

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A VELESZÜLETETT IMMUNITÁS MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA
DROSOPHILA MELANOGASTER MODELLSZERVEZETBEN**

Dr KURUCZ JUDIT ÉVA



**MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
GENETIKAI INTÉZET**

SZEGED

2017

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Célkitűzések	6
3. Eredmények és az eredmények megbeszélése	7
3.1. A <i>Drosophila</i> véresejtjein kifejeződő molekulák azonosítása	7
3.2. A paraziták elleni tokképző reakció molekuláris vizsgálata	7
3.3. A lamellocita differenciálódás vizsgálata	9
3.4. A <i>Drosophila</i> mikroorganizmusok elleni védekezésének új egysége, a <i>nimród</i> gén- és fehérje család	12
3.5. A szeptikus sérülést követő immunválaszban résztvevő gének azonosítása <i>Drosophilaban</i>	14
4. Az új eredmények összefoglalása	15
5. Az eredmények gyakorlati hasznosulásának lehetőségei	17
6. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke	18
7. A dolgozat témájában megjelent további közlemények	20
8. Anyagok és módszerek	21
9. Köszönetnyilvánítás	25

1. Bevezetés

A veleszületett immunitás a törzsfajlás korai szakaszában kialakult védekezési forma. Kulcsfontosságú elemei az evolúció során konzerváltak; egyes elemei a növény-és az állatvilágban egyaránt fellelhetők.

Az állatvilágnak, a fajok számát és változatosságát tekintve leggazdagabb rendszertani csoportját alkotó gerinctelen szervezetek, így a rovarok számára is a gyorsan és hatékonyan működő veleszületett immunitás biztosítja a mikroorganizmusok és a paraziták elleni védelmet. A veleszületett immunitás rovarokban történő vizsgálata önmagában fontos, mivel számos rovarfaj természetes élettere az állatvilág legtöbb fajára nézve patogén mikroorganizmusokat tartalmaz, így a rovarokon kapott ismeretek általános érvényűek lehetnek. Ezen túlmenően, számos rovarfaj növényi vagy állati megbetegedéseket okozó mikroorganizmusok és paraziták vektora, így a vektor-parazita kölcsönhatások megismerése a patogénnel szembeni védekezést is elősegítheti.

Gyakorlati megfontolások is hozzájárultak ahhoz, hogy a rovarok, ezen belül az egyedfejlődési és a genetikai vizsgálatokban hosszú idő óta kiemelkedő jelentőséggel bíró és széleskörűen alkalmazott *Drosophila melanogaster* vált az veleszületett immunitás vizsgálatának legnépszerűbb modellszervezetévé. A *Drosophila* genetikai állománya könnyen módosítható, géntermékei a kettősszálú RNS interferencia módszerével csendesíthetők, és a random mutagenézis mellett olyan korszerű genetikai eszközök állnak rendelkezésre az immunválasz különböző folyamataiban résztvevő gének szerepének megismeréséhez és a jelátviteli útvonalak térképezéséhez, mint a CRISPR/Cas9 rendszerrel történő genomszerkesztés. A *Drosophila* modellrendszer egyedülálló lehetőségeket biztosít a gének és géncsaládok kialakulásának vizsgálatában is, hiszen napjainkig a *Drosophila melanogaster*en kívül további 21 *Drosophila* faj genomszekvenciája vált ismertté.

A *Drosophila* testüregébe kerülő idegen anyagok felismerését a csírvonalban kódolt receptorok végzik, melyek a mikroorganizmusokra jellemző közös molekuláris mintázatokat ismernek fel. A testidegen részecskék felismerését követően aktiválódik a védekező rendszer humorális és sejt-közvetítette ága, antimikrobiális peptidek termelődnek, a mikrobákat fagocita sejtek kebelezik be, a nagyméretű parazitákat a vérsejtek, a hemociták több rétegű tokba zárva pusztítják el.

Az antimikrobiális peptideket kódoló gének és a génaktiválódást szabályozó jelátviteli útvonalak működése és kölcsönhatásai a múlt század nyolcvanas évei óta intenzíven kutatott terület. Kiderült, hogy a Gram-negatív és a Gram-pozitív baktériumok valamint a gombák egymástól eltérő jelátviteli utakat aktiválnak. Az aktivációt követően a mikroorganizmusra specifikusan ható antimikrobiális peptidek termelődnek és több, eredetileg a *Drosophilában* azonosított mintázatfelismerő receptorról bebizonyosodott, hogy gerinces ortológjaik szintén a veleszületett immunitás felismerő molekuláiként működnek.

A *Drosophila* sejt-közvetítette immunitásának alapkövei a vérsejtek, a hemociták. A hemociták, túlnyomó többségét az emlősökéhez hasonló professzionális fagocita sejtek, a plazmatociták alkotják. Az embrionális élet során a feji mezodermban kialakuló embrionális makrofágok az embrióban fejlődéstanilag meghatározott útvonalakat bejárva az idegrendszer kialakulásában és extracelluláris mátrix fehérjék termelésében vesznek részt, továbbá a természetes sejthalált szenvedett sejtek eltávolítását végzik. A lárvális élet során, valamint a kifejlett egyedben a gazdaszervezet immunvédekezését szolgálják, mikroorganizmusokat fagocitálnak és antimikrobiális peptideket termelnek, de a lárvába helyezett parazitoid darázspete körüli tokképzésben is szerepet játszanak. A *Drosophila* lárvában darázsfertőzést követően új típusú vérsejtek differenciálódnak, a lamellociták, melyek több rétegű tokba zárják a nagyméretű testidegen anyagokat. A *Drosophila* harmadik vérsejt típusa a citoplazmájában profenoxidáz kristályzárványokat tartalmazó kristálysejt. A kristálysejtek szétesése során kiszabaduló oxidoreduktázok hatására szabad gyökök és toxikus melanin képződik, melyek elpusztítják a tokba zárt darázspetét.

Az evolúció folyamán a rovarok és az emlősök fejlődése több millió évvel ezelőtt vált el egymástól, vérsejtképzésük nagyfokú hasonlóságot mutat. A vérsejtek kialakulása térben és időben több hullámban történik. A különböző funkciójú vérsejtek közös előalakokból fejlődnek, a vérsejtek kialakulásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak a törzsfajlás során konzerváltak, valamint a vérsejt elő-alalakok fenntartásában és a különböző vérsejt populációk leszármazási vonalainak meghatározásában transzkripciós szabályozó elemek vesznek részt. *Drosophilában* az embriogenezis korai szakaszában a feji mezoderma sejtjeiből képződnek az embrionális hemociták, amelyek a lárvális élet során két hemocita kompartmentumot, a nyílt keringési rendszerben áramló hemocitákat, valamint a testüreg falához és más szövetekhez kitapadt ún. szesszilis hemocitákat alkotják. Az embrió kardiogén mezoderájából alakul ki a *Drosophila* lárvá harmadik vérsejt kompartmentuma, a szívcső mentén elhelyezkedő páros

lebenyekből álló központi vérképző szerv, a "lymph gland", melyet a szakirodalom korábban a lárvális vérképzés kizárólagos szervének tekintett.

