

A Pályázat által biztosított keretek lehetővé tették a *Drosophila melanogaster* veleszületett immunitásának vizsgálatában kapott korábbi eredményeink értelmezését, valamint a vizsgálatok új irányokba történő kiterjesztését.

- 1.) Meghatároztuk több, korábban véresejtantigénként jellemzett molekula kódoló génjét és több véresejtantigén funkcióját jellemeztük.
- 2.) Azonosítottunk több, az embrióban, a lárvában és a kifejlett rovarban megnyilvánuló véresejtantigént.
- 3.) Genomszintű genetikai screent kezdtünk „in vivo”, melynek segítségével a differenciálódási vonalak és a véresejtartmentumok fejlődését szabályozó géneket azonosítottunk.
- 4.) A véresejtantigének jellemzése, „in vivo” használató genetikai konstruktok létrehozása és a genetikai screen során kapott előzetes eredmények alapján egy eddig nem azonosított immunológiai kompartmentum létrehozását követeltük.
- 5.) A *Drosophila* antigének feltételezett gerinces megfelelőit vizsgáltuk „in silico” módszerekkel.

#### **Ad 1.:**

**1.1. P1 NimC1** Meghatároztuk az általunk korábban azonosított P1 antigén génje (nimród) környezetében és a *Drosophila* genomában másutt felismert homológok megnyilvánulásának a mintázatát. A *Drosophilában* és az egyéb fajokban jellemzett homológok „in silico” analízise egy új típusú EGF-repeat, az ún. nim- (Nimród) repeat leírását tette lehetővé, melynek alapján a molekulát nimC1-nek neveztük. Kimutattuk, hogy nimC1 molekula részt vesz fagocitózis folyamatának a szabályozásában

A NimC1 molekulát kódoló gén környezetében azonosított molekulákról megállapítottuk, hogy egyedül a nimA nem nyilvánul meg hemocitákon. A többi molekulát megkíséreltük *E.coliban* expresszálni. Miután valamennyi nim konstrukt a termelő baktériumra nézve toxikusnak bizonyult, eukarióta expressziós rendszerben is megkíséreltük a gént expresszálni, azonban a konstrukt itt is toxikusnak bizonyult. A Nim repeatek részleesebb analízise fölvetette azt a lehetőséget, hogy a konstrukt toxicitását általános antimikrobiális hatás eredményezi. Ennek vizsgálatára a nimC1 gén kódoló régiójából egy Nim repeateet kódoló és egy, a repeatet nem kódoló régiót expresszáltunk baktériumban. A nim repeateet tartalmazó konstrukt toxikusnak bizonyult, míg a repeatet nem tartalmazó konstrukt nem volt toxikus. Hazai együttműködés keretében megkezdtük a tesztelt régióknak megfelelő peptidek antimikrobiális/baktericid hatásának a tesztelését.

**1.2.** Meghatároztuk a sejt-közvetítette immunválasz tokképző reakciójában résztvevő sejtek, a lamellociták differenciálódásának minimális, de szükséges feltételeit.

**1.3.** A lamellocitákban specifikusan megnyilvánuló, korábban általunk azonosított L5 antigénről igazoltuk, hogy az a filamin magas molekulású izoformája és, hogy a molekula a lamellocita-differenciálódás szuppresszora.

**1.4.** A lamellocita-specifikus Hella/Atilla antigénnek 8 funkcióvesztéses allélját hoztuk létre, melyeknek biológiai tesztekben történő jellemzése folyamatban van. Egy, a leghosszabb deléciót hordozó allélt részletes genomikai analízisnek vetettünk alá. A microarray analízist a több mint 18500 transzkriptet tartalmazó Affymetrix GeneChip® *Drosophila* 2.0 Array alkalmazásával végeztük. Összesen 3507 transzkript esetében kaptunk génexpressziós változást a vizsgált három időpont bármelyikében, melyek közül a jelentős expressziós különbséget mutató géntermékeket több csoportba soroltuk. A hella mutánsban mindhárom időpontban emelkedett, illetve csökkent expressziós szintet mutató gének egy része bizonyított vagy potenciális immunfunkcióval rendelkezik, valamennyien az Attacin antimikrobiális peptid családba tartoznak. Az eredmények a *Drosophila* humorális és sejt-közvetítette immunválaszának a kapcsolatára utalhatnak.

