

A Program lehetőséget adott a *Drosophila* sejt-közvetítette immunitásában résztvevő sejtek és szövetek jellemzésére, a veleszületett immunitás és a vizsgálatára alkalmas biológiai rendszerek ismertetésére az egyetemi oktatás keretében valamint hallgatók laboratóriumi gyakorlati képzésére.

A veleszületett immunitás molekuláris és sejtszintű vizsgálatára széleskörűen használt modellszervezet a *Drosophila melanogaster*, mely immunválaszának sok eleme párhuzamba állítható az emlősök immunrendszerével. A rovarok immunrendszere azonban önmagában is vizsgálatra érdemes, mert a rovarok emberi paraziták vektorai lehetnek, ugyanakkor a rovarpatogén szervezetek gyakran használatosak mezőgazdasági kórokozók kontrolljában. *Drosophilában* a mikrobák antimikrobiális peptidek termelését váltják ki, melynek szabályozása, folyamata és hatásmechanizmusa jól jellemzett. A mikrobákkal és parazitákkal szemben a rovarok sejt közvetítette válasszal is védekeznek, mely magában foglalja a testidegen részecskék felismerését, a baktériumok bekebelezését és a paraziták elhatárolását és elpusztítását. Ennek a sejt közvetítette válasznak a folyamata és szabályozása azonban alig ismert. Kísérleteinkben a sejt közvetítette immunválasz megismeréséhez alapvetően szükséges rendszert fejlesztünk és ezt az általunk létrehozott rendszert használjuk a veleszületett immunitás folyamatainak a megismeréséhez *Drosophila* modellszervezetekben. A kísérletek során a szesszilis szövetet, mint a tokképző reakcióban központi szerepet játszó véresejtképző szövetet ismertük fel, valamint a bekebelezésben szerepet játszó molekulákat azonosítottunk és jellemeztünk. Az általánosan használt *Drosophila melanogaster* mellett az immunológia területén eddig nem alkalmazott, de a *Drosophila* Genom Project keretében jellemzett *Drosophila* fajok vizsgálatával terjesztettük ki kísérleteinket, melyekben egy eddig ismeretlen, feltehetően a paraziták elleni védekezésben szerepet játszó sejtet azonosítottunk. A pályázati támogatás biztosította immunológiai kurzusok tartását a Szegedi Tudományegyetem és a Szegedi Biológiai Kutatóközpont égisze alatt, valamint Ph.D., M.Sc., és B.Sc. fokozatok szerzését a téma kutatásában részt vevő hallgatók számára.

## **Eredmények:**

### **1.) Véresejt-markereket azonosítottunk és jellemeztünk *Drosophila melanogaster*-ben**

a.) A lamellociták azonosítására alkalmas, korábban létrehozott szerológia markerrendszer mellett a lamellociták megfigyelésére és fejlődésük nyomon követésére használható *in vivo* markert azonosítottunk. A marker a korábban leírt L1 (Atilla) molekulát kódoló génben helyezkedik el és expressziója megegyezik az L1 markerével (Honti V, Kurucz E, Csordas G, Laurinyecz B, Markus R, Ando I., *In vivo* detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster* Immunol. Lett. 126: 83-84 (2009)). A markert más laboratóriumokban is sikerrel használják a véresejt-differenciálódás vizsgálatában.

b.) Az adult *Drosophila melanogaster* vérsejtjeire jellemző Ad1 antigénről megállapítottuk, hogy valamennyi *Diptera*-ban, így a törzsgyűjteményekben fenntartott összes *Drosophila* fajban is a bekebelezést végző sejteken, a plazmatocitákon nyilvánul meg, valamint jelen van a szövettenyészetben fenntartott vérsejt-eredetű sejtvonalakon is. A molekulát S2 sejtvonalon is 15 kDa molekulatömegű fehérjeként azonosítottuk. Az S2 sejtvonalból izolált fehérje MALDI analízise eddig nem hozott értékelhető eredményt.

c.) A lamellocita-specifikus nukleáris antigének jellemzése során megállapítottuk, hogy az 5B2 (IgM) ellenanyag által felismert a lamellociták sejtmagjában jelenlévő fehérje a magmembránban vagy valószínűleg a laminához kapcsoltn helyezkedik el és a perifériás heterokromatinhoz is kapcsolódik (Vilmos Péter, SZBK, Fejlődésbiológiai Csoport). Az antigén izolálása az 5B2 ellenanyag segítségével eddig nem sikerült, ezért Ig-izotípus „switch-mutáns” létrehozását tervezzük.

