

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A VELESZÜLETETT IMMUNITÁS MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA *DROSOPHILA MELANOGASTER* MODELLSZERVEZETBEN

DR KURUCZ JUDIT ÉVA



Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet
Szeged
2017

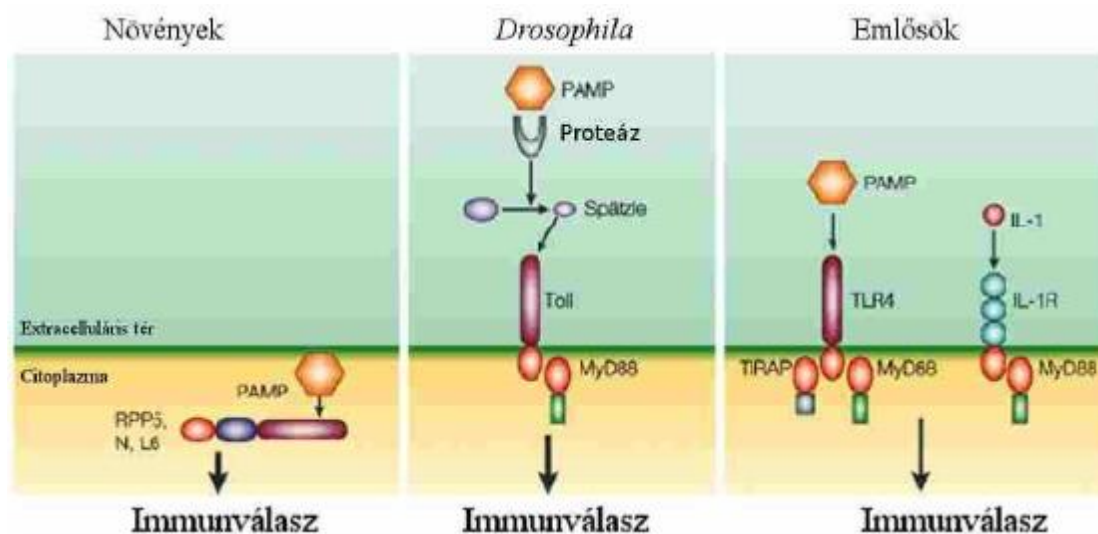
Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
1.1. A <i>Drosophila</i> veleszületett immunitása	5
1.2. A <i>Drosophila</i> vérsejtjei, a hemociták	12
1.3. A hemociták képződése	15
1.4. A <i>Drosophila</i> sejt-közvetítette immunitása	19
1.5. A hemocita alpopulációk azonosítása <i>Drosophilában</i>	27
2. Célkitűzések	28
3. Eredmények és az eredmények megbeszélése	29
3.1. A hemocitákon kifejeződő molekulák azonosítása	29
3.2. A paraziták elleni tokképző reakció molekuláris vizsgálata	30
3.2.1. A <i>Hemese</i> gén szerepe a lamellociták kialakulásában	30
3.2.2. A <i>Drosophila</i> Filamin-240 a lamellocita differenciálódás szuppresszora	36
3.2.3. A tokképző hemocitákban kifejeződő molekulák azonosítása	42
3.2.3.1. A <i>Drosophila</i> βPS integrin (L4)	42
3.2.3.2. Az Atila fehérje (L1) a Ly6 család tagja	46
3.2.3.3. Az aktinnal kapcsolt L2 molekula	58
3.2.3.4. A terminálisan differenciálódott lamellocitákon kifejeződő L6 molekula	62
3.3. A lamellocita differenciálódás vizsgálata	64
3.3.1 A lamellocita differenciálódás indukciójának alapvető feltétele	64
3.3.2. A <i>Drosophila</i> vérsejtképző kompartmentumai	66
3.3.3. A hemocita aktiválódás szabályozásának útjai	77

3.4. A <i>Drosophila</i> mikroorganizmusok elleni védekezésének új egysége, a nimród gén- és fehérje család	81
3.4.1. A nimC1 gén azonosítása és szerepe a sejt-közvetítette immunválaszban	81
3.4.2. A nimród géncsalád azonosítása	86
3.4.3. A NIM domén és a nimród géncsalád evolúciója	88
3.4.4. A nimród gén- és fehérje család biológiai funkciójának vizsgálata	90
3.4.4.1. A NimC1 fehérje baktériumkötésének vizsgálata	91
3.4.4.2. A rekombináns Nimród fehérjék baktériumkötésének vizsgálata	95
3.5. A szeptikus sérülést követő immunválaszban résztvevő gének azonosítása <i>Drosophilában</i>	100
3.5.1. Egy új szeptikus sérülési módszer kidolgozása <i>Drosophilában</i>	100
3.5.2. A raspberry gén szerepe a <i>Drosophila</i> immunválaszban	104
4. Az új eredmények összefoglalása	109
5. Az eredmények gyakorlati hasznosulásának lehetőségei	110
6. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke	111
7. Az értekezés témakörében megjelent további közlemények	112
8. Anyagok és módszerek	113
9. Irodalomjegyzék	123
10. Köszönetnyilvánítás	140
11. Rövidítések jegyzéke	141

1. Bevezetés

A törzsfajlás során az élőlények biológiai állandóságuk fenntartásához olyan mechanizmusokat fejlesztettek ki, melyek segítségével hatékonyan tudnak védekezni a szervezetükbe jutó kórokozók ellen. Emlősök esetében ezt a védeettséget a veleszületett és a szerzett immunitás egymásra épülő rendszere biztosítja. A veleszületett immunrendszer olyan ősi, a törzsfajlás korai szakaszában kialakult védekezési forma, melynek kulcsfontosságú egységei állandósult formában őrződtek meg és adódtak tovább az evolúció folyamán: hasonló szerkezeti és működési elemei a növény és az állatvilágban egyaránt fellelhetők (1. Ábra) [Medzhitov 2001; Leulier és Lemaitre 2008; Kemmerling és mtsai., 2011; Neyen és Lemaitre 2016].



1. Ábra. Az evolúció során konzerválódott jelátviteli molekulák és útvonalak

A mikroorganizmusokra jellemző molekuláris mintázat felismerésére alkalmas leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmazó receptorok (lila) és jelátviteli mechanizmusok mind a növényvilágban, mind az állatvilágban megtalálhatók [Medzhitov 2001 nyomán].