A vérsejtképződés és a veleszületett immunitás folyamatainak hasonlósága olyan távoli rendszertani csoportok között, mint az emlősök és a rovarok, nemcsak alátámasztják a veleszületett immunitás *Drosophila* modellrendszerben történő vizsgálatának létjogosultságát, de a *Drosophila* genetika és molekuláris biológia eszköztárát felhasználva új távlatokat nyithatnak ennek az ősi védekező rendszernek a megismerésében.

A kilencvenes évek közepén munkatársaimmal elhatároztuk, hogy az elsődleges immunválaszban szerepet játszó genetikailag át nem rendeződött receptorok tanulmányozását, a *Drosophila* modellrendszerben folytatjuk tovább és ennek során az emberi, a bovin, valamint a porcin vérsejtek CD (Cluster of Differentiation) rendszerének létrehozásában végzett korábbi munkáink tapasztalataira támaszkodunk. Ekkor a *Drosophila* immunrendszerének sejt-közvetítette folyamatairól még kevés ismeret állt rendelkezésre, molekuláris markerek hiányában a különböző hemocita alpopulációk azonosítása elsősorban morfológiai jegyek alapján történt. A *Drosophila* sejt-közvetítette immunitásának a vizsgálatához alapvető szükségletként mutatkozott olyan molekuláris markerek azonosítása, melyeknek alkalmazásával a differenciálódás különböző stádiumaiban lévő és az egymástól funkciójukban különböző vérsejtek egyértelműen elkülöníthetők egymástól.

2. Célkitűzések

Munkánk során a *Drosophila melanogaster* különböző típusú hemocitáin specifikusan megnyilvánuló molekuláris markerek azonosítását és a molekulák funkcióinak a megismerését terveztük. A markerek alkalmazásával a vérsejtképző szövetek és a differenciálódási vonalak azonosítását kívántuk megvalósítani, továbbá reméltük, hogy a hemocita-funkciók és a funkciók szabályozásának a megismerésére is lehetőségünk nyílik.

A *Drosophila* lárva testüregébe helyezett parazita peték a hemociták aktiválódását és differenciálódását váltják ki. Ennek az *in vivo* immunindukciós rendszernek az alkalmazásával a sejt-közvetítette immunválasz során differenciálódó tokképző sejtekben, a lamellocitákban megnyilvánuló géneket azonosítását és azok funkciójának meghatározását tűztük ki célul.

A lamellociták differenciálódását kiváltó tényezőket, valamint a lamellociták differenciálódásában szerepet játszó géneket és jelátviteli útvonalakat kívántunk azonosítani.

A *Drosophilában* kifejlesztett GAL4>UAS rendszert felhasználva olyan hemocita specifikusan működő meghajtó elemeket akartunk létrehozni, amelyek segítségével a hemociták kompartmentalizációja, illetve immunindukciót követő differenciálódása *in vivo* körülmények között is vizsgálható.

Meg kívántuk vizsgálni a szesszilis szövet hematopoezisben betöltött szerepét.

A *Drosophila* fagocita sejteken megnyilvánuló molekulákat, valamint a mikroorganizmusok bekebelezésében szerepet játszó új gének azonosítását is célul tűztük ki.

A *Drosophila* természetes körülmények között előforduló szeptikus sérülésének laboratóriumi modellezésével a sérüléseket követő bakteriális fertőzések elleni védekezésben résztvevő újabb géneket, valamint a mikroorganizmusok patogenitását kívántuk meghatározni.

3. Eredmények és az eredmények megbeszélése

3.1 A *Drosophila* vérsejtjein kifejeződő molekulák azonosítása

A különböző hemocita típusok immunválaszban betöltött szerepének vizsgálatához a plazmatocitákon, a kristálysejteken, illetve a lamellocitákon megnyilvánuló molekulákat azonosítottunk a laboratóriumunkban előállított monoklonális ellenanyagok felhasználásával. Az ellenanyagok által felismert antigének egy része minden vérsejten kifejeződött, más részük a morfológiai és funkcionális kritériumok alapján meghatározott hemocita heterogenitásnak megfelelően a fagocitáló plazmatocitákon, a tokképző lamellocitákon, vagy a melanizációs kaskád enzimeit tartalmazó kristálysejteken nyilvánultak meg. Ezeket a *Drosophila* immunsejtjeinek alpopulációit definiáló molekuláris markereket a human leukocitákon monoklonális ellenanyagokkal azonosított markerekhez hasonlóan klaszterekbe (CD) soroltuk.

3.2. A paraziták elleni tokképző reakció molekuláris vizsgálata

Drosophilában elsőként azonosítottunk egy, a lárvális hemociták minden típusán, a plazmatocitákon, kristálysejteken és a lamellocitákon egyaránt megnyilvánuló transzmembrán fehérjét. A molekulát kódoló gént, melynek a *Hemese* nevet adtuk, hemocitákból készített expressziós génkönyvtár ellenanyaggal történő szűrésével azonosítottuk. A *Hemese* gén által kódolt fehérje erősen hidrofób, transzmembrán régióját egy rövid, sejten belüli domén követi, amely potenciális tirozin, és szerin foszforilációs helyeket tartalmaz. Immunprecipitációt követő Western blot analízissel kimutattuk a *Hemese* molekula tömegének megfelelő tartományban a tirozin foszforilációját, amely a molekula jelátviteli folyamatokban játszott szerepére utal. Bár az adatbázisokban BLAST kereséssel nem találtunk *Hemese* homológokat, a magas O-glikoziláció (sziálsav tartalom) alapján a *Hemese* fehérje a gerinces szervezetek vörösvértestjeinek membránjába ágyazódott glikoproteinekhez, a glikoforinokhoz mutat hasonlóságot, így azonosításával a szialoforin fehérjecsaládot új, *Drosophila* eredetű taggal

gazdagítottuk. A *Hemese* specifikus kettősszálú RNS géntermék csendesítésével a *Hemese* fehérje kifejeződését gátolva beláttuk, hogy a fehérjét valóban a *Hemese* gén kódolja. A *Hemese* csendesített állatokban parazitoid darázs által kiváltott immunválaszt követően a hemociták, köztük a lamellociták számának emelkedését tapasztaltuk. A melanotikus tumorok képződésével jellemzett *l(3)mbn-1* mutánsban a vérsejtszám további növekedését és a tumorképződés felgyorsulását tapasztaltuk. Ennek alapján megállapítottuk, hogy a *Hemese* gén a lamellocita differenciálódás szuppresszora.

