kDa), ki veže Fc IgY pri pH 6 in ne pri pH 8.
- Ne vemo ali manjši od obeh receptorjev (85 kDa) prenaša IgY iz krvi kokoši v jajčni rumenjaki ali iz rumenjaka v kri zarodka.

## 6 POVZETEK

Sesalci so med evolucijo razvili več mehanizmov, s katerimi se ubranijo pred antigeni. Nespecifični obrambni dejavniki imajo pomembno nalogo na samem začetku vdora tujega antigena, ko bistveno upočasnijo njegovo širjenje. Za končni obračun z antigeni se mora v gostitelju aktivirati še specifični imunski odziv, pri katerem strogo nadzorovano in usklajeno delujejo obrambne celice in proteini imunskega sistema. Na podlagi komponent imunskega sistema, ki posredujejo imunski odziv, le-te razdelimo v dve obliki: humoralno in celično posredovano imunost. Za humoralno imunost je značilno pojavljanje protiteles, ki specifično spoznajo in odstranijo antigene.

Prenos Ig iz matere na plod ni samo omejen na sesalce. Pri pticah in plazilcih se IgY iz matere prenesejo najprej v jajčni folikel, v pozni fazi embrionalnega razvoja pa nato še skozi membrano jajčnega folikla v kri zarodka. Receptor, ki omogoča prenos IgY iz jajčnega folikla na zarodek, je FcRY.

Iz jajčnega rumenjaka kokoši smo s setom že pripravljenih kemikalij izolirali kokošje Ig razreda Y. IgY smo cepili s papainom nato pa ločili posamezne fragmente IgY z imunoafiniteno kromatografijo in HPLC kromatografijo. Uspešnost ločitve smo preverjali s posrednim encimskoimunskim testom. Razgradnja oziroma ločitev posameznih fragmentov IgY (Fab in Fc) nam ni uspela. Vzrok za to naj bi bila neuspešna oziroma delna razgradnja s papainom, kar bilahko potrdili z NADS-PAGE. Zato smo za nadaljnje poskuse uporabili komercialno dostopne Fc fragmente kokošjih IgY (Jackson Immuno Research, 003-000-008).

Membrano jajčnega folikla kokoši smo lizirali in proteine ločili z NaDS-PAGE. Z western blot analizo smo dokazali, da obstajata dva receptorja, ki vežeta Fc del IgY. Večji protein ima molekulska masa okrog 180 kDa in je naverjetneje receptor FcRY, ki prenaša IgY iz jajčnega folikla v kri zarodka. Drugi pa je nekoliko manjši z molekulska masa okrog 85 kDa. Tudi ta veže Fc IgY pri pH 6, pri pH 8 pa ne. Zaenkrat ne vemo, če je tudi ta receptor odgovoren za prenos IgY iz folikla v kri zarodka (tako kot FcRY) ali pa je odgovoren za prenos IgY iz krvi kokoši v folikel.

## 7 VIRI

- Aliahmad P., Pike K. A., Ratcliffe M. J. H. 2005. Cell surface immunoglobulin regulated checkpoints in chicken B cell development. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108: 3-9
- Benčina D., Narat M., Dovč P., Drobnič V. M., Habe F., Kleven S. H. 1999. The characterisation of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal amino acids sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 173: 85-94
- Biček A. 2004. Mapiranje epitopov na kokošji IgY molekuli z monoklonskimi protitelesi. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 58 str.
- Brambell F. W. R. 1970. The transmission of passive immunity from mother to young. Amsterdam, North-Holland Company: 385 str.
- Dancis J., Lind J., Oratz M., Smolens J., Vara P. 1961. Placental transfer of proteins in human gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 82: 167-171
- East L., Isacke C. M. 2002. The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572: 364-386
- Erhard M.H., Von Quistorp I., Schraner I., Jüngling A., Kaspers B., Schidt 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 J. G., Ward E. S. 2000. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annual Review of Immunology*, 18: 739-766