A veleszületett immunitás képezi a szervezet első védelmi vonalát. A többsejtű szervezeteket borító kutikula fizikai védelmet nyújt a betolakodókkal szemben, a kültakaró felszínére kiválasztott vegyületek, egyes zsírsavak, enzimek és antimikrobiális peptidok a mikroorganizmusok sejtfalának megsejtetésével akadályozzák azok gazdaszervezetbe jutását. A testüregebe kerülő idegen anyagok gyors felismerését a gazdaszervezet csírvonalában kódolt ún. mintázat felismerő receptorok végzik [Janeway 1989; Janeway és Medzhitov 2002; Gordon és mtsai., 2002; Iatsenko és mtsai., 2016]. Ezek a receptorok a sejtmembránba ágyazottak, vagy a testfolyadékban keringve olyan, a mikroorganizmusok számára létfontosságú struktúrákat ismernek fel, amelyek a gazdaszervezetben nem fordulnak elő. A mintázat-felismerő receptorok által azonosított ligandok lehetnek bakteriális sejtfal komponensek, mint a lipopoliszacharid (LPS), a peptidoglikán (PGN), lipoteichoic sav (LTA), vagy a gombák sejtfalában található β 1,3-glukánok [Leulier és mtsai., 2003]. A mikroorganizmusokra általánosan jellemző molekuláris mintázat azonosítását követően a receptorok ligandkötése olyan jelátviteli folyamatokat indíthat el, amelyeknek eredményeképpen az immunválaszban szerepet játszó gének aktiválódnak. Véralváadáshoz, komplement fehérjék aktiválásához, illetve szöveti melanizációhoz vezető

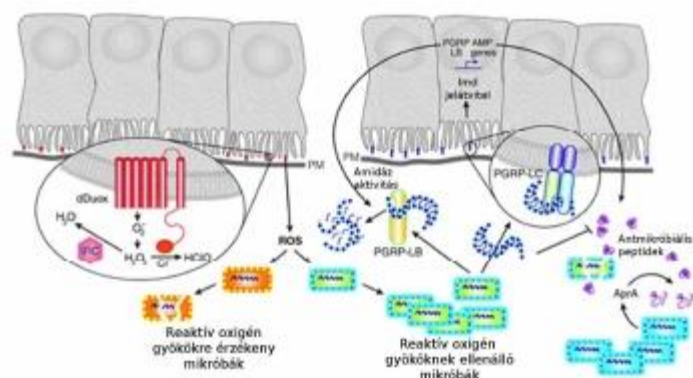
proteolitikus láncreakciók játszódnak le, antimikrobiális peptidek, a stressz válaszában az opszonizációban és a fémion felhalmozódásban résztvevő molekulák termelődnek [Lagueux és mtsai., 2000; Cerenius és Söderhäll 2004; Cerenius és mtsai., 2010; Dudzic és mtsai., 2015; Lemaitre és Hoffmann 2007; Ekengren és mtsai., 2001]. A testidegen részecskék felismerését követően sejt-közvetítette immunfolyamatok, a mikroorganizmusok bekebelezése illetve granulomaképződés játszódhat le [Stuart és Ezekowitz 2005; Sarraf és Sneller 2005]. Bár a veleszületett immunrendszer nem rendelkezik a szerzett immunitáshoz hasonló komplexitással, de gyorsan és nagyon hatékonyan működik. Emellett sokszínű, túlbiztosított rendszere az antigén peptidek bemutatásával, valamint citokinek termelésével segíti a specifikus immunválasz kialakulását, ezen kívül a szomatikus génátrendeződéssel kialakuló receptorokkal rendelkező magas specificitású T és B limfociták kialakulásáig megakadályozza a gazdaszervezetben a kórokozók elszaporodását [Medzhitov és mtsai., 1997].

A veleszületett immunrendszer evolúciós jelentőségét bizonyítja, hogy az állatvilág több mint 95%-át alkotó gerinctelen állatok immunvédekezése kizárólag a veleszületett immunitás folyamatain alapszik. A gerinctelen állatok, így a rovarok is antimikrobiális peptidek, fagocita sejtek, a kettősszálú RNS interferencia, a toxikus oxigén- és nitrogén metabolitok, valamint a melanizációs reakciók hatékony együttműködésének köszönhetően évmilliók óta sikeres túlélők a Földön [Vilmos P and Kurucz E. 1998; Hoffmann és mtsai., 1999; Elrod-Erickson és mtsai., 2000; Irving és mtsai., 2004; Little és mtsai., 2005].

A bioszférában a rovarok és mikroorganizmusok egymásra hatásának, együttélésének számtalan formája ismert. Sok rovarfaj egyedfejlődése erjedő, rothadó szerves anyagokban történik, mások növényi és állati megbetegedéseket okozó mikroorganizmusok vektorai, miközben ökológiai és gazdasági jelentőségük felbecsülhetetlen. Így elméleti és gyakorlati megfontolások egyaránt hozzájárultak ahhoz, hogy az ízeltlábúak, ezen belül elsősorban a rovarok váltak a veleszületett immunitás vizsgálatának legnépszerűbb modellszervezetévé [Kounatidis és Ligoxygakis 2012].

1.1 A veleszületett immunrendszer működése *Drosophilaban*

Mivel számos rovarfaj természetes élettere patogén mikroorganizmusokkal fertőzött, a rovarok változatos és hatékony módszereket fejlesztettek ki a kórokozók távoltartására, illetve szervezetükből történő kiküszöbölésére. A rovarok kutikulája első védelmi vonalként fizikailag akadályozza meg a kórokozók szervezetbe jutását. A táplálékkal elfogyasztott kórokozó mikroorganizmusok invázióját részben a kitinnel fedett tápcsatorna, részben savas kémhatású anyagok, különböző enzimek, valamint a fertőzés környezetében helyben kiválasztott antimikrobiális peptidek és reaktív oxigén gyökök gátolják (2. Ábra), melyek sok esetben önmagukban akadályozzák meg a kórokozóknak a testüregbe jutását. A kültakarót és a tápcsatornát érő szöveti sérülések környékén az emlősök véralvadási reakciójához hasonló helyi proteolitikus láncreakciók indulnak meg, ami a rovarok testfolyadékának, a hemolimfa fehérjéinek kicsapódásához illetve melanizációs reakciókhoz vezet [Theopold és mtsai., 2014]. Ezek a helyi védekező reakciók legtöbbször megakadályozzák a fertőzés továbbterjedését [Ferrandon és mtsai., 2013].