d.) A szesszilis szövetrel történt immunizálást követően lamellocita markereket azonosítottunk, mely megerősítette azt a feltevésünket, hogy a szesszilis sejtek funkcionális egységként működő vérsejtképző szövetet alkotnak és lamellocita előalakok forrásaként meghatározó szerepet játszanak a vérsejtek differenciálódásában. Meghatároztuk a szesszilis szövetrel történt immunizálást követően azonosított antigének molekulatömegét, így lehetővé válhat izolálásuk és további molekuláris jellemzésük. A szesszilis szövetnek a lamellociták differenciálódásában betöltött szerepét kompartmentum- és sejt-sors-analízissel igazoltuk (lásd 2. pont alatt: (Márkus és mtsi. PNAS 106: (12) 4805-4809 (2009), Honti és mtsi. Mol. Immunol. 47:(11-12) 1997-2004 (2010)).

e.) A korábban előállított ellenanyagpanel felhasználásával funkcionális tesztek végztünk, melynek eredményeként az apoptotikus sejtek bekebelezésében résztvevő receptorfehérjét azonosítottunk és jellemeztünk (Kaz Nagaosa, Ryo Okada Saori Nonaka, Kazuki Takeuchi, Yu Fujita, Tomoyuki Miyasaka, Junko Manaka, István Ando, Yoshinobu Nakanishi, Integrin  $\beta$ -mediated Phagocytosis of Apoptotic Cells in *Drosophila* Embryos, J. Biol. Chem., Vol. 286, Issue 29, 25770-25777, 2011). A kísérletsorozat keretében új nemzetközi együttműködés alakult ki.

f.) A markeranalízis során vizsgált és részletesen jellemzett egyik ellenanyag (Kurucz és mtsi. P NATL ACAD SCI USA 100: 2622-2627 (2003), hasznosnak bizonyult egy biofizikai szenzor fejlesztésében (Der A, Valkai S, Mathesz A, Ando I, Wolff EK, Ormos P Protein-based all-optical sensor device SENSOR ACTUATOR B-CHEM **151**: (1)26-29 (2010))

**2.) Genetikai markerekkel jellemeztük a vérsejtképző szöveteket, meghatároztuk a vérsejtképzésben betöltött szerepüket, megállapítottuk a vérsejtek differenciálódásának plaszticitását és jellemeztük a plaszticitás sajátosságait.**

A sejt közvetítette immunválasz során speciális sejtek - a lamellociták - differenciálódnak, melyek részt vesznek a testidegen részecskéknek a saját szövetektől történő elhatárolásában és elpusztításában. Ezeknek a sejteknek a szöveti eredetére valamint előalakjainak a természetére és differenciálódására vonatkozóan több elmélet született, azonban nem létezett az elméletek vizsgálatára/tesztelésére alkalmas kísérleti rendszer. A Projekt keretében a genetikai, immunológiai és fiziológiai módszerek kombinálásával létrehozott vizsgálati rendszer alapkérdések megválaszolását tette lehetővé. Kísérleteink szerint a lamellociták előalakjainak fő származási helye a szesszilis szövet (Markus R, Laurinyecz B, Kurucz E, Honti V, Bajusz I, Sipos B, Somogyi K, Kronhamn J, Hultmark D, Ando I., Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster* P NATL ACAD SCI USA 106: (12)4805-4809 (2009)). A szesszilis szövetnek ez a szerepe nem kizárólagos, a központi nyirokszerv is részt vehet a lamellociták képzésében. A sejt-sors- és sejt-vonalanalízishez létrehoztunk és sikerrel alkalmaztunk egy olyan markerrendszert, mely aktivitását a sejtosztódások és a differenciálódás során végig megőrzi. Kompartmentum-specifikus genetikai rendszer és molekuláris markerek kombinációját használva megállapítottuk, hogy mind a kompartmentumok, mind pedig a differenciálódási vonalak nagyfokú plaszticitással rendelkeznek, mely eredményünk egy régóta húzóó, a sejtvonalak eredetéről szóló vitát döntött el. Megállapítottuk, hogy a bekebelezést végző sejtek immunindukciót követően tokképző sejtekké alakulhatnak (Honti V, Csordas G, Markus R, Kurucz E, Jankovics F, Ando I., Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster* Mol. Immunol. 47:(11-12) 1997-2004 (2010)). A rendszer segítségével megállapítottuk, hogy a vérsejtképzés során az embrionális központi nyirokszerv és az embrionális makrofágok (későbbi szesszilis szövetet is alkotó sejtek) valamint a belőlük származó vérsejt-kompartmentumok élesen elkülönülnek egymástól. A sejt közvetítette immunválasz során az immunsejtek képzésében mindkét kompartmentumból származó sejtek részt vesznek. Megállapítottuk továbbá, hogy a plazmatociták, az eddigiekkel ellentétben, nem terminálisan differenciálódott sejtek, hanem az immunválasz során lamellocitákká alakulhatnak. A lamellociták terminálisan differenciálódott sejtek, melyek a bábállapotban elpusztulnak. A sejt-vonaljelölés és a sejt-sors-analízis segítségével azt is megállapítottuk, hogy az adult vérsejtjeinek a többségét képező plazmatociták, a baktériumok bekebelezését végző sejtek képzéséhez mindkét fő kompartmentum hozzájárul. A sejt-sorsok végső determinációjának megismerését a lárva-báb-adult átment jellemzésével tervezzük. A központi nyirokszervből származó sejtek további vizsgálatára egy általunk kifejlesztett genetikai meghajtóelemen (*hdc-Gal4*) alapuló speciális rendszert hoztunk létre, melynek molekuláris jellemzése - a rendszer használatával párhuzamosan - folyamatban van.

