

Válasz Prof. Dr. Uher Ferenc bírálatára

Köszönöm Uher Ferenc Professzor Úrnak dolgozatombírálatát.

Feltett kérdéseire a válaszaim:

1. (a) Mi lehet a funkciója a Hemese molekulának *Drosophilában*?

A Hemese fehérje a *Drosophila* lárvákban kizárólag a vérsejtekben fejeződik ki, mint a hemolimfában keringő hemocitákon, a testüreg falára kitapadt ún. szesszilis vérsejeken és a központi vérképző szervben, a lymph gland-ben lévő összes vérsejt plazmamembránjának fő komponense.

A *Hemese* gén egy transzmembrán fehérjét kódol, melynek intracelluláris régiójában tirozin és szerin foszforilációs motívumok találhatók. A *Hemese* génnel homológ szekvenciákat egyéb fajokban nem találtunk, viszont a Hemese fehérje aminosav összetétele nagyon hasonlít a vörösvértestek membránjában lévő glikoforinokhoz, melyek egyes baktériumok, vírusok és paraziták receptoraiként is működnek. A Hemese fehérje extracelluláris doménje a glikoforinokhoz hasonlóan erősen O-glikozilált és a plazmamembrán közelében tartalmaz egy, a human glikoforin C-hez hasonló szekvenciát, mely a vörösvértest sejtváza és plazmamembrán közötti kapcsolatot biztosító Band 4.1 fehérje kötéséért felelős. További hasonlóság a két molekula között, hogy transzmembrán régiójában mindkét fehérje tartalmaz egy SDS rezisztens dimerizációs motívumot és ez a dimerizációs képesség a Hemese molekula Western blotting analízise során is jól nyomon követhető volt.

A Hemese szerepének vizsgálata során anti-foszfotirozin ellenanyag felhasználásával azt találtuk, hogy a molekula konstitutív tirozin foszforilációt mutat, ami jelátviteli folyamatokban való részvételére utal. A Hemese immunhisztokémiai analízisével kimutattuk, hogy ez a fehérje a lymph gland-ben az egymással érintkező vérsejtek tapadási felületén erősen feldúsul, amiből arra következtethetünk, hogy sejtadhéziós folyamatokban is szerepet játszhat. Vizsgálataink szerint a *Hemese* géntermék RNS interferenciával történő csendesítése sem az állatok életképességét, sem a vérképző rendszer elemeinek fejlődését és működését nem befolyásolja, ezért úgy gondoljuk, hogy a Hemese molekula valószínűleg módosító hatással bíró ko-receptorként működhet a vérsejtek közötti kapcsolatok kialakításában.

1. (b) Milyen mechanizmus révén - képes a *Hemese* gén kifejeződése gátolni a lamellociták differenciálódását?

A vad típusú, naiv *Drosophila* lárvában a sejt-közvetítette immunitás elemei a mikroorganizmusokat bekebelező plazmatociták és a szöveti sérüléseket követő sebgyógyulási folyamatban szerepet játszó melanizációs kaskád kulcsenzimét a profenoxidáz tartalmazó kristálysejtek. Parazitoid darázsfertőzést követően a lárvában a bazális lamina sérülése és a testidegen részecske, a parazita petéje, egy új típusú vérsejt, a lamellociták differenciálódását váltja ki. A lamellociták a fagocitálható mérettartományánál nagyobb testidegen anyagokat több rétegben körülvéve tokba zárva határolják el a testüregben a többi szövetről.

A rovarokban a mikroorganizmusok és paraziták által kiváltott immunválasz, így a lamellociták differenciálódásának szabályozása is szigorú szabályozás alatt áll, hiszen a túlaktivált immunválasz káros következményekkel járhat, ezért az immunfolyamatok kordában tartása elengedhetetlen az egyed túlélése szempontjából. *Drosophilában* az immunindukció során aktiválódó Toll, Imd és JAK/STAT jelátviteli útvonalakat negatív szabályozó elemek, pl. a szerin proteáz inhibitor serpinek több szinten is kontrollálják.

A *Hemese* gén szerepének vizsgálatát a géntermék kettős szálú RNS interferenciával történő csendesítésével végeztük. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy naiv egyedekben, azaz immunindukció nélkül, a *Hemese* fehérje hiánya sem a hemolimfa sejtjes elemeinek összetételét, azaz a „vérképet” sem a másik két vérsejt kompartmentum, a lymph gland és a szesszilis szövet kialakulását nem befolyásolja. Darázsfertőzést követően azonban a *Hemese* fehérje kifejeződésének gátlása a parazita elleni sejt-közvetítette immunválasz túlműködéséhez vezet, ami a lamellociták túlszaporodásához és a darázspete körül kialakuló tok fokozott melanizációjához vezet. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a *Hemese* gén egy eddig még nem tisztázott molekuláris mechanizmussal a *Drosophila* sejt-közvetítette immunválaszának féken tartásában játszik meghatározó szerepet. Ezt az elképzelést támasztja alá az a további megfigyelésünk, hogy a *Hemese* csendesített *l(3)mbn-1* tumor szupresszor mutáns állatokban a tumorképződési fenotípus erősödést tapasztaltuk, amely a keringő vérsejtek számának növekedésében és a tumorképződés fokozódásában nyilvánult meg.