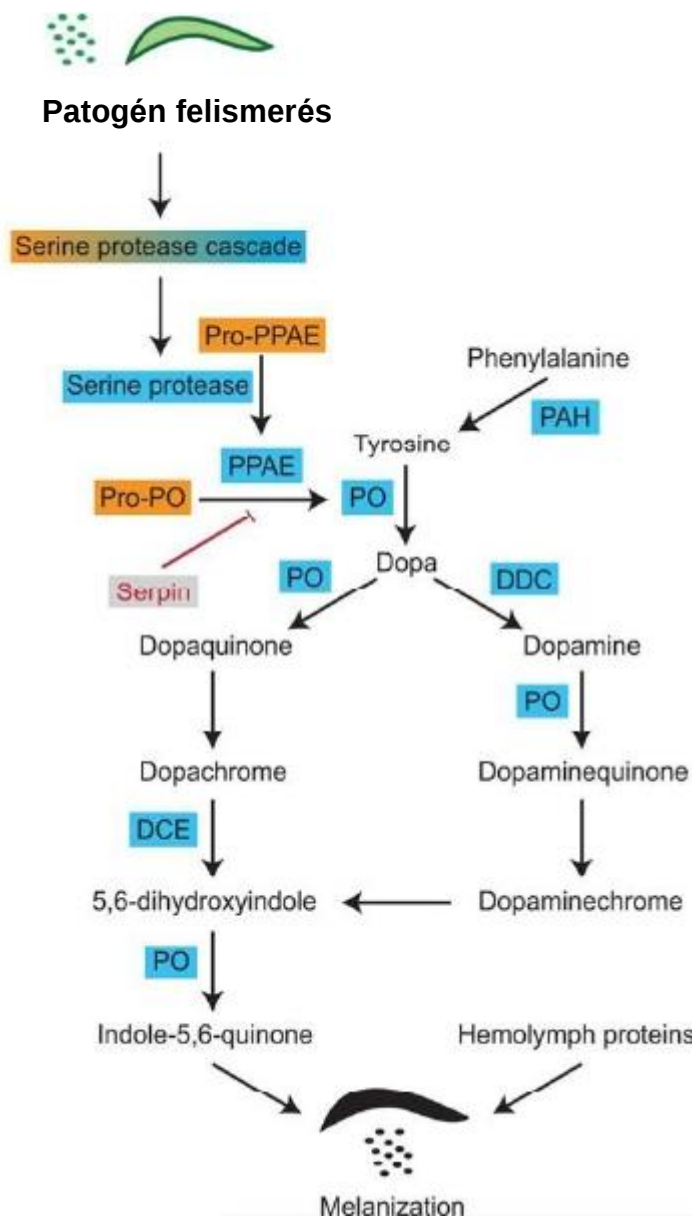


2. Ábra. Lokális védekezési reakciók *Drosophilában*

A tápcsatornába kiválasztott reaktív oxigén gyökök és antimikrobiális peptidek [Lemaitre és Hoffmann 2007. nyomán]

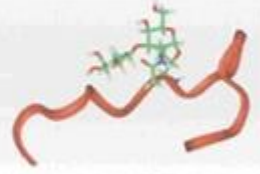
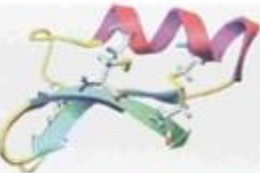
Amennyiben a szöveti sérüléseken keresztül a kórokozók a rovarok nyílt keringési rendszerébe a szövetközi testfolyadékba, a hemolimfába jutva elárasztják a gazdaszervezetet, az immunrendszerének teljes repertoárját mozgósítja, azaz humorális faktorok és immunsejtek együttműködésén alapuló szisztémás immunválaszt produkál [Elrod-Erickson és mtsai., 2000; Ferrandon és mtsai., 2007]. Emellett a nyílt keringési rendszerű rovarok kutikula sérüléseinek gyors gyógyulása is létfontosságú az egyed túlélése szempontjából. A sérülés közelében koagulációs láncreakció aktiválódik, mely a hemolimfa alvadásához vezet és a keletkező hálózatos szerkezetű alvadék egyrészt elzárja a sebet, másrészt a baktériumok megkötésével akadályozza azok bejutását és elszaporodását a testüregben [Bidla és mtsai., 2005; Bidla és mtsai., 2009; Krautz és mtsai., 2014; Theopold és mtsai., 2014]. A *Drosophila* hemolimfa koagulációjában a gerincesek májával analóg szerv, a zsírtest által termelt, valamint véresejt eredetű alvadási faktorok vesznek részt, amelyek más ízeltlábúakban, mint például a selyemhernyóban (*Bombix mori*), vagy az atlanti törfarkú rákban (*Limulus polyphemus*) azonosított alvadási faktorokkal mutatnak szerkezeti és funkcionális hasonlóságot [Iwanaga és mtsai., 1998; Theopold és mtsai., 2004; Loof és mtsai., 2011]. A megalvadott hemolimfában legnagyobb mennyiségben a fagocita sejtek által termelt Hemoclectin fehérje van jelen, amely az emberi XIIIa/von Willebrand véralvadási faktor homológja, valamint a transzglutamináz enzim és annak szubsztátja a Fondue molekula [Goto és mtsai., 2001; Lesh és mtsai., 2007; Lindgren és mtsai., 2008]. A sérülést követően a hemolimfa megfelelő fehérjei rövid időn belül koagulálnak, a végleges hemolimfa alvadék a kristálysejtek citoplazmájából felszabaduló profenoloxidáz (proPO) enzim közreműködésével alakul ki, melynek során az alvadékba melanin épül be majd a keresztkötött fehérjealvadék megszilárdul [Lorand és Graham 2003; Wang Z és mtsai., 2010; Bidla és mtsai., 2005].

A kórokozók gazdaszervezetbe jutását követő néhány percen belül aktiválódik a szerinproteáz-profenoloxidáz proteáz láncreakció, amely toxikus molekulák, a melanin, illetve fenol származékok képződéséhez vezet [Söderhäll és Cerenius 1998; Dudzic és mtsai., 2015, Hillyer 2016] (3. Ábra).



3. Ábra. Szerinproteáz-profenoloxidáz proteáz láncreakció [Hillyer 2016 nyomán]

Ezt követően a hemolimfában antimikrobiális peptidok jelennek meg és az antimikrobiális aktivitás akár napokig fennmaradhat [Boman és mtsai., 1972]. Az első, immunindukció hatására termelődő antimikrobiális peptidet, a cecropint a *Hyalophora cecropia* lárvájának hemolimfájából izolálták, *Drosophila melanogaster*-ben először egy cecropin homológot, majd a kilencvenes évek elejére egy sor egyéb antimikrobiális hatással rendelkező peptidet kódoló gént azonosítottak (4. Ábra). Ezen kívül arra is fény derült, hogy az antimikrobiális peptidok az evolúció ősi fegyvereiként mind a növényvilágban, mind az állatvilágban hatékonyak a mikroorganizmusok elleni harcban [Steiner és mtsai., 1981; Hultmark és mtsai., 1983; Lemaitre és Hoffmann 2007; Medzhitov 2001].