### **3.) A vérsejtképzés epigenetikai szabályozásában résztvevő epigenetikus represszor, a *dSfmbt*, és egy mestergén, a *Lz* kölcsönhatásának a vizsgálata**

Kísérleteinkben, melyeket a Genetikai Intézet Fejlődésbiológia Csoportjában Bajusz Izabellával és Gyurkovics Henrikkel végeztünk a DSFMBT (SCM-RELATED GENE CONTAINING FOUR MBT DOMAINS) fehérjének a vérsejtek differenciálódásában betöltött szerepét vizsgáltuk. A DSFMBT egy epigenetikus represszor (A POLYCOMB-csoport tagja), mely a DNS-kötésre képes PLEIOHOMEOTIC fehérjével egy komplexben található. Kísérleteinkben több független funkcióvesztéses allél fenotípusát analizáltuk. Megfigyeltük, hogy a homozigóta *dSfmbt* lárvákban immunindukció nélkül is megjelennek lamellociták a keringésben. A mutánsokban a teljes vérsejtszám és a kristálysejtek száma egyaránt megnövekedett. Egy transzgenikus (enhanszer-csapdázó) riporter-beépülés segítségével kimutattuk, hogy homozigóta *dSfmbt* mutáns háttéren a kristálysejtek determinációjában kulcsszerepet játszó *lozenge (Lz)* gén expressziója fokozódik.

Kimutattuk, hogy a hőérzékeny *Lz* allélokra homozigóta lárvák keringésében a restriktív hőmérsékleten lamellociták jelennek meg, míg az indukált lárvákban a vad kontrollhoz képest kevesebb lamellocita képződik. *In vivo* vérsejttípus specifikus genetikai kettős jelölések segítségével végzett kísérleteink szerint a *dSfmbt* mutánsban a lamellociták számának növekedését a kristálysejtek számának csökkenése kíséri.

Lehetséges, hogy a lamellocita sejtsors determinációjához alacsonyabb LZ fehérje szint is elegendő, míg a kristálysejt irányú differenciálódáshoz magasabb szintű *Lz* expresszió szükséges. Feltételezésünk szerint a *dSfmbt* mutánsban a represszió mértékének csökkenése következtében kialakuló alacsony LZ dózis miatt a lamellocita sejtsors válik dominánssá a kristálysejtsorssal szemben. Mivel a felhasznált hőmérséklet érzékeny *lozenge* allélok háttérében szignifikánsan csökkent ugyan a lamellociták száma a restriktív hőmérsékleten, de azok nem tűntek el a keringésből teljesen, feltételezhető, hogy a *Lz* mestergén aktiválódása valószínűleg nem az egyetlen útvonal, melyen keresztül a lamellocita irányú differenciálódás megvalósulhat.