A *Drosophila* lamellocitáin azonosítottuk a *cheerio* gén által kódolt *Drosophila* filamin magas molekulatömegű izoformáját, a Filamin-240-t, melyről megállapítottuk, hogy a lamellocita differenciálódás gátlásával szabályozza a parazitoid darázsfertőzéssel kiváltott sejt-közvetítette immunválaszt.

Drosophila lárvában a darázsfertőzéssel kiváltott lamellocita differenciálódás során bekövetkező génexpressziós változásokat tükröző lamellocita specifikusan megnyilvánuló markerek kifejeződésének változásait immunológiai módszerekkel, a laboratóriumunkban előállított ellenanyagok alkalmazásával vizsgáltuk. A darázsfertőzést követően először az L4 molekula megjelenését tapasztaltuk, melyet együttműködés keretében végzett tömegspektrometriai analízissel a *myospheroid* gén által kódolt β PS integrinként határoztuk meg.

Az L1 molekuláról megállapítottuk, hogy a darázsfertőzést követő 48 óra eltelte után jelenik meg a lamellocitákon. Az L1 molekulát folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriai analízissel egy eddig ismeretlen *Drosophila* fehérjeként határoztunk meg. Az L1 molekulát kódoló gént *atilla*-nak neveztünk el. Az *atilla* gén által kódolt fehérje transzmembrán régiója egy glikozilfoszfatidilinozitol (GPI) hasító helyet tartalmaz, ami arra utal, hogy GPI-hez kapcsoltnak ágyazódik be a sejtmembrán koleszterolban és szfingolipidekben gazdag mikrodoménjeibe, az ún. lipid tutajokba. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az Atilla molekula a lipid tutajokkal ko-lokalizált, és a GPI-kötött fehérjéket hasító foszofatidilinozitol foszfolipáz C emésztést követően a hemocitákon csökken az Atilla fehérje kifejeződése.

Az *atilla* gén immunválaszban betöltött szerepét deléciós mutánsok létrehozásával kívántuk megvizsgálni. Kísérleteink során azt találtuk, hogy bár az Atilla fehérje az *atilla*

deléciós null mutánsban a lamellocitákon nem fejeződik ki, az *atilla* gén hiánya sem a lamellociták differenciálódását, sem a tokképző szerepüket nem befolyásolja. A veleszületett immunitásban részt vevő molekulák funkcióinak vizsgálatát nagyban megnehezíti, hogy ezek a védekező folyamatok gyakran túlbiztosítottak, ezért egy-egy molekula hiánya nem okozza a rendszer összeomlását, mivel azok szerepét sok esetben szerkezeti homológok veszik át. Szisztematikus homológia keresésekkel a *Drosophila melanogaster* genomjában 24 „*atilla*-szerű” gént találtunk, melyek egy része a második kromoszóma bal karján, egymás közelében négy klasztert alkotva helyezkedik el. A legtöbb *atilla*-szerű génről átfordított fehérje szekvenciája GPI hasítási helyet, valamint az *u-PAR/Ly-6 toxin* családra jellemző domént tartalmaz. Klaszterekbe csoportosuló „*atilla*-szerű” géneket találtunk egyéb rovar genomokban is, a *melanogasteren* kívül más *Drosophilida*ekben, továbbá az *Anopheles gambiae*ben, a *Tribolium castaneum*ban és az *Apis mellifera*ban.

Az *atilla* gén 5' nemtranszlálódó régiójában található, az *atilla* gén lamellocita specifikus enhanszerét csapdázó GFP riporter gént tartalmazó *minos* inszerció felhasználásával, megvalósítottuk a *Drosophila* lárvában a lamellociták *in vivo* történő nyomon követését.

Az L2 molekulát a darázsindukciót követő 16 óra elteltével detektáltuk a lamellocitákon. Kimutattuk, hogy ez a molekula lamellociták citoplazmájában fejeződik ki, és tömegspektrometriai analízissel a *Drosophila* Aktin 57B izoformára illő peptideket azonosítottunk, viszont a molekula további vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy az azt azonosító anti-L2 ellenanyag nem közvetlenül kötődik az aktin molekulához, hanem valószínűleg egy aktinnal asszociált molekulát ismer fel.

Az L6 molekuláról megállapítottuk, hogy a darászfertőzést követő 96. órában a terminálisan differenciálódott nagyméretű lamellociták egy alosztályának sejtmembránjában nyilvánul meg.

3.3. A lamellocita differenciálódás vizsgálata

A lamellociták differenciálódását kiváltó tényezők vizsgálata során megállapítottuk, hogy a darászfertőzéskor képződő mechanikai sérüléshez hasonló, laboratóriumi körülmények

között kiváltott steril szűrés önmagában is előidézi a lamellociták képződését. Az így differenciálódó lamellociták sem morfológiai sajátágaikban sem adhéziós képességükben nem különböznek a darázsfertőzés hatására differenciálódó lamellocitáktól. A természetben a kutikula sérülését gyakran bakteriális fertőzés követi. Rendszerünkben a baktériumokkal történő fertőzés után a lárvákban a keringő vérsejtek száma megemelkedett, azonban a lamellociták differenciálódása a sterilen szűrt kontrollokéhoz hasonlóan zajlott. Eredményeink azt mutatják, hogy *Drosophila* lárváknak a kutikulájának mechanikai sérülése és az ezzel járó bazális lamina károsodása már elegendő inger a lamellociták differenciálódásához és a sejt közvetítette immunválasz kiváltásához.

A kutikula sérülését követően gyakran észleltünk a vérsejtképző kompartmentumokban bekövetkező morfológiai változásokat. Ezeknek alapján feltételeztük, hogy a vérsejt differenciálódás központi szervének feltételezett központi vérképző szervén, a lymph gland-en kívül is kell, hogy legyen egy funkcionális vérképző kompartmentum, melyből immunindukciót követően a differenciálódó vérsejtek a keringésbe kerülnek, majd a parazita petére tapadnak. Kísérleteink során a keringésbe kerülő lamellociták eredetét több oldalról is megvizsgáltuk.