Peptidek	Gének száma	Hatásspektrum	Koncentráció	Térszerkezet
Diptericin	2	Gram-negatív baktériumok	0,5 μ M	ismeretlen
Attacin	4	Gram-negatív baktériumok	ismeretlen	ismeretlen
Drosocin	1	Gram-negatív baktériumok	40 μ M	
Cecropin	4	Gram-negatív baktériumok	20 μ M	
Defensin	1	Gram-pozitív baktériumok	1 μ M	
Drosomicin	7	Gombák	100 μ M	
Mecsynikovin	1	Gombák	10 μ M	ismeretlen

4. Ábra. Antimikrobiális peptidek *Drosophilaban* [Lemaitre és Hoffmann 2007. nyomán]

Az antimikrobiális peptidek képződésével fémjelzett humorális immunválasz vizsgálatához különböző fertőzési modelleket dolgoztak ki. Ezek egyrészt a tápcsatornán keresztül etetéssel, másrészt tömény baktérium szuszpenzióba mártott mikropillárral okozott sérülésen keresztül jutatták be a baktériumokat a kifejlett ecetmuslicák testüregébe. Ezek a módszerek lehetővé teszik a különböző patogének virulencia faktorainak azonosítását és a gazdaszervezet védekezési mechanizmusaiban szerepet játszó egyéb faktorok tanulmányozását is [Nehme és mtsai., 2007; Lemaitre és mtsai., 1997; Akhouayri és mtsai., 2011; Neyen és mtsai., 2014].

Az antimikrobiális peptidek a különböző mikroorganizmusokra szelektíven hatnak. Génkomplementációs és kettősszájú RNS interferencián alapuló géntermék csendesítési vizsgálatok eredményeként kiderült, hogy a Gram-negatív, illetve a Gram-pozitív baktériumok és gombák egymástól eltérő aktivációs utakat és antimikrobiális peptideket indukálnak. Az antimikrobiális peptidek szintézise a teljes átalakulással fejlődő rovarokban, így a *Drosophila* esetében is transzkripció szintű szabályozás alatt áll. A fertőzést követően a zsírtest nagy mennyiségű antimikrobiális peptidet termel, és azt a hemolimfába üríti [Levashina és mtsai., 1995; Ekengren és Hultmark 1999; Imler és Bulet 2005]. Más szövetek, pl. a gyomor és a trachea

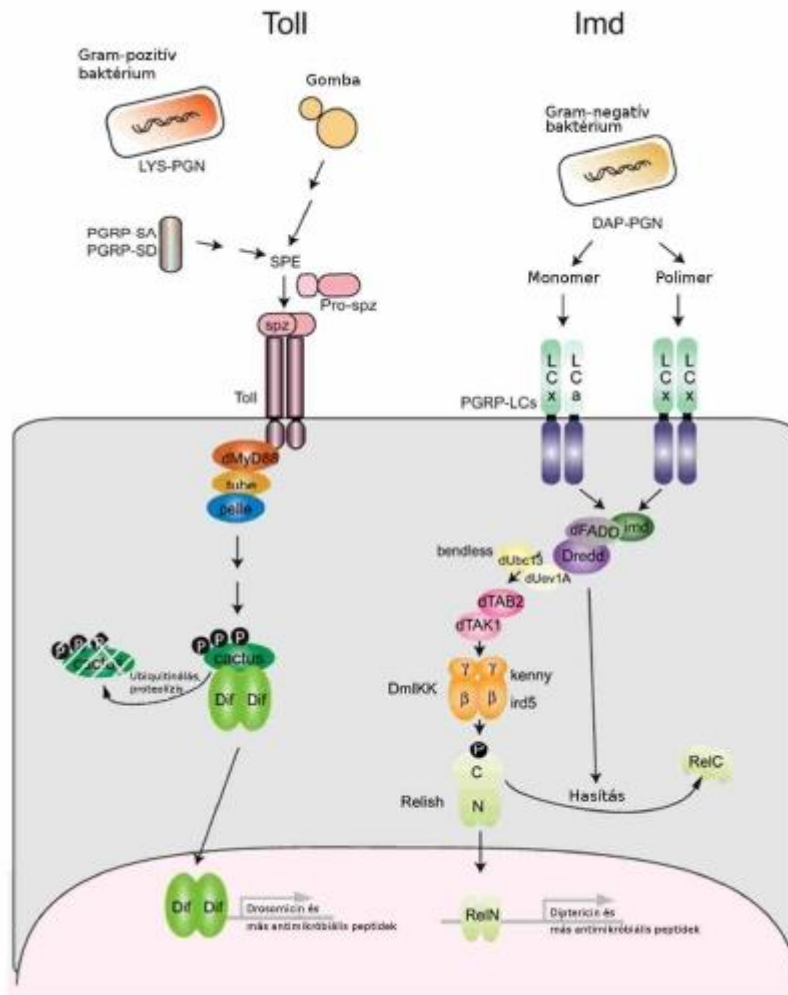
epitéliuma, vagy a vérsejtek, a hemociták, szintén előállíthatnak antimikrobiális peptideket, ezek azonban elsősorban lokálisan, az azt termelő szövet környezetében fejtik ki hatásukat. Az antimikrobiális peptideket kódoló gének szabályozó régióiban olyan szekvencia motívumokat találtak, amelyek nagyon hasonlóak az emlősök immunválaszában szerepet játszó gének szabályozó régióiban lévő NF- κ B transzkripció faktorokat kötő motívumokhoz [Engstrom és mtsai., 1993; Kadalayil és mtsai., 1997; Li és Verma 2002]. A *Drosophila* humorális immunválaszában nagy léptékű hírvívó RNS és fehérje szintű vizsgálata során megfigyelhető, hogy a szöveti sérülést követő fertőzésekre a *Drosophila* drámai módon megnövekedő génátírással válaszol. A zsírtest az antimikrobiális peptideken kívül más immunfunkcióval bíró anyagokat, opszoninokat, a melanizációban és a véralvadásban szerepet játszó molekulákat, valamint stressz fehérjéket is termel [Uttenweiler-Joseph és mtsai., 1998; Yoshiga és mtsai., 1999; De Gregorio és mtsai., 2001; Vierstraete és mtsai., 2003; Ekengren és mtsai., 2001].