### **4.) A *nim* génklaszter és -kromoszómaregión filogenetikai konzerváltsága és a régió génjeinek funkciói**

A Nimrod szupercsalád génjeinek nagy része a *Drosophila melanogaster* genomjában egymás tőszomszédságában helyezkedik el a második kromoszóma 34E régiójában és ez a klaszterizáció egyéb fajok genomjaiban is megfigyelhető. További ízeltlábú genomok vizsgálata során azt találtuk, hogy a szupercsalád tagjai egyéb géncsaládokkal együtt egy nagyobb időléptékben konzervált génklasztert alkotnak. A Nimrod klasztert a *nimrod*

gén családba tartozó géneken kívül az *Ance* gén családba tartozó gének, három, általunk *Vajk-1*, *-2*, *-3*-nak nevezett gén és a *centaurin gamma 1A* (*cenG1A*) gén alkotja. A Nimrod klaszter a konzerváltságának időléptéke (300-350 millió év) miatt önmagában is rendkívül érdekes, de számunkra az is fontossá teszi, hogy irodalmi adatok szerint a *D. melanogaster* genomjában az immungének rendszeresen, klaszterekbe tömörülve találhatók. A klaszterek génjei gyakran közös szabályozás alá esnek, és egyazon biológiai folyamatban játszanak szerepet. A klaszterben található *nimrod* gének mellett az *Ance* gén család és a *centaurin gamma 1A* gén, valamint a *Vajk* gének esetében is vannak olyan kísérleti adatok, melyek ezen gének immunitással összefüggésbe hozható funkciójára utalnak. Mindezeket, valamint a klaszter konzerváltságát figyelembe véve föltételezhető, hogy a Nimrod klaszter a rovarok veleszületett immunitásában fontos szerepet játszó „funkcionális modul”. Nem rokon gének által alkotott, ilyen léptékben konzervált génklaszter a szakirodalomban kivételes érdeklődésre tarthat számot, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy a klaszter funkciójára is van hipotézisünk. A Nimrod génklaszter és kromoszómaregión *in silico* vizsgálata során megerősítettük, hogy régió génjei a rovarok immunválaszában szerepet játszó egységet, „funkcionális modult”, képeznek (Somogyi K, Sipos B, Penzes Z, Ando I. A conserved gene cluster as a putative functional unit in insect innate immunity, FEBS Lett. 584: (21)4375-4378 (2010)). A NimC1- megismerésére vonatkozó kísérleteink eredményei tovább erősítik a funkcionális modul létét, amennyiben a NimC1 molekulához alapvető immunfunkciót tudunk rendelni. Előzetes adataink szerint (Zsámboki és mtsi., kézirat) a fehérje kötődik baktérium sejtekhez így szerepe az opszonizáció és a felismert testidegen struktúráknak a sejtmembránhoz kötésében igazoltnak látszik. A Nimrod-régióban kódolt többi fehérje (Somogyi és mtsi., FEBS Lett.584:4375, 2010) funkciójának a meghatározása folyamatban van.

## 5.) A sejt közvetítette immunválasz lefolyása a *Drosophila* nemzetség fajaiban

A *Drosophila* Genom Projectnek köszönhetően egyre több *Drosophila* faj genomja kerül szekvenálásra ezért kínálta magát az a lehetőség, hogy filogenetikai vizsgálatokat végezzünk, azaz a *Drosophila melanogaster* mellett egyéb fajokban is meghatározzuk a véresejtmarkerek megnyilvánulását. Megállapítottuk, hogy a legtöbb reagens kizárólag a leggyakrabban vizsgált *melanogaster* csoport fajainak a véresejtjeivel reagál. A *Drosophila melanogaster*ben azonosított markerek általában nem alkalmazhatók egyéb fajok véresejtjeinek jellemzésére. Ez alól két kivételt találtunk: az egyik a korábban azonosított Ad1, mely minden, eddig tesztelt fajon a plazmatociták azonosítására alkalmas, a másik a *D. bipectinata*-ban azonosított egyik plazmatocita-marker, mely minden hozzáférhető *Drosophila* faj plazmatocitáján megtalálható.

A filogenetikai elemzés során észleltük, hogy egyes fajokban nem képződnek lamellociták hanem –speciális sejtizolálási körülmények között - sokmagvú óriássejtek képződnek. A sejtek alaktani sajátosságai hasonlóak egyes granulómák képződésében szerepet játszó

sokmagvú óriássejtek megjelenéséhez, ezért úgy gondoltuk, hogy amennyiben ezek a sejtek is a tokképzésben vesznek részt, működésük megismerése révén közelebb jutunk a garnulóma-specifikus óriássejtek megismeréséhez. Első lépésben az újonnan felfedezett sejtípusokra specifikus markereket azonosítunk, majd a markerek segítségével megállapítottuk, hogy az óriássejtek valóban effektorsejteként szerepelnek a tokképző reakció során. Az ismeretlen sejtípus elektronmikroszkópos vizsgálata szerint a sejtek valóban óriássejtek, melyeknek magvai között nem látható sejtmembrán.