Eredményeink szerint darázside indukció hatására a testüreg falára sávokban kitapadt szesszilis vérsejt kompartmentumban bekövetkező hemocitaszám csökken, melynek mértéke megfelel a keringésben megjelenő hemocitaszám emelkedésnek. Mivel - vizsgálataink szerint - a szesszilis kompartmentumban a vérsejtek osztódási rátáját a darázsfertőzés nem befolyásolja, megállapítottuk, hogy a darázsfertőzés hatására a keringésben először megjelenő lamellociták, vagy azok közvetlen elő-alakjai, elsősorban a szesszilis szövetből származnak.

A darázsfertőzést követően differenciálódó lamellociták eredetét a központi nyirokszerv és a szesszilis szövet fizikai szeparálásával is megvizsgáltuk. A darázsfertőzést követő korai időpontban, amikor a lárvák elülső harmadában elhelyezkedő lymph gland még intakt, ligatúrával fizikailag választottuk el azt a lárvák poszterior részén található szesszilis szövetétől. Megállapítottuk, hogy az állatok poszterior részében megjelenő nagyszámú lamellocita nem származhat a fizikailag elválasztott anterior részben elhelyezkedő lymph gland-ből, azaz a keringésben először megjelenő lamellociták a szesszilis szövetből erednek.

A parazitoid darázssal történt fertőzést követően a központi nyirokszerv első

lebenypárjának szerkezete felbomlik, belőle vérsejtek, lamellociták, kerülnek a keringésbe. A szesszilis szövet és a lymph gland időbeni aktiválódását és a sejtek sorsát genetikai és immunológiai markerek alkalmazásával vizsgáltuk. A lymph gland szétesését a szerv poszterior szignalizációs központjában kifejeződő Collier molekula kifejeződésével követtünk nyomon. A lymph gland eredetű lamellociták kijelölésére pedig egy olyan enhanszer csapdázó mutánst (*hdc^{B5}*) használtunk, amelyben a lymph gland eredetű hemociták kifejezik a β -galaktozidázt, a szesszilis és keringő vérsejtek viszont nem. Eredményeink szerint, a darázsfertőzést követő korai időpontban a keringésben már akkor megjelentek a lamellocitákon megnyilvánuló L1 markert kifejező vérsejtek, amikor a központ nyirokszerv még intakt. A lamellociták szesszilis szöveti eredetének direkt módon történő vizsgálatához vérsejt specifikusan kifejeztetett GFP-t termelő lárvából szesszilis hemocitákat, vad típusú (fluoreszkáló hemocitákat nem tartalmazó) lárvákba ültettünk, majd a befogadó lárvá vérsejtjei között GFP-t és lamellocita specifikus antigént egyaránt expresszáló hemocitákat kerestünk. A keringésben zölden fluoreszkáló lamellocitákat találtunk, ami egyértelműen igazolta a lamellociták szesszilis eredetét.

A szesszilis szövet vérsejtképző kompartmentumként történő azonosítása alapvetően megváltoztatja a lamellociták eredetére vonatkozó eddigi ismereteinket, melyek szerint a tokképző sejtek kizárólag a lymph gland kortikális zónájából származnak. Kísérleteink eredményeként *Drosophilában* a szesszilis vérsejtképző szövetet egy új vérsejtképző szövetként azonosítottuk, mely a sejtes válasz indukcióját követően elsőként aktiválódik és belőle tokképző sejtek származnak.

A *Drosophila* lárvákban a parazitoid darazsak petéi a lamellociták differenciálódását váltják ki. Kísérleteink során a lamellociták differenciálódását szabályozó aktivációs utak térképezésére az UAS>GAL4 rendszert alkalmaztuk. A *Hemese* gén upstream régiójának felhasználásával vérsejt specifikus meghajtó elemet hoztunk létre, melynek segítségével jelátviteli útvonalakban szerepet játszó gének kifejeződését módosítottuk, majd jellemeztük a vérsejtek fenotípusában bekövetkező változásokat. Vizsgálataink megerősítették azt a korábbi megfigyelést, mely szerint a Toll és a JAK/STAT útvonal szerepet játszik a lamellociták differenciálódásában. Ezen kívül elsőként mutattuk ki, hogy ebben a folyamatban két tirozin kináz receptor, az anaplasztikus limfóma kináz és a gerinces platelet derived growth factor

rokona a *Drosophila* Pvr, továbbá a Wingless szignalizáció két negatív regulátora, a Shaggy és a Pangolin, továbbá a mitogén-aktivált protein kináz szignalizációs útvonalban szerepet játszó további hét gén is szerepet játszik.

3.4. A *Drosophila* mikroorganizmusok elleni védekezésének új egysége, a *nimród* gén- és fehérje család

Drosophila fagocita sejtjeiben, a plazmatocitákban azonosítottunk egy sejtmembránba ágyazottan megnyilvánuló általunk *nimródnak* (*nimC1*) elnevezett molekulát, melynek kódoló génjét tömegspektrometriai analízissel határoztuk meg. A NimC1 fehérje hemocitákban történő kettősszálú RNS interferenciával történő csendesítésével, illetve a NimC1 negatív *Drosophila* S2 sejtvonalon történő túltermeltetésével beláttuk, hogy az ellenanyaggal azonosított fehérjét valóban a *nimC1* gén kódolja. Funkciónyeréses és funkcióvesztéses rendszerekben történt vizsgálataink eredményei szerint a NimC1 molekula a baktériumok bekebelezésében játszik szerepet.

A *nimC1* gén genomi környezetében további kilenc olyan gént azonosítottunk, melyek géncsaládot alkotva a NimC1 fehérje szerkezeti homológjait kódolják; ezek mindegyikében jelenlévő változó számú, az EGF doménhez hasonló, de annál szigorúbb konszenzusszekvenciájú doménjeit NIM doméneknek neveztük el. A *nimród* géncsalád által kódolt fehérjék szekvencia analízise alapján ezek a fehérjék a sejtmembránba ágyazottan, vagy szolubilis formában, a hemolimfában fordulnak elő. A *Drosophila nimród* géncsaládhoz hasonlóan a *nimród* homológok családba szerveződését találtuk egyéb rovarokban is, így az *Anopheles gambiae*-ben és az *Apis mellifera*-ban.