A mintázat felismerő receptorok, a proteáz kaskád reakciók és az antimikrobiális peptidek transzkripció szintű szabályozásának megismerésében elért eredmények egyaránt hozzájárultak ahhoz, hogy az egyedfejlődési és genetikai vizsgálatokban hosszú idő óta kiemelkedő jelentőséggel bíró és széleskörűen jellemzett *Drosophila melanogaster* vált a veleszületett immunitás vizsgálatának legnépszerűbb és leggyakrabban használt modellszervezetévé [Hultmark 2003; Hoffmann 2003; Brennan és Anderson 2004; **Vilmos és mtsai., 2004**]. A *Drosophila* genetikailag könnyen módosítható, géntermékei a kettősszállú RNS interferencia módszerével csendesíthetők, továbbá a napjainkban széleskörűen alkalmazott CRISPR/Cas9 rendszerrel történő genomszerkesztés is rendelkezésre áll az immunválasz különböző folyamataiban szerepet játszó gének funkcióinak meghatározásához és a veleszületett immunitásban szerepet játszó jelátviteli útvonalak azonosításához [Fire és mtsai., 1998; Hammond és mtsai., 2000; Mello és Conte 2004; Sternberg és mtsai., 2014, Rubin és Lewis 2000, Duffy és mtsai., 2002]. A *Drosophila* modellrendszer egyedülálló lehetőségeket biztosít a gének és géncsaládok kialakulásának vizsgálatában is, hiszen napjainkig a *Drosophila melanogaster*en kívül további 21 *Drosophila* faj teljes genom szekvenciája vált ismertté [Adams és mtsai., 2000; *Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007].

Drosophilában az antimikrobiális peptid gének átírását elsősorban a Toll és az "Immune deficiency" (Imd) jelátviteli útvonalak szabályozzák, működésük létfontosságú a mikrobiális fertőzések leküzdésében [Lemaitre és mtsai., 1995; Lemaitre 2004]. A Toll és Imd útvonalak egyes komponensei nagyfokú hasonlóságot mutatnak az emlősök interleukin-1 (IL1), a Toll-szerű receptorok (TLR) és a tumor nekrozis faktor (TNF) jelátviteli útvonalaihoz, ami ezen jelátviteli útvonalak ősi eredetére utal.

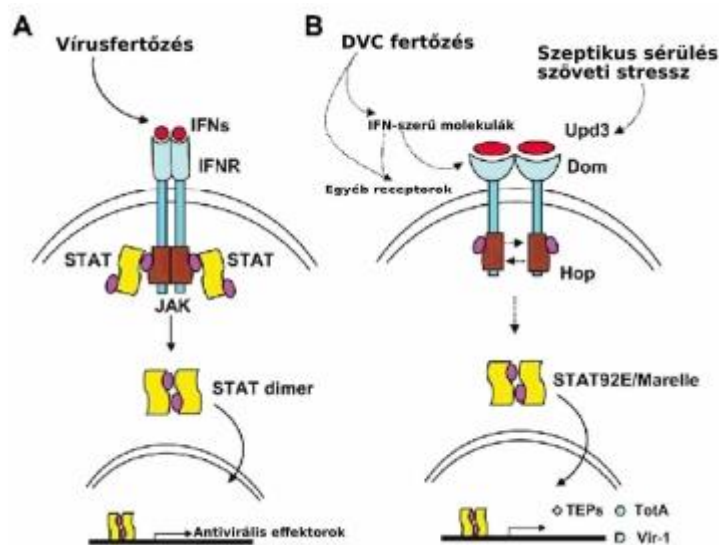
Drosophilában a különböző típusú mikroorganizmusok egymástól eltérő jelátviteli útvonalakat aktiválnak [Medzhitov és mtsai., 1997; Akira és mtsai., 2003; Gay és Keith 1991, Rutschmann és mtsai., 2000; Lemaitre és mtsai., 1997, Royet és mtsai., 2005, Cherry és Silverman 2006] (5. Ábra). A Gram-pozitív baktériumok és a gombák elsősorban a Toll receptoron keresztüli jelátviteli útvonalat, míg a Gram-negatív baktériumok a peptidoglikán receptorokon (PGRP) keresztül az Imd jelátviteli útvonalat aktiválják [Lemaitre és mtsai., 1996; Belvin és Anderson 1996; Rutschmann és mtsai., 2000; Valanne és mtsai., 2011, Mellroth 2003; Steiner 2004; Gottar és mtsai., 2002]. A Gram-pozitív lizin típusú és Gram-negatív diaminopimelinsav (DAP) típusú baktériumok specifikus felismerésének alapja a baktériumok sejtfalában lévő peptidoglikán (PG) szerkezetének különbözősége [Kleino és Silverman 2014]. A Toll és az Imd jelátviteli útvonalak az NF- κ B transzkripció faktor *Drosophila* homológjainak, a

"Dorsal-related immunity factor" (Dif), illetve a Relish (Rel) transzkripciósfaktoroknak a sejtmagba juttatásával aktiválják a különböző antimikrobiális peptideket kódoló géneket [Lemaitre és mtsai., 1995b; Ip és mtsai., 1993; Dushay és mtsai., 1996; Hedengren és mtsai., 1999; Choe és mtsai., 2002].



5. Ábra. A Toll és az Imd jelátviteli útvonalak *Drosophilában* [Cherry és Silverman 2006. nyomán]

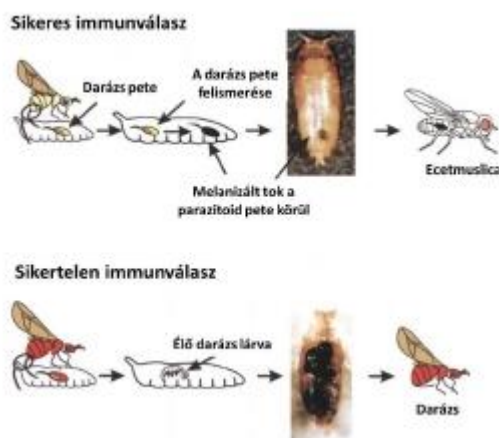
A sérülésekkel együtt járó stressz folyamatok, valamint a vírushatások a Janus family kinase/Signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) jelátviteli útvonalat aktiválják [Wang és mtsai., 2010]. A *Drosophila* Domeless jelátviteli útvonala az emlősök JAK/STAT jelátviteli útvonalaihoz hasonlóan a hemociták, a zsírtest, valamint különböző szolubilis faktorok, citokinek [Vanha-Aho és mtsai., 2016] együttműködésén alapul. A hemociták által termelt Unpaired (Upd3) fehérje a zsírtest sejtjein a Domeless receptorhoz kötődve a JAK/STAT jelátviteli útvonalon keresztül aktiválja a fagocitózis szabályozásában szerepet játszó TurandotA (TotA) fehérjét [Ekengren és mtsai., 2001] (6. Ábra).



6. Ábra. A JAK/STAT jelátviteli útvonal szerepe az emlősök és a *Drosophila* immunválaszában

(A) Emlősökben a JAK/STAT jelátviteli útvonal a vírusfertőzések leküzdésében, (B) *Drosophilában* a vírusfertőzés mellett a sérülésekkel együtt járó fertőzésekre és stresszre adott válaszban játszik szerepet. Szeptikus sérülés esetén a hemociták által termelt Upd3 ligand kötődik a Dom receptorhoz, vírusfertőzés esetén egy interferon szerű molekula kötődik egy eddig ismeretlen receptorhoz, melyek aktiválják a JAK *Drosophila* homológját, a Hopscotch (Hop) molekulát. A Hop a STAT *Drosophila* homológ STAT92E/Mareille aktiválásán keresztül a vírusfertőzés leküzdésében szerepet játszó Vir-1, illetve a fagocitózis szabályozásában résztvevő TotA fehérjét kódoló gének átíródását idézi elő [Wang és Ligoxygakis 2006. nyomán].