Az atilla-géntől 3' irányban elhelyezkedő EP elem mobilizálásával sikeresen létrehoztunk nyolc, az atilla gént érintő deléciót, melyekből törzseket alapítottunk. A deléciós törzsek funkcionális vizsgálatával megállapítottuk, hogy valamennyi deléciós törzs azonos fenotípust mutatott, a kontroll perfekt excíziós törzsekkel. A deléciót homozigóta formában hordozó törzsek életképesek, egyedfejlődésükben nem tapasztaltunk étellel összeegyeztethetetlen, az immunválaszban vagy a vérsejtdifferenciálódás során megfigyelhető változást. Az atilla gén deléciós, funkcióvesztéses alléljeit genetikai interakciókban kezdtük vizsgálni; interakciós partnerként olyan mutációkat használunk, amelyek a vérsejtek, ezen belül is elsősorban a lamellociták differenciációjában és/vagy funkciójában a vad típustól eltérést mutatnak. Az első genetikai interakciót az *l(3)mbn-1* mutációval hoztuk létre. További kettős mutánsok vizsgálata van folyamatban.

Az atilla gén funkcióyerésének illetve ektopikus expressziójának vizsgálatára létrehoztuk az *atilla* gén teljes cDNS-ét tartalmazó *UAS-atilla* konstruktot, amelyeknek legyekbe transzformálásával a kísérletekhez megfelelő transzformáns törzset hoztunk létre. Az *UAS-atilla* konstruktot hordozó legyekben az atilla expresszióját először a *HemeseGal4* meghajtóelem használatával vizsgáltuk. A meghajtás következtében az Atilla fehérje a plazmatocitákon és kristálysejteken is kifejeződik. Az ektopikus expresszió élettani következményeit jelenleg vizsgáljuk. Eddigi eredményeink szerint a gén ektopikus expressziója plazmatocitákban nem befolyásolja a fagocitózist.

Több adatunk arra utal, hogy a lárvában kizárólag a lamellocitákon megnyilvánuló *atilla* gén az embrión és az adultban is megnyilvánul, ezért az *atilla* gén expressziójának vizsgálatát kiterjesztettük az egyedfejlődés különböző stádiumaiban fejlődő egyéb szövetekre. Ez további érdekes kérdéseket vet fel az atilla gén stádium- és szövetspecifikus expresszióját illetően, amelynek megválaszolását is célul tűztük ki. Az ehhez szükséges kísérletek - az *atilla* expresszió pontos helyének és időbeni változásának vizsgálata - jelenleg folyamatban vannak.

## **Ad 2.:**

**2.1.** A perikardiális sejteken, a lárva és az embrió vérsejtjein megnyilvánuló antigént (H1) azonosítottunk (Kurucz et al. Acta biol. Hungarica)

**2.2.** Az adult vérsejtjeire általánosan jellemző immunológiai markerként azonosítottuk az Ad1 antigént. Meghatároztuk a marker expressziójának a szintjét az egyedfejlődés különböző stádiumaiban valamint a különböző vérsejtpopulációkban. Megállapítottuk, hogy a molekula ez egyedfejlődés során a lárvaiban alacsony szinten expresszálódik, magas szinten a bábállapotban jelenik meg először a vérsejtek citoplazmájában, majd az adult stádiumot elérve a vérsejtek felszínén is megjelenik. A sejtmembránhoz kapcsolt molekula molekulatömege 10kDa. A molekula az immunológiai vizsgálatok és a Western-blot analízisek alapján a vérsejt eredetű S2 sejtvonalonban is megnyilvánul, amely megkönnyíti izolálását és szekvenálását. Megállapítottuk továbbá, hogy a molekula megjelenésével párhuzamosan az általunk korábban azonosított Hemese-molekula eltűnik a sejtek felszínéről. Ezek az eredmények és a vérsejt-transzplantációs kísérletek arra utalnak, hogy az egyedfejlődés során a vérsejtek nem passzív túlélők, hanem a vérsejtekben az egyedfejlődés során egy finoman szabályozott genetikai program valósul meg az egyedfejlődés során. A program egyes lépéseinek a megértéséhez közelebb vihet a kódoló gén és a transcript és a fehérje részletesebb jellemzése. A molekula a vérsejt-eredetű S2 sejtvonalonban is megnyilvánul, ezért S sejtekből cDNS expressziós génkönyvtárat hozunk létre valamint MALDI analízis elvégzéséhez immunprecipitáljuk az antigént.

**2.3.** A posterior vérképző szövetrel történt immunizálást követően lamellocita-specifikus markerket azonosítottunk (l. 3.1.)