A Nimród fehérje- és géncsalád kialakulását a fehérje domének szintjén vizsgálva megállapítottuk, hogy az egyetlen NIM domént tartalmazó fehérjék az ízeltlábúakban és a gerincesekben általánosan elterjedtek, viszont a több NIM doménnel rendelkező fehérjék kizárólag a teljes átalakulással fejlődő rovarokra jellemzőek. Eredményeink szerint a Nimród fehérjecsalád alapítója minden bizonnyal egy Draper-típusú fehérje volt, amelyből a NIM

domén duplikációival és az EGF domének delécioival alakultak ki a NimC, majd a transzmembrán domén deléciojával a NimB fehérjék. Szekvencia analízisünk alapján a NIM domén és az EMI domén valószínűleg két, szorosan egymás mellett található EGF doménből jöhetett létre.

Megállapítottuk, hogy a *nimród* gének a *Centaurin gamma*, az *Angiotensin converting enzyme* valamint a *vajk* gének egy nagyobb egységet az un. Nimród klasztert alkotva a *Drosophilán* kívül szintén családokba tömörülve helyezkednek el az *Anopheles gambiae* (Diptera), *Apis mellifera* (Hymenoptera), *Tribolium castaneum* (Coleoptera), *Pediculus humanus* (Phthiraptera) és *Daphnia pulex* (Cladocera) genomjában, ami arra utal, hogy a *Nimród* klaszterbe tartozó gének az evolúció során valamilyen szelekciós nyomás következtében egymással kapcsolatosan öröklődtek.

A Nimród fehérjék baktériumkötésének meghatározásához egy új, indirekt immunfluoreszcencián és áramlási citometrián alapuló vizsgálati módszert dolgoztunk ki, melynek alkalmazásával megállapítottuk, hogy a NimC1 fehérje kötődik az általunk vizsgált Gram-negatív baktériumokhoz (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa*), míg a vizsgált Gram-pozitív baktériumok közül a *Bacillus cereus* var. *mycoides*-t köti. További vizsgálataink azt mutatták, hogy a NimC1 receptor a baktériumokon egy fehérje természetű ligandot ismer fel.

A Nimród fehérjecsalád tagjai baktériumkötésének vizsgálatához NimA, NimB1, NimB2 és a NimC1 fehérjék FLAG epitóppal ellátott extracelluláris doménjeit eukarióta expressziós rendszerben rekombináns fehérjeként termeltettük meg és a baktériumkötés vizsgálatához a rekombináns fehérjéket termelő sejtek extraktumát használtuk. Eredményeink szerint a Gram-pozitív *Escherichia coli* baktériumot a rekombináns NimA, NimB1, NimB2 és NimC1, míg a Gram-negatív *Staphylococcus epidermidis* baktériumot csak a rekombináns NimB1 molekula kötötte.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a Nimród fehérjecsalád tagjai a baktériumok elleni immunválaszban baktériumkötő receptorként működnek és beilleszthetők az EGF-hez hasonló NIM domént tartalmazó receptorok sorába. A transzmembrán doménnel

rendelkező NimA és NimC fehérjék valószínűleg a mikrobák felismerésében és a fagocita sejthez történő rögzítésben, míg a transzmembrán régióval nem rendelkező NimB fehérjék a hemolimfában keringő opszoninként működhetnek, a mikroorganizmusok felszínéhez kötődve segíthetik azok bekebelezését.

A *nimród* géncsalád genomi régióján belül foglal helyet az általunk azonosított *Hemese* gén is. Bár a *Hemese* fehérje nem tartalmaz NIM domént és a *melanogaster* csoporton kívül a *Hemese* gén homológjai nem azonosíthatók, viszont egy másik *Drosophila* fajban (*D. willistoni*) egy NimC1 paralóg, a *Hemeséhez* hasonlóan szerinben és treoninban gazdag régiót és erősen redukált számú NIM domént tartalmaz. Így valószínűsíthető, hogy a *Hemese* gén egy olyan redukálódott *nimC1* paralóg, mely idővel az összes NIM doménjét elveszítette. Ebből arra következtethetünk, hogy a Nim régióban elhelyezkedő, a lamellocita differenciálódás szuppreszoraként azonosított *Hemese* a Nim család erősen trunkált/csonkult tagja, mely az evolúció során elveszítette Nim doménjeit.

3.5. A szeptikus sérülést követő immunválaszban résztvevő gének azonosítása *Drosophilában*

Az irodalomban ismert és a korábbiakban általunk megismert és ismertetett (3.3.3 fejezet) aktivációs utaknak a szeptikus fertőzésben betöltött szerepét vizsgáltuk egy, az általunk létrehozott a természetben is előforduló szeptikus sérülést imitálva. Kimutattuk, hogy a baktériumok az okozott sérülésen át bejutottak az állatok szervezetébe és az alkalmazott Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokkal történő fertőzés különböző mértékű letalitást eredményezett. A sérülési teszt alkalmazásával egy irányított screen keretében olyan gének mutáns alléljait hordozó egyedek ellenállóképességét is megvizsgáltuk, amelyeknek irodalmi adatok, illetve szekvencia homológiák alapján szerepük lehet a sebgyógyulásban és a fertőzések leküzdésében. Az ismert gének mutáns alléljainak alkalmazásával standardizáltuk a rendszert. Kísérleteink során három olyan gént, a *scramblase 1-t*, *multicopper oxidase 3-t*, és a *rasberry-t* azonosítottunk, melyeknek az immunitásban és a patogénnel szembeni védekezésben betöltött szerepe eddig nem volt ismeretes.

A *rasberry* gén immunitásban betöltött szerepét részletesebben megvizsgálva megállapítottuk, hogy az inosin-5'-monofoszfát dehidrogenáz (IMP)-t, a *de novo* GMP szintézis kulcsenzimét kódoló *rasberry* gén, melynek human homológja az immunválasz és a limfocita proliferáció szabályozásban vesz részt, *Drosophilában* a sejt közvetítette immunitás szabályozásában is szerepet játszik. A parazitoid darazsak petéi körül formálódó több rétegű tok kialakításában nélkülözhetetlen: a géntermék hiányában, a lamellociták a tokképző reakció során nem képesek megfelelően egymáshoz tapadni, így csökken a parazitoidok elleni immunválasz hatékonysága.

4. Az új eredmények összefoglalása

Elsőként azonosítottunk *Drosophila* hemocitáin és hemocita alpopulációin specifikusan megnyilvánuló olyan molekuláris markereket, melyek lehetővé teszik a *Drosophila* sejt-közvetítette immunválaszában vizsgálatát.

Drosophilában azonosítottuk az első hemocita specifikusan megnyilvánuló transzmembrán fehérjét kódoló gént, a *Hemese*-t, mely a lamellociták differenciálódásának gátlásával szabályozza a tokképző reakciót. A *Hemese* gén által kódolt fehérjét a szialoforin család új tagjaként azonosítottuk.