- 2. A *cheerio* gén által kódolt Filamin-240 (L5) szintén gátolja a lamellociták differenciálódását. Kérdés, hogy ez mennyiben tekinthető a lamellocitákra, vagy egyáltalán a veleszületett immunitásban érintett sejtekre specifikus hatásnak, hiszen – mint a szerző több idézettel maga is alátámasztotta – a Filamin-240 hiánya már az állatok ontogenezisének legkorábbi szakaszában is súlyos zavart okoz.**

A *Drosophila* Filamin-240 izoformáját először a *shi kong* (*sko*) és a *cheerio* (*cher*) nőstény-steril mutációk izolálása és jellemzése során azonosították. Ezek a mutációk a nőstények petefészkének gyűrűcsatornáiban hibás aktin szerveződést és stabilizálódást okoznak, ami kisméretű, életképtelen peték képződésével jár. A *cheerio* gén funkcióvesztéses allélja (*cher*¹) a Filamin-240 izoforma hiányán keresztül akadályozza a gyűrűcsatornák megfelelő kialakulását és így nőstény sterilizációhoz vezet, de ezen kívül megfigyeléseink szerint a sejt közvetítette immunválaszban is szerepet játszik, hiszen a *cher*¹ homozigóta lárvákban immunindukció nélkül is lamellocita differenciálódás zajlik. A Filamin-240 izoformát kódoló teljes hosszúságú transzgént visszajuttatva a *cher*¹ mutánsba, a Filamin-240 izoforma kifejeződését Western blotting analízissel kimutatva igazoltuk, hogy a lamellocita túltermelődést valóban a *cheerio* gén mutációja okozza. A *Drosophila* Filamin molekula szerepének vizsgálata során korábban kimutatták, hogy a Filamin-240 izoforma a Toll jelátviteli útvonalban szerepet játszó Tube adaptor fehérjével interakcióba lépve jelátviteli komplexek kialakulásához egyfaja molekuláris platformként szolgálhat.

- 3. A nimród géncsalád kapcsán kiderült, hogy a *Hemese* gén maga is egy – az összes NIM doménjét elveszített - *nimC1* paralóg lehet. Azt is igazolta, hogy a Nim fehérjék (A, B, és C) a mikrobák felismerésében és fagocitálásában játszanak szerepet. Ennek fényében különösen érdekes lenne**

megvizsgálni, hogy a Hemese fehérje képes-e valamilyen kórokozót felismerni és megkötni. Erre vonatkozóan sajnos nem találtam utalást a munkában. Történtek-e egyáltalán ilyen vizsgálatok?

A *Hemese* gén a *Drosophila melanogaster* 2. kromoszómájának 34E1–2 régiójában elhelyezkedő *Nimród* géneket is magába foglaló *Nimród* génklaszterben található. A *Hemese* gén a *nimC* génekhez hasonlóan egy transzmembrán molekulát kódol, viszont rövid, szerin- és treoninban gazdag O-glikozilált extracelluláris régiója a Nimrod fehérjékre jellemző, un. NIM ismétlődő egységeket nem tartalmaz. Bár *Hemese* homológok a *melanogaster* csoporton kívül más *Drosophila* fajok genomjában nem találhatók, a *Drosophila willistoni* fajban létezik egy *nimC1* paralóg, a *nimC1a*, amelynek sejtén kívüli régiója szintén szerin- és treoninban gazdag és csak két NIM ismétlődő egységet tartalmaz. Elképzelhető egy modell, ami szerint a *Hemese* gén egy olyan megrövidült *nimC1* paralógból származik, amely az evolúció során az összes NIM ismétlődő egységét elvesztette, így a *D. willistoni nimC1a* egy potenciális *Hemese* analógnak tekinthető. Munkánk során nem vizsgáltuk a *D. willistoni*-ban a *nimC1a*, vagy a *D. melanogaster*-ben a *Hemese* molekula baktériumok kötésében vagy fagocitózisában betöltött szerepét.

4. De meg is lehet fordítani a kérdést, a NimA, B és C fehérjéknek van-e, lehet-e szerepük a Drosophila hemociták differenciálódásának szabályozásában?