- Gitlin D., Biasucci A. 1969. Development of  $\gamma$ G,  $\gamma$ A,  $\gamma$ M,  $\beta$ IC/ $\beta$ IA, C'I esterazse inhibito, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen,  $\alpha$  1-antitrypsin, orosomucoid,  $\beta$ - lipoprotein,  $\alpha$ 2- macroglobulin and prealbumin in the human conceptus. *Journal of Clinical Investigation*, 48: 1433-1446
- Harlow E., Lane D. 1988. *Antibodies- a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 726 str.
- Ihan A. 2002. Pridobljena (specifična) imunost. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 105-124
- Kacskovics I. 2004. Fc receptors in livestock species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102: 351-362
- Kowalczyk K., Daiss J., Halpern J., Roth T. F. 1985. Quantitation of maternal fetal IgG transport in the chicken. *Immunology*, 54: 755-762
- Likar M. (ur.). 1985. *Mikrobiologija in imunologija 1. del*. 1. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 312 str.
- Linden C. D., Roth T. F. 1978. IgG receptors on foetal chick yolk sac. *Journal of Cell Science*, 33: 317-328
- Narat M. 2003. Production of antibodies in chickens. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 3,: 259-267
- Nishinaka S., Suzuki T., Matsuda H., Murata M. 1989. Establishment of a chicken \* chicken hybridoma secreting specific antibody. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 89: 416-419

Papain- Enzyme Explorer. 2007. St. Louis, Sigma-Aldrich Co.: 3 str.

[http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Biochemicals/Enzyme\\_Explorer/Analytical\\_Enzymes/Papain.html#products](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Analytical_Enzymes/Papain.html#products) (junij 2007)

Ravetch J. V. 1997. Fc receptors. *Current Opinion in Immunology*, 9: 121-125

Sayegh C. E., Rao M. A., Ratcliffe M. J. H. 1999. Avian B cell development: lessons from transgenic models. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72: 31-37

Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 2002. Biokemijski praktikum. 4. izd. Ljubljana, Študentska založba: 182 str.

Simister N. E., Mostov K. E. 1989. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature*, 337: 184-187

Simister N. E., Story C. M. 1997. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *Journal of Reproductive Immunology*, 37: 1-23

Spiekermann G. M., Finn P. W., Ward E. S., Dumont J., Dickinson B. L., Blumberg R. S., Lencer W. I. 2002. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression on FcRn in the mammalian lung. *Journal of Experimental Medicine*, 196: 303-310

Suzuki N., Lee Y. C. 2004. Site-specific N-glycosylation of chicken serum IgG. *Glycobiology*, 14, 3: 275-292

Tini M., Jewell U. R., Camenisch G., Chilov D., Gassmann M. 2002. Generation and application of chicken egg- yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 131: 569-574

- Tressler R. L., Roth T. F. 1987. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 32: 15406-15412
- Vaughn D. E., Bjorkman P. J. 1997. High affinity binding of the neonatal Fc receptor to its IgG ligand requires receptor immobilization. *Biochemistry*, 36: 9374-9380
- Vaughn D. E., Bjorkman P. J. 1998. Structural basis of pH- dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure*, 6, 1: 63-73
- Vozelj M. 2000. *Temelji imunologije*. 1. izd. Ljubljana, DZS d.d.: 552 str.
- Wang A. C., Faulk W. P., Stuckey M. A., Fudenberg H. H. 1970. Chemical differences of adult, fetal and hypogammaglobulinemic IgG immunoglobulins. *Immunochemistry*, 7: 703-708
- Ward E. S. 2004. Acquiring maternal immunoglobulin: different receptors, similar functions. *Immunity*, 20: 507-508
- Warr G. W., Magor K. E., Higgins D. A. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 16, 8: 392-398
- West A. P., Bjorkman P. J. 2000. Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex- related Fc receptor. *Biochemistry*, 39: 9698-9708
- West A. P., Herr A. B., Bjorkman P. J. 2004. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC- related Fc receptor, is a phospholipase A<sub>2</sub> receptor homolog. *Immunity*, 20: 601-610
- Zhang W. W. 2003. The use of gene- specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discovery Today*, 8: 364-367

## ZAHVALA

Rada bi se zahvalila svoji mentorici, prof. dr. Mojci Narat, za strokovno vodenje, nasvete in pomoč pri nastajanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Vladki Čurin-Šerbec za temeljit pregled diplomskega dela in koristne pripombe.

Prav tako se zahvaljujem vsem tistim na Oddelku za zootehniko, ki so mi pri praktičnem delu v laboratoriju kakorkoli priskočili na pomoč.

Iskrena hvala mami, očiju ter bratu za vso podporo v vseh mojih vzponih in padcih ter finančno pomoč pri študiju.

Hvala tebi dragi Andrej, ki me sprejemaš tako kot sem.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste mi vsa ta leta stali ob strani.