Természetes élőhelyén a *Drosophila* lárva fürkészdarazsak támadásainak is ki van téve. Ezek a parazitoidok többnyire a lárva testüregébe helyezik petéiket, és fejlődésük során a gazdaszervezet testnedveivel és szöveteivel táplálkoznak. Sikeres immunválasz esetén a *Drosophila* lárva vérsejtjei a darázspete körül többretegű melanizálódott tokot képeznek és elpusztítják a támadót, sikertelen immunválasz esetén az ecetmuslica bábbréből a darázs kel ki (7. Ábra.) [Nappi és mtsai., 2004].



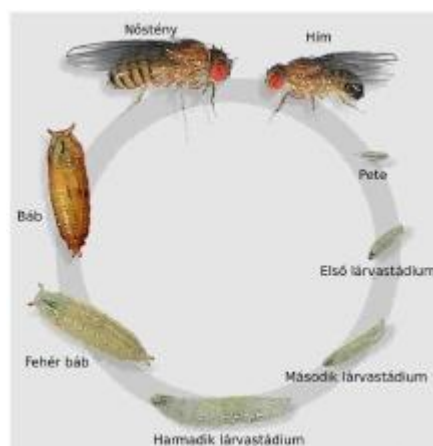
7. Ábra. A *Drosophila* parazitoid darázsfertőzést követő sejt-közvetítette immunválasza [Nappi és mtsai., 2004 nyomán].

1.2 A *Drosophila* vérsejtjei, a hemociták

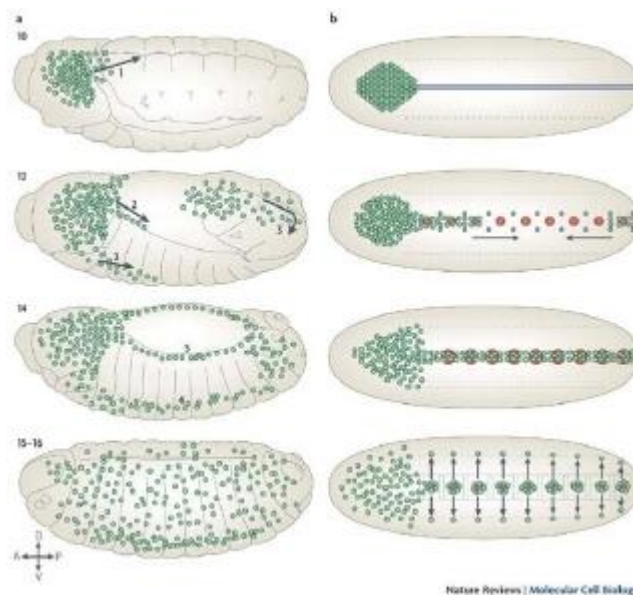
Az emlősök sejt-közvetítette immunválasza mieloid és limfoid eredetű immunsejtek együttműködésén alapul. Az emlősök veleszületett immunitásának sejtjes elemei a professzionális fagociták, a neutrofil granulociták, makrofágok és denditikus sejtek a csírávonalban kódolt mintázatfelismerő receptorokkal azonosítják a mikroorganizmusokra jellemző molekuláris mintázatot [Takeuchi és Akira 2010]. Adaptív immunválaszuk végrehajtó sejtjei a limfociták, melyek specifikitásának repertoárja szomatikus génátrendeződés eredményeként alakul ki [Cook és Tomlinson 1995; Krangel 2009].

A *Drosophila* veleszületett immunitásának effektor sejtjei, a hemociták a mikroorganizmusokat belebelezik, a paraziták által a testüregbe helyezett nagyobb méretű peték körül több sejtrétegből álló tokot képeznek [Rizki és Rizki 1984, Rizki és Rizki 1992; Carton és Nappi 1997, Meister 2004]. Ez a tokképző folyamat az emlősök granuloma képzéséhez hasonlóan zajlik [Sarraf és Sneller 2005].

A *Drosophila* hemocitáinak mintegy 90%-át az emlősök fagocita sejtjeinek megfelelő plazmatociták alkotják. A teljes átalakulással fejlődő *Drosophila* (8. Ábra) embrionális élete során a feji mezodermában kialakuló „embrionális makrofágok” fejlődéstanilag meghatározott útvonalakon vándorolnak az embrióban (9. Ábra). Elsősorban a természetes sejthalált szenvedett sejteket távolítják el, de létfontosságú szerepük van az idegrendszer kialakulásában az extracelluláris mátrix fehérjék, többek között a peroxidazin termelésében [Tepass és mtsai., 1994; Sears és mtsai., 2003, Evans és mtsai., 2010, Pearson és mtsai., 2003]. Az apoptotikus sejtek felismerésében és bekebelezésében az embrionális fagocita sejtekben megnyilvánuló human CD36 homológ Croquemort fehérje, valamint a Draper molekula játszik kulcsfontosságú szerepet [Franc és mtsai., 1999, Manaka és mtsai., 2004, Mattner és mtsai., 2005, Awasaki és mtsai., 2006]. A *Drosophila* embrionális makrofágjai nemcsak az egyedfejlődés során vándorolnak, hanem az embrió szepszikus sérülése esetén is a sérülés környékére csoportosulnak [Stramer és mtsai., 2005].