A *Hemese* gén upstream régiójának felhasználásával vérsejt specifikus meghajtó elemet és riporter konstruktokat hoztunk létre, melyeknek segítségével irányított genetikai screenekben az immunválasz során zajló lamellocita differenciálódás szabályozásában, valamint melanotikus tumorok képződésében szerepet játszó géneket azonosítottunk, és jelátviteli útvonalakat tártunk fel.

Drosophilában meghatároztuk a filamin molekula magas molekulatömegű izoformájának sejt-közvetítette immunválaszban betöltött immunszuppresszív szerepét.

A darázsfertőzéssel kiváltott immunindukció során differenciálódó lamellocitákon szekvenciálisan megjelenő molekulákat azonosítottunk és jellemeztünk. Megállapítottuk, hogy

a lamellociták differenciálódásuk során morfológiai átalakulásukkal párhuzamosan funkcionális és molekuláris mintázat változáson mennek át.

Megállapítottuk, hogy a darázsfertőzés hatására differenciálódó lamellocitákon megjelenő korai marker molekula a *Drosophila myospheroid* által kódolt β PS integrin, mely a sejtdhézióban játszik meghatározó szerepet.

Immunológiai és proteomikai eszközökkel azonosítottuk a darázsindukció hatására kifejeződő *atilla* gént, amelyről beláttuk, hogy egy glikozilfoszfatidilinozitol-kapcsolt, az *u-PAR/Ly-6 toxin* családba tartozó transzmembrán fehérjét kódol. A *D. melanogaster* genomjában 24 „*atilla*-szerű” gént találtunk, melyek egy része egymás közelében négy klasztert alkotva helyezkedik el. A legtöbb *atilla*-szerű génről átfordított fehérje szekvenciája GPI hasítási helyet, valamint az *u-PAR/Ly-6 toxin* családra jellemző domént tartalmaz. Klaszterekbe csoportosuló „*atilla*-szerű” géneket találtunk egyéb *Drosophilidae* fajokban, továbbá az *Anopheles gambiae* afrikai malária szúnyogban, *Tribolium castaneum* kukorica-kislisztbogárban és az *Apis mellifera* mézelő méhben.

Megállapítottuk, hogy a *Drosophila* lárva steril sebzése lamellocita differenciálódást idéz elő, amivel további lehetőséget teremtettünk a lamellocita prekursorok és a lamellociták terminális differenciálódásának a vizsgálatára.

A *Drosophilában* egy új funkcionális hemocita kompartmentumot azonosítottunk, a szesszilis vérsejtképző szövetet. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a szesszilis szövetből is származhatnak lamellociták és ezek a sejtek a központi vérsejtképző szerv, a lymph gland szétesése előtt megjelennek a lárva keringésében.

Drosophilában egy új géncsaládot azonosítottunk, a *nimród* géneket, melyek EGF doménhez hasonló, de annál szigorúbb konszenzusszekvenciájú NIM doméneket tartalmazó szerkezeti homológ fehérjéket kódolnak. A *nimród* géncsalád által kódolt fehérjék a sejtmembránba ágyazottan vagy szolubilis formában fordulnak elő. A *nimród* homológ gének családba szerveződését találtuk egyéb rovarokban is, így az *Anopheles gambiae*-ben, valamint az *Apis mellifera*-ban.

Jellemeztük a Nimród fehérjékre jellemző új típusú domén, a NIM domén szerkezetét és vizsgáltuk lehetséges evolúcióját. Megállapítottuk, hogy az egyetlen NIM domént tartalmazó fehérjék az ízeltlábúakban és a gerincesekben általánosan elterjedtek, viszont a több NIM doménnel rendelkező fehérjék kizárólag a teljes átalakulással fejlődő rovarokra jellemzőek.

Megállapítottuk, hogy a Nimród fehérjecsalád tagjai a baktériumok kötésével járulnak hozzá a *Drosophila* sejt-közetítette immunválaszhoz.

Szeptikus sérülést követő gazda-patogén kölcsönhatásban szerepet játszó gének azonosítására alkalmas új *in vivo* fertőzési tesztet hoztunk létre *Drosophila melanogaster* modellrendszerben. A módszer kontrollált laboratóriumi körülmények között kiváltott sérülésen és fertőzésen alapszik és megbízhatóan alkalmazható a veleszületett immunitásban szerepet játszó gének azonosítására.

Megállapítottuk, hogy a *Drosophila raspberry* gén a lamellociták parazita petékhez történő tapadását előidézve fontos szerepet játszik a *Drosophila* parazitoid darazsak elleni sejt-közetítette immunválaszában.

5. Az eredmények gyakorlati hasznosulásának lehetőségei

A veleszületett immunitás szabályozásában résztvevő gének várhatóan potenciális terápiás célpontokként, vagy a diagnosztikában alkalmazásra kerülő markermolekulákként alkalmazhatók.

A *Drosophila* hemocitáin és a hemocita alpopulációkon megnyilvánuló molekuláris markereket felismerő ellenanyagainkat a tudományos közösség világszerte rutinszerűen reagensként és nemzetközileg elismert sztenderdként alkalmazza.

6. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

Vilmos P and **Kurucz E**. 1998. Insect Immunity: Evolutionary Roots of the Mammalian Innate Immune System. *Immunol Lett.* **62**: 59-66.

Független idéző: 143, IF: 1.485

Kurucz E, Zettervall CJ, Sinka R, Vilmos P, Pivarcsi A, Ekengren S, Hegedüs Z, Ando I, Hultmark D. 2003. Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 100:2622-2627.

Független idéző: 82, IF: 10.272

Zettervall CJ, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, **Kurucz E**, Ando I, Hultmark D. 2004. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:14192-14197.

Független idéző: 153, IF: 10.452

Márkus R, **Kurucz E**, Rus F, Andó I. 2005. Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Lett.* 101:108-111.

Független idéző: 40, IF: 2.301

Kurucz E, Váczi B, Márkus R, Laurinyecz B, Vilmos P, Zsámboki J, Csorba K, Gateff E, Hultmark D, Andó I. 2007. Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biol. Hung.* 58:95-111.

Független idéző: 56, IF: 0.447

Kurucz E, Márkus R, Zsámboki J, Folkl-Medzihradsky K, Darula Z, Vilmos P, Udvardy A, Krausz I, Lukacsovich T, Gateff E, Zettervall CJ, Hultmark D, Andó I. 2007. Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr. Biol.* 17:649-654.