## **Ad 3.:**

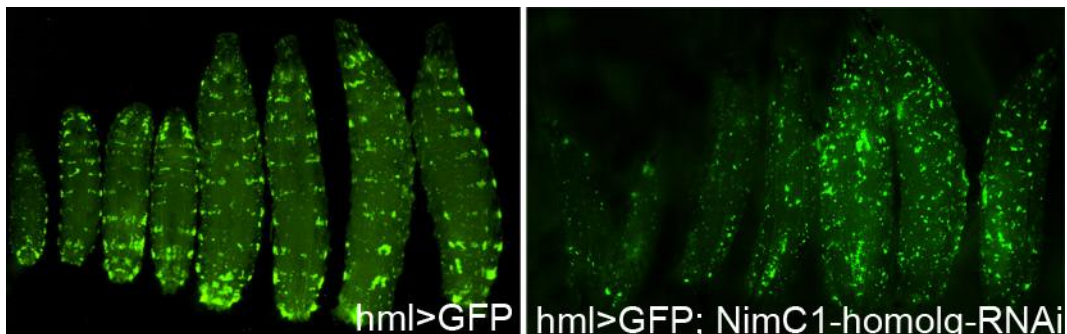
**3.1.** Funkcióvesztéses genetikai screenből azonosított, meghatározott, kis méretű deléción, a Df(2L)E-n, belül térképeződő 9 tagú letális komplementációs csoport (Pis118/4, Pis55B, Pis103, PisS2r49a/6, Pis94A, PisR19, PisR20, , Pis94E) analízisével igazoltuk, hogy a Piros szem (Pis) gén mutációi egy epigenetikus represszor gént azonosítanak, amelynek mind a homeotikus gének regulációjában, mind a vérsejtek determinációjában szerepe van. A funkcióvesztéses mutánsok korai bábletálisak. A mutánsok a klasszikus Polycomb-csoport génjeire jellemző homeotikus transzformációkat mutatnak. A homo-, és transz-heterozigóta harmadik stádiumú lárvaiban erősen megnövekszik a vérsejtek száma. A különböző allél-kombinációkban háromtól akár tízszeres sejtszám növekedés történik. A homozigóta mutáns kombinációk egy részében a lárvaik némelyikében a normálisnál nagyobb lymph gland-et találtunk. Általában jellemző viszont a szeszilis szövetben lévő sejtek számának erős megnövekedése. Azt tapasztaltuk, hogy a mutáns lárvaiban a keringésben megemelkedik a speciális ellenanyaggal kimutatható kristálysejtek száma, ezzel párhuzamosan a kutikulához belülről kitapadt kristálysejtek száma viszont egyértelműen csökken. Különleges fenotípusként a Pis mutáns kombinációkban immunstimuláció nélkül is nagy

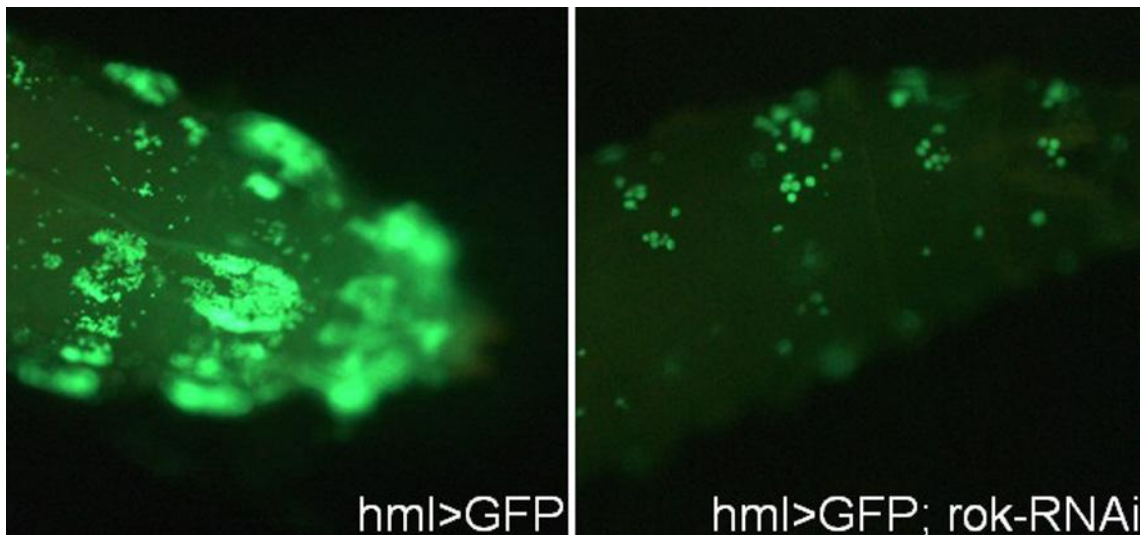
mennyiségben jelennek meg lamellociták. Van olyan Pis mutáció (Pis110), amely dominánsan, heterozygóta állapotban is képes lamellocita differenciálódást kiváltani.