8. Ábra. A *Drosophila* egyedfejlődése



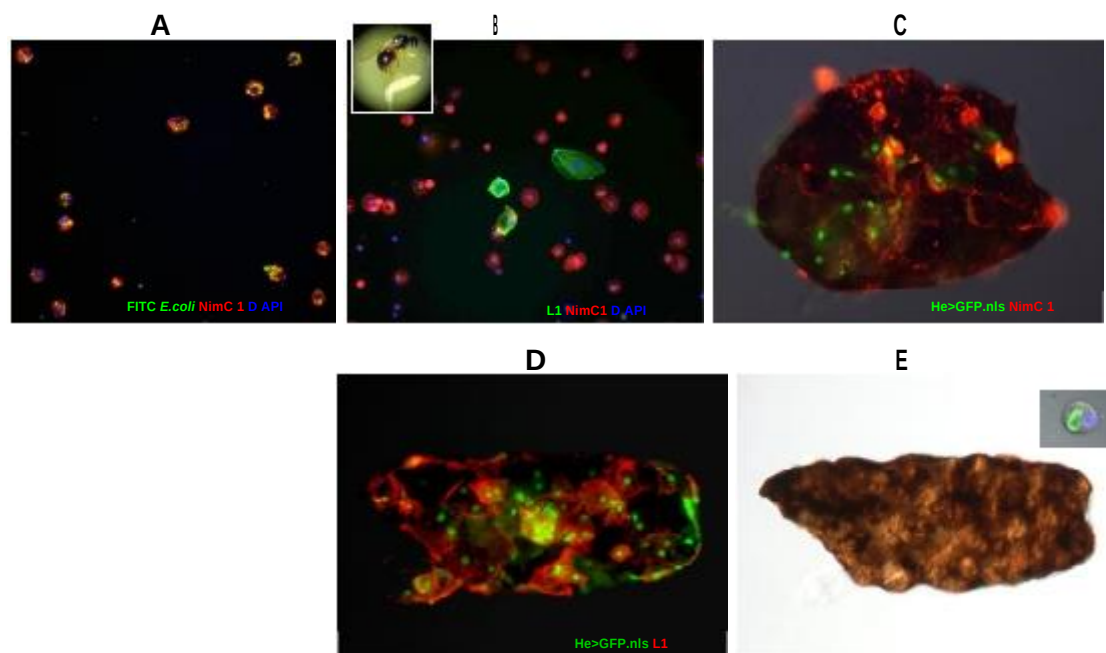
9. Ábra. A *Drosophila* embrionális hemocitáinak vándorlása az egyedfejlődés során

(a) A feji mezodermban kialakuló embrionális hemociták (zöld) vándorlása az embrionális élet során. (b) Az embrionális hemociták (zöld) vándorlását a hasi idegköteg mentén a platelet-derived growth factor (PDGF)/ vascular endothelial growth factor-related factor (VEGF) ligandját a Pvf3-t (kék) és Pvf2-t (piros) kódoló gének szabályozzák [Wood és Jacinto 2007].

A *Drosophila* lárvában és a kifejlett egyedben a plazmatociták elsősorban a gazdaszervezet immunvédekezését szolgálják. A plazmatociták a betolakodó mikroorganizmusokat bekebelezik (10. Ábra, A), illetve antimikrobiális peptideket és extracelluláris mátrix fehérjéket termelnek, de a lárvát érő parazitoid darázsfertőzést követő tokképző reakcióban is szerepet játszanak [Samakovlis és mtsai., 1990, Martinek és mtsai., 2008, Charroux és mtsai., 2009, Defaye és mtsai., 2009, **Honti és mtsai., 2014**]. A plazmatociták által termelt lizoszómális fehérje, a Psidin, a bekebelezett baktériumok lebontásán kívül részt vesz a szisztémás humorális immunválasz aktiválásában is, a bakteriális fertőzés hírvivőjeként a zsírtestet a Defenzin antimikrobiális peptid termelésére készíti [Brennan és mtsai., 2007].

A *Drosophila* hemocitáinak 5%-át az ún. kristálysejtek képezik [Lanot és mtsai., 2001, Milchanowski és mtsai., 2004, Gajewski és mtsai., 2007]. Ezek a kisméretű, törékeny, szférikus sejtek nevüket a citoplazmájukban lévő *black cells* (*Bc*) gén által kódolt profenoloxidáz A1 kristályokról kapták [Rizki és Rizki 1980] (10. Ábra, E). Az embrionális kristálysejtek a proventriculusban helyezkednek el, szerepüket még nem ismerjük. A lárvában a kristálysejtek a szöveti sérülések esetén szétesnek, citoplazmájukból oxidoreduktázok szabadulnak fel, amelyek a melanizáció folyamatát katalizálják.

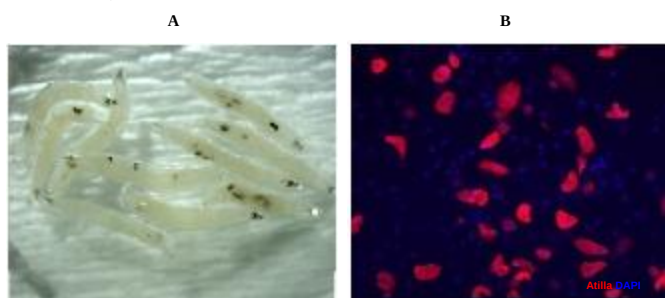
A vad típusú genetikai háttérrel rendelkező *D. melanogaster*-ben a késői harmadik stádiumú lárvák keringésében elvélve előfordul néhány nagyméretű, kiterült hemocita, az ún. lamellocita. Ezek a vérsejtek sem az embrióban, sem a kifejlett egyedben nem találhatók meg, azonban a lárvában parazitoid darázssal történt fertőzést követően nagy számban differenciálódnak (10. Ábra, B) és több rétegben bevonják a gazdaszervezetbe kerülő darázspetét (10. Ábra, D), mely később melanizálódik (10. Ábra, E).



10. Ábra. A *Drosophila* hemocita típusai

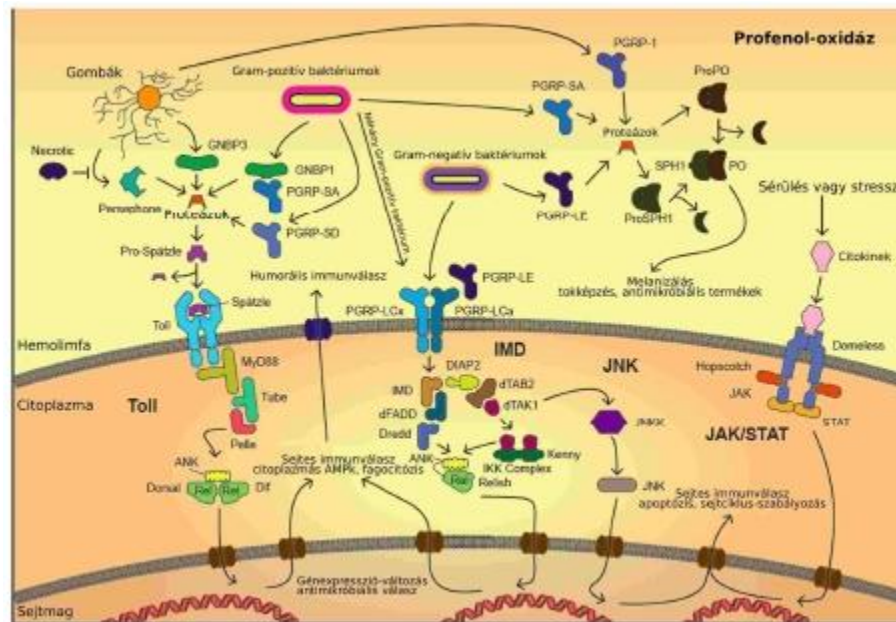
(A) A baktériumokat (zöld) fagocitáló plazmatociták (piros), (B) Plazmatociták (piros) és a parazitoid darázsfertőzés hatására differenciálódó lamellociták (zöld) a keringésben. (C) A plazmatociták (piros) és (D) lamellociták (piros) a darázspete körül többretegű tokot képeznek. (E) A tokba zárt darázspete melanizálásában (barna) a profenoxidáz zárványt (zöld) tartalmazó kristálysejtek is részt vesznek [Márkus R.].