Független idéző: 131, IF: 10.539

Somogyi K, Sipos B, Péntes Z, **Kurucz É**, Zsámboki J, Hultmark D, Andó I. 2008. Evolution of genes and

repeats in the Nimrod superfamily. *Mol. Biol. Evol.* 25:2337-2347.

Független idéző: 33, IF: 7.280

Márkus R, Laurinyecz B, **Kurucz E**, Honti V, Bajusz I, Sipos B, Somogyi K, Kronhamn J, Hultmark D, Andó I. 2009. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:4805-4809.

Független idéző: 92, IF: 9.432

Honti V, **Kurucz E**, Csordás G, Laurinyecz B, Márkus R, Andó I. 2009. *In vivo* detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Lett.* 126:83-84.

Független idéző: 6, IF: 2.906

Honti V, Csordás G, Márkus R, **Kurucz E**, Jankovics F, Andó I. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. 2010. *Mol. Immunol.* 47:1997-2004.

Független idéző: 37, IF: 2.916

Kari B, Zsamboki J, Honti V, Csordás G, Márkus R, Andó I, **Kurucz É.** 2013. A novel method for the identification of factors involved in host-pathogen interactions in *Drosophila melanogaster*. *J. Immunol. Methods.* 398-399:76-82.

Független idéző: 1, IF: 2.005

Zsamboki J, Csordas G, Honti V, Pinter L, Bajusz I, Galgoczy L, Ando I, **Kurucz E.** 2013. *Drosophila* Nimrod proteins bind bacteria. *Cent. Eur. J. Biol.* 8:633-645.

Független idéző: 3, IF: 0.633

Kari B, Csordás G, Honti V, Cinege G, Williams MJ, Andó I, **Kurucz É.** 2016. The raspberry gene is involved in the regulation of the cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 11:e0150910

Független idéző: 2, IF: 2.806

7. A dolgozat témájában megjelent további közlemények

Andó I, Laurinyecz B, Nagy I, Márkus R, Rus F, Váczi B, Zsámboki J, Fehér L, Gateff E, **Kurucz É.** 2003. Ősi örökségünk a veleszületett immunitás. A *Drosophila* immunrendszere. Magyar Immunológia. 4:39-46.

Andó I, Laurinyecz B, Márkus R, Rus F, Váczi B, Zsámboki J, **Kurucz É.** Ősi örökségünk a veleszületett immunitás: a *Drosophila* immunrendszere. 2004. Magyar Tudomány. 111:1080-1089.

Vilmos P, Nagy I, **Kurucz E**, Hultmark D, Gateff E, Andó I. 2004. A rapid rosetting method for separation of hemocyte sub-populations of *Drosophila melanogaster*. Dev Comp Immunol. **28**:555-563.

Független idéző: 13, IF: 2.652

Honti V, Cinege G, Csordás G, **Kurucz E**, Zsámboki J, Evans CJ, Banerjee U, Andó I. Variation of NimC1 expression in *Drosophila* stocks and transgenic strains. **2013**. Fly (Austin) 7:1-4.

Független idéző: 5, IF: 1.475

Honti V, Csordás G, **Kurucz É**, Márkus R, Andó I. 2014. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. Dev. Comp. Immunol. 42:47-56.

Független idéző: 42, IF: 2.815

Csordás G, Varga GI, Honti V, Jankovics F, **Kurucz É**, Andó I. 2014. *In vivo* immunostaining of hemocyte compartments in *Drosophila* for live imaging. PLoS One. 9:e98191.

Független idéző: 3, IF: 3.234

Bretscher AJ, Honti V, Binggeli O, Burri O, Poidevin M, **Kurucz É**, Zsámboki J, Andó I, Lemaitre B. **2015**. The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in *Drosophila melanogaster*. Biol. Open. 4:355-363.

Független idéző: 5

Cinege G, Zsámboki J, Vidal-Quadras M, Uv A, Csordás G, Honti V, Gábor E, Hegedűs Z, Varga GIB, Kovács AL, Juhász G, Williams MJ, Andó I, **Kurucz É. 2017.** Genes encoding cuticular proteins are components of the Nimrod gene cluster in *Drosophila*. Insect Biochem. Mol. Biol. 87:45-54.

IF: 3.756

8. Anyagok és módszerek

Ellenanyagok:

Egérben termelt monoklonális ellenanyagok:

Hemocita specifikus anti- Hemese

Plazmatocita specifikus anti-NimC1

Lamellocita specifikus anti-Atilla (L1), anti-L2, anti-mioszferoid (L4), anti L6,

Kristályejt specifikus anti-C1 Prof Tina Trenczek Giessen University, Germany.

Az IgG izotípus kontroll (T2/48) ellenanyag

Másodlagos ellenanyagok és reagensek:

Anti-GFP antibody (Mol. Probes),

Anti-egér-FITC Ig (DAKO),

Anti-egér Alexa Fluor 488 (Mol. Probes),

Anti-egér Alexa Fluor 568 (Mol. Probes),

Anti-egér AlexaFluor 633n (Mol. Probes),

Biotinnal konjugált anti-egér Ig (Dako) /Streptavidin-HRPO (Dako,)

Anti-egér HRPO (Amersham,).

Streptavidin-Cy3(Amersham).

Drosophila törzsek

Oregon R

white¹¹¹⁸

Headcase-LacZ

l(3)mbn-1 (lethal (3) malignant blood neoplasm)

Hemese>Gal4 (w[]; P{w[+mC]=He-GAL4.Z}85)*

He>GFPnls (p{UAS-GFP.nls}GFP)

1560-R2 RNSi/CyO,Kr-GFP

dom¹ cher¹

P[hs-FLN1-20]; hml<GFP Headcase>LacZ

Hml>Gal4.Δ,

UAS-2XEGFP;

Parazitoid darázs törzs:

Leptopilina boulardi G486-os törzs

Baktérium törzsek

Escherichia coli (SzMC 0582), *Staphylococcus epidermidis* (SzMC 14531), *Serratia marcescens* (SzMC 0567), *Xanthomonas campestris* (SzMC 6181), *Pseudomonas aeruginosa* (SzMC 0568), *Bacillus subtilis* (SzMC 0209), *Bacillus cereus* var. *mycoides* (SzMC 0042), *Micrococcus luteus* (SzMC 0264), *Serratia marcescens* SZMC 0567,

Szegedi Egyetem mikrobiológiai Gyűjteményből.

WaaC E. coli, *WaaC* CGSC#11805; *JW3596-1*, *LacY* CGSC#11893; *JW0334-1*, Keio mutáns az *E. coli*, *E. coli*-

GFP, BL21 Genetic Resources at Yale CGSC, The Coli Genetic Stock Center-ből.