A nyúlványos véresejtek a *Drosophila ananassae* csoportba tartozó *Drosophila ananassae*-ra és *Drosophila bipectinata*-ra jellemzőek; ezek azok a fajok, amelyekben először észleltük az óriássejtek meglétét. A több magvú óriássejtek több sejt egymással történő fúziójának eredményeként jönnek létre. A sejtek aktív mozgását és fúzióját dokumentáló filmeket készítettünk. A sejtvázas aktin és tubulin filamentumainak a vizsgálata megerősítette a korábbi elektronmikroszkópos vizsgálataink eredményeit, melyek szerint a sokmagvú óriássejtek egymagvú sejtek sejtmembránjainak a fúziójával jönnek létre. A pályázat keretében azonosított óriássejtekkel rendelkező fajok eddig nem ismert, példátlan hatékonyságú parazita-ellenes immunválasszal rendelkeznek; a kivételes hatékonyságú immunválasz folyamatát több oldalról is vizsgáljuk. A sejt közvetítette immunválasz nem az eddig általánosan észlelt és megismert melanizációs láncreakciót is magába foglaló módon zajlik, hanem egyéb, eddig ismeretlen, nem jellemzett úton. A jelenség sejtszintű és biokémiai hátterét vizsgáljuk. A *Drosophila ananassae* sejt-közvetítette immunitásának a megismerésére a faj véresejtjeit jellemző markereket azonosítottunk és elvégeztük a markerek előzetes biokémiai jellemzését. A markerek epitop-analízisének eredményeként megállapítottuk, hogy a nyúlványos óriássejtekre jellemző markeren több immunológiai epitóp található, ami lehetővé teszi az óriássejtekre jellemző molekula izolálását és a kódoló gén azonosítását.

A *Drosophila ananassae* genom-analízise során több, a *Drosophila melanogaster*-ben általunk is vizsgált gén regulátor régiójának megfelelő DNS-régiót azonosítottunk. A nagyfokú homológia alapján feltételezzük, hogy a regulátor régiók funkciója a két fajban egymáshoz hasonló, ezért lehetővé válik a különlegesen hatékony immunrendszerrel rendelkező *D. anassaeban*, a *D. melanogaster*éhez hasonló genetikai rendszer felépítése. A genetikai rendszer elemeinek összeállítása folyamatban van.

## **6.) A veleszületett immunitás**

A Veleszületett immunitás témakörében 2010-ben 18, 2011-ben 22 órából álló kurzust szerveztünk, melyeken összesen 84 hallgató vett részt. A kurzuson résztvevő hallgatók záróvizsgát tettek és a sikeres vizsgázók kreditpontokat kaptak. A laboratóriumban jelenleg három PhD hallgató, három szakdolgozó diák és két ösztöndíjas kutató dolgozik.

### **Egyéb eredmények:**

A Projekt keretében azonosított markerek és fejlesztett reagensek használata széleskörűen elterjedt a *Drosophila* immunitásának a vizsgálatában, és minden olyan kísérleti rendszerben, ahol a vérsejtek reakciói (szövetformálódás, tumor képződés, stb...) szerepet játszanak. Eddig több mint 800 kísérleti mintát bocsátottunk a kutató-közösség rendelkezésére.

Honti Viktor az egyetemi oktatáson túlmenően ismeretterjesztő cikket írt a Természet Világa (Természettudományi Közlöny, 143. évf. 3. füzet) című ismeretterjesztő folyóiratba „Génszabályozás a vérsejtképzés során” címmel, melyben feltüntettük, hogy Honti Viktor kutatásait az OTKA NK78024 számú pályázat keretében végzi.

Márkus Róbert kísérleti eredményeinket több, a tudományos kutatómunkát népszerűsítő fotókiállításon mutatta be. Mikroszkópos fotóival több nemzetközi díjat nyert, többek között elnyerte a Holland Tudományos Akadémia 200 éves fennállásának alkalmából rendezett fotópályázat fődíját. Tevékenységének elismeréseként a MTA Elnöke 2010-ben Akadémiai ElnökiDíj-ban  
részesítette.

Andó István munkásságát (... "a rovarimmunitás kutatásában elért kimagasló eredményeiért, továbbá tehetséges fiatalokból álló, nemzetközi hírű kutatócsoport létrehozásáért"...) 2011-ben a március 15-i Nemzeti Ünnepp alkalmából az MTA Elnökének felterjesztésére a Magyar Köztársasági Érdemrend Tiszti Keresztjével ismerték el.