**3.2.** Genomszintű funkcióvesztéses screen kezdtünk a vérsejtek differenciálódását szabályozó faktorok azonosítására. A kísérletéhez a NIG-Fly (National Institute of Genetics, Japan): RNAi Fly Stock Center által forgalmazott törzsgyűjteményt használjuk egy vérsejtspecifikus meghajtóelemet hordozó törzssel kombinációban. A screen során eddig 2600 törzset kereszteztünk és elemeztünk az eddigi eredményeink szerint tíz, valamelyik vérsejtkompartimentum fenotípusát érintő gént találtunk, melyeket a következő táblázatban mutatunk be.

| Törzs száma | Gén  | A szesszilis szövet fenotípusa   |
|-------------|--|--|
| 6476R-1     | Su(var) 3-9; Suppresor of variegation          | sejtszám növekedés   |
| 6413R-3     | Dis 3  | sejtszám növekedés   |
| 6238R-4     | ssh; slingshot                                 | keringő sejtek száma megnövekedett   |
| 6474R-1     | e(y)1; enhancer of yellow                      | sejtszám csökkenés   |
| 6452R-4     | TwdlO; tweedle O                               | sejtszám csökkenés   |
| 6233R-1     | Ufd1-like; Ubiquitin fusion degradation 1-like | sejtszám csökkenés   |
| 16720R-2    | 5HT 1A, serotonin receptor 1A                  | sejtszám csökkenés   |
| 6620R-2     | ial; Ipll-aurora like kinase                   | sejtszám csökkenés és nagyméretű sejtek  |
| 9774R-1     | rok; Rho kinase                                | sejtszám csökkenés és nagyméretű sejtek  |
| x           | NimC1 homológ                                  | A szesszilis szövet szerkezete felbomlik, a keringésben nincsenek lamellociták |

A gének további jellemzése folyamatban van. Az alábbi képek mutatják be a két legmarkánsabb fenotípust, amelyet a szesszilis szövet elbomlása jellemez, immunstimuláció hiányában is.





#### Ad 4 .:

**4.1.** A *Drosophila* lárvák vérsejtjeinek immunfestése (Kurucz et al. Acta Biol. Hungarica) valamint a korábban azonosított Hemse gén regulátor régiójának felhasználásával általunk létrehozott HeGAL4-UAS-GFP konstrukttal (Zettervall et al, PNAS) végzett kísérletek abba az irányba mutattak, hogy a lárvában létezik egy eddig nem azonosított, funkcióját tekintve egységesnek mondható vérsejt-kompartimentum, mely a lárva poszterior régiójában, a subepiteliális szövetrétegben helyezkedik el. A kompartimentum fejlődése a poszterior spirákulumok mellett elhelyezkedő sejtsomókból (általunk poszterior vérképző szövetnek elnevezett – Posterior Hematopoietic Tissue) indul és anterior irányba terjed. A kompartimentum szerkezete immunstimulációt követően felbomlik és a keringésben lamellociták jelennek meg. A poszterior vérképző szövet sejtjeivel történt immunizálást követően előállított panel elemzése folyamatban van, azonban már azonosítottunk olyan markereket, amelyek az érett vérsejteken vannak jelen, sőt egyesek kizárólag a lamellocitákon. Mindez azt sejteti, hogy a lamellociták előalakjai – az eddigi feltételezésekkel ellentétben – nem a központi nyirokszervből, hanem ebből a kompartimentumból származnak. Ezt a feltételezésünket a későbbiek során több kísérleti rendszerben igazoltuk (Mákus és mtsi. PNAS, 2009)

#### Ad 5.:

**5.1.** A *Drosophila* antigének feltételezett gerinces megfelelőit vizsgáltuk „in silico” módszerekkel. Következtetések levonásához kísérletes munkára van szükség, melyet hazai együttműködés keretében tervezünk.

**Megjegyzés:** Az általunk azonosított markereket a Drosophila vérsejt-differenciálódását és funkciót vizsgáló laboratóriumokban rutinszerűen használják (eddig 314 reagens mintát küldtünk).