Monoklonális ellenanyagok előállítása

[Köhler G és Milstein C. 1976. Eur. J. Immunol. 7:511-519.]

[Kurucz és mtsai., 2007. Acta Biol. Hung. 58:95-111.]

Hemociták izolálása *Drosophila* lárvából

[Kurucz és mtsai., 2007. Acta Biol. Hung. 58:95-111.]

Immunhisztokémia

[Kurucz és mtsai., 2007. Acta Biol. Hung. 58:95-111.]

Indirekt immunfluoreszcencia

[Kurucz és mtsai., 2007. Acta Biol. Hung. 58:95-111.]

Élő hemociták indirekt immunfluoreszcencia festése

[Kurucz és mtsai., 2007. Acta Biol. Hung. 58:95-111.]

Parazitoid darázssal történő immunindukció

[Honti és mtsai. 2010. Mol. Immunol. 47:1997-2004.]

A *Drosophila* lárva steril sebzése

[Márkus és mtsai., 2005. Immunol. Lett. 101:108-111.]

Ligatúra

[Márkus és mtsai., 2005. Immunol. Lett. 101:108-111.]

Hemocita transzplantáció

[Márkus és mtsai., 2009. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106:4805-4809.]

Western blot analízis

[Kurucz és mtsai., 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:2622-2627.]

Immunprecipitáció

[Kurucz és mtsai., 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:2622-2627.]

Tirozin foszforiláció kimutatása

[Kurucz és mtsai., 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:2622-2627.]

Expressziós génkönyvtár készítése és tesztelése

[Kurucz és mtsai., 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:2622-2627.]

Géntermék csendesítés kettősszálú RNS interferenciával

[Kurucz és mtsai., 2007. Curr. Biol. 17:649-654.]

NimC1 fehérje kifejeztetése a Schneider2 sejtvonalban

[Kurucz és mtsai., 2007. Curr. Biol. 17:649-654.]

FITC-el jelölt baktérium készítése

[Zsamboki és mtsai., 2013. Cent. Eur. J. Biol. 8:633-645.]

Fagocitózis

[Kurucz és mtsai., 2007. Curr. Biol. 17:649-654.]

A rekombináns Nimród fehérjék kifejeztetése bakulovírus expressziós rendszerben

[Zsamboki és mtsai., 2013. Cent. Eur. J. Biol. 8:633-645.]

A Nimród fehérjék baktériumkötésének tesztelése áramlási citometriával

[Zsamboki és mtsai., 2013. Cent. Eur. J. Biol. 8:633-645.]

A baktériumkötés statisztikai elemzése

[Zsamboki és mtsai., 2013. Cent. Eur. J. Biol. 8:633-645.]

A szeptikus sérülés modellezése *Drosophila* ban

[Kari és mtsai., 2013. J. Immunol. Methods. 398-399:76-82.]

A tokképzési reakció vizsgálata

[Kari és mtsai., 2016. PLoS One. 11:e0150910.]

10. Köszönetnyilvánítás

Ez a munka azért jöhetett létre, mert a MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontot az intézetalapító Straub F. Brúnó az újszegedi parkvárosba, a sportuszoda tözsomszédságába álmodta meg. A múlt század nyolcvanas éveiben az egyetemi doktori címem megszerzését és gyermekem születését követően épp az uszodába tartottam, amikor észrevettem, hogy nincs nálam a pénztárcám, így beugrottam a Genetikai Intézetbe Monostori Évától kérni egy „huszast” a belépőre. Ekkor Andó István feltette nekem a kérdést, lenne-e kedvem a csoportjához csatlakozni, ahol korábban néhány hónapig vendég kutatóként dolgoztam. Nem telt bele fél év és a GYEST megszakítva, valamint a „munkaerő-csábítás” problémakörét leküzdve csatlakoztam a kutatócsoport munkájához.

Köszönöm Andó Istvánnak, hogy meghívott a csoportjába, kutatóvá nevelt és támogatott a pályám során. Köszönet Monostori Évának a csoport munkájába való beilleszkedésben nyújtott segítségért. Köszönetemet fejezem ki Oravecz Tamásnak az emberi, Vilmos Péternek a szarvasmarha és bivaly leukocitákon megnyilvánuló markerek azonosítása során végzett közös munkáért.

A kilencvenes évek közepén kutatócsoportunk elhatározta, hogy az elsődleges immunválasz tanulmányozását a *Drosophila* modellszervezetben folytatjuk tovább. Köszönettel tartozom Elisabeth Gateffnek, a mainzi Johannes Gutenberg Egyetem Genetikai Tanszéke professzorának, valamint az SZBK Genetikai Intézet *Drosophila* közösségének, Kiss Istvánnak, Erdélyi Miklósnak, Mihály Józsefnek, Bajusz Izabellának, Sipos Lászlónak, Gausz Jánosnak és Gyurkovics Henriknek azért, hogy elméleti és gyakorlati tanácsaikkal segítségemre voltak a *Drosophila* munka elsajátításában.

Köszönöm Dan Hultmarknak a svédországi Umeå Egyetem professzorának, hogy a laboratóriumában töltött tanulmányutam során segítette munkámat.

Köszönet a csoportunk korábbi és jelenlegi tagjainak, Márkus Róbertnek a mikroszkópos, Honti Viktornak és Csordás Gábornak a genetikai, Zsámboki Jánosnak és Cinege Gyöngyinek a molekuláris, Árva Áginak és Kovalcsik Olgának a biokémiai munkákban nyújtott segítségért. Tápai Szilvia és Balázs Anita a *Drosophila* törzsek fenntartásával és az állatok boncolásával járult hozzá munkám sikeréhez.

Köszönöm az SZBK Tömegspektrometriai Laboratóriuma vezetőjének, Medzihradsky Katalinnak és munkatársának Darula Zsuzsannának, hogy

tömegspektrometriai analíziseikkel elősegítették a hemocitákon megnyilvánuló molekulákat kódoló gének azonosítását.

Köszönet Petri Ildikónak, aki az egyetemi éveim alatt végzett diákköri tevékenységemet irányította a Szegedi Egyetem Vértanszfúziós állomásán.

Köszönetemet fejezem ki szüleimnek, akik első generációs értelmiségiként hittek a tudás erejében, ezt a hitet plántálva belém buzdítottak az egyetem elvégzésére és a kutatói élet megpróbáltatásai során mindig mellettem álltak. Köszönet Máté fiamnak megértő támogatásáért.