A NimA, NimB és NimC fehérjék sejt-közvetítette immunválaszban betöltött szerepének megismeréséhez az egyes *Nimród* gének egyenkénti, valamint kombinációkban történő kiütése szükséges, amit a közelmúltban kifejlesztett és *Drosophilában* is széleskörűen alkalmazott CRISPR-Cas9 célzott genomszerkesztési módszer tesz lehetővé. Együttműködő partnereinkkel elsőként a *nimC1* gén null mutációját hoztuk létre és vizsgáltuk szerepét a mikroorganizmusok fagocitózisában és a hemociták sejtadhéziós folyamataiban. Jelenleg folyamatban van a *Nimrod* gének CRISPR-Cas9 módszerrel történő szisztematikus egyenkénti és kombinációkban történő kiütése és azok szerepének feltérképezése. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeként eddig azt állapítottuk meg, hogy a NimC1 fehérje szerepet játszik a hemociták alakváltoztatásában azaz kiterülésében és a vérsejtek szilárd szubsztrátokhoz, testidegen anyagokhoz történő kitapadásában. Eredményeink szerint a NimC1 egy másik, szintén NIM domént tartalmazó receptor, az Eater molekulával együttműködve vesz részt ennek a folyamatnak a szabályozásában. Azt reméljük, hogy ezekből a vizsgálatokból választ kaphatunk arra a kérdésre is, hogy a NimA, NimB és NimC fehérjék szerepet játszanak-e a *Drosophila* hemociták differenciálódásának szabályozásában.

5. Azonosítottak három olyan gént (scramblase 1, multicopper oxidase 3, és raspberry), melyeknek a szeptikus sérülést követő immunválaszban betöltött szerepe eddig ismeretlen volt. Közülük azonban csak a raspberry funkciójával foglalkoztak részletesebben. Lehet-e valamit tudni arról, hogy a másik két gén, a scramblase 1 és a multicopper oxidase 3 milyen szerepet játszhat a Drosophila (netán az emlősök?) különböző védekező reakciókban?

(Erre a kérdésre adott válaszom megegyezik Berki Tímea Professzor Asszony 8b. kérdésére adott válaszával.)

A nyugvó állapotban lévő sejtek, így a vérsejtek plazmamembránban elhelyezkedő foszfolipidek aszimmetriáját is a foszfolipidek áthelyezésére specializálódott flippáz enzimek tartják fenn. Sejtaktiváció hatására az ún. Scramblase enzimek a foszfatidil-szerin molekulákat a külső membránba helyezik át, ami a lipidek aszimmetriájának megbontásával jár. Emlősökben a Scramblase-1 fehérje a szöveti sérülések által előidézett véralvadás során a vérlemezkék belső membránjában lokalizálódó foszfatidil-szerint a sejtfelszínre juttatja, ami a véralvadási faktorokkal kapcsolatba lépve protrombin termelődést indukálva megindítja a véralvadási láncreakciót. Apoptózis során a fagocitózist beindító u. "eat me" szignált szintén a Scramblase-1 fehérje indukálja a foszfatidil-szerin külső membránba történő áthelyezésével, melyet a mikroglia és más professzionális fagocita sejtek érzékelnek és megkezdik a target sejt bekebelezését. A foszfolipidek transzlokációját végző, Scramblase-1-ről az is ismert, hogy emlősökben az interferonok hatására termelődik és meghatározó szerepet játszik a gazdaszervezet érő DNS- és RNS-vírus fertőzések, valamint a hepatocelluláris karcinóma elleni védekezésében. A Scramblase-1 fehérjét a hepatitis B Virus Protein X egyik interakciós partnereként is azonosították és megállapították, hogy elősegíti ennek a vírusfehérjének az ubiquitinálódását és proteaszómák általi lebontását. A human genom 4 *foszfolipid scramblase* gént kódol, melynek ortológjai megtalálhatók az egér, patkány, *Drosophila melanogaster*, a *Caenorhabditis elegans* és az élesztő genomjában is. A *Drosophila* Scramblase-1, az emlősökhöz hasonlóan, a foszfatidil-szerin sejtfelszínre juttatásával a szöveti sérüléseket követő sebgyógyulás folyamatában szerepet játszó jelátviteli útvonalakat aktivál.

A multicopper oxidázok olyan enzim molekulák, melyek aktív centrumai több réz iont tartalmaznak és különféle szubsztátok oxidációjára képesek. Emlősökben és madarakban a Ceruloplasmin EC 1.16.3 egy olyan ferroxidase, mely különböző szerves és szervetlen szubsztátokat oxidál, és részt vesz a véralvadék képződésében. A *Drosophila* genom 4 potenciális multicopper oxidázt (dMCO1-4) kódol, melyek közül a dMCO3 egy potenciális ferroxidáz, amely az ion homeosztázis szabályozásában és ezen keresztül a szöveti sérüléseket követő sebgyógyulási folyamatokban, a hemolimfa alvadási folyamatában vesz részt.