Egyes *Drosophila* mutánsokban darázsszűrő nélkül is nagy mennyiségben differenciálódnak lamellociták (11. Ábra B) és ezekben az állatokban legtöbbször melanotikus pszeudotumorkok is megfigyelhetők (11. Ábra A) [Minakhina és mtsai., 2006]. Ezek a mutációk általában tumor szuppresszor géneket érintenek, illetve a JAK/STAT, vagy a Toll jelátviteli útvonalak aktiválását követően lamellociták differenciálódását eredményezik (11. Ábra) [Konrad és mtsai., 1994, Harrison és mtsai., 1995, Lagueux és mtsai., 2000, Luo és mtsai., 2002, Meister és mtsai., 2004, Lemaitre 2004, Qiu és mtsai., 1998, Lavine és Strand 2002].



11. Ábra. Az *l(3)mbn-1* tumor szuppresszor mutáns *Drosophila* lárvák és keringő hemocitáik

(A) Melanotikus tumorok az *l(3)mbn-1* lárvákban. (B) A lárvák hemolimfájában immunindukció nélkül is sok a lamellocita (piros) [Kurucz É.].



12. Ábra. A *Drosophila* immunválaszában szerepet játszó jelátviteli útvonalak [Bordenstein Lab, NSF DEB-1046149 nyomán]

1.3 A hemociták képződése

Az evolúció folyamán a rovarok és az emlősök fejlődése több millió évvel ezelőtt vált el egymástól, véresejtképzésük szabályozása mégis hasonlóságokat mutat. A véresejtek képződése mind a *Drosophila*, mind az emlősök esetében térben és időben több hullámban történik. A véresejt előalakok fenntartásában és a különböző véresejt populációk leszármazási vonalainak meghatározásában egymással homológ, a transzkripció szintjén szabályozó elemek vesznek részt, a különböző funkciójú immunsejtek közös előalakokból fejlődnek és a véresejtek kialakulásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak egyes elemei is evolúciós konzerváltságot mutatnak.

A *Drosophila* egyedfejlődése során a hemociták képződése térben és időben két jól ismert hullámban, az embrióban és a lárvában történik, de egyes kutatások szerint a felnőtt állatok potrohának dorsális részén szintén megfigyelhetők olyan, hemocitákat és hemocita előalakokat tartalmazó képződmények, melyeknek szerepük lehet a hematopoezisben [Ghosh és mtsai., 2015, Ramond és mtsai., 2015, Letourneau és mtsi., 2016, Parsons és Foley 2016]. Az embriogenezis korai szakaszában a feji mezoderma sejtjeiből képződő hemociták, a lárvális élet során két kompartmentumot alkotnak, a nyílt keringési rendszerben áramló hemocitákat, azaz a keringő hemocitákat, valamint a testüreg falához és a szövetekhez kitapadt ún. szesszilis szövetet. Az embrió kardiogén mezoderájából alakul ki a *Drosophila* lárvá harmadik hemocita kompartmentuma, szívcső mentén elhelyezkedő kettőtől öt páros lebenyből álló szerv, a központi vérképző szerv, a lymph gland (13. Ábra A).

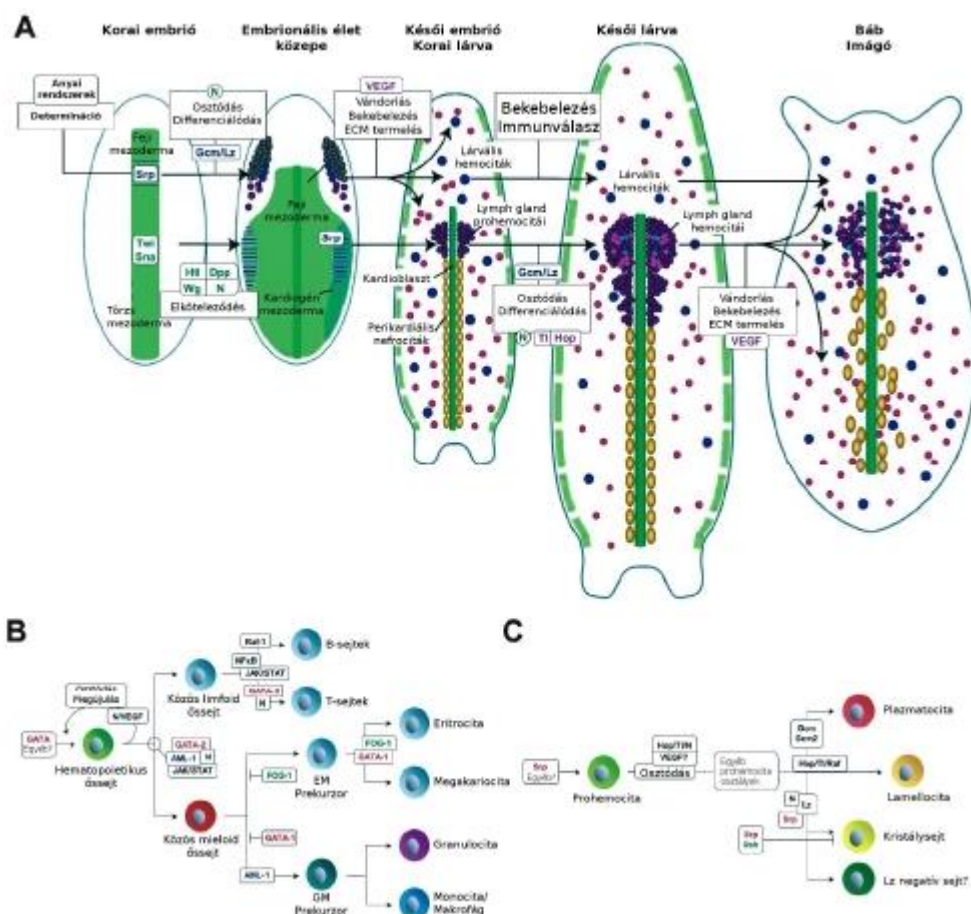
A *Drosophilában* a hemociták kialakulását az emlősök GATA, RUNX és Friend-of-GATA családba tartozó transzkripciós faktorok (13. Ábra B) *Drosophila* homológjai (13. Ábra C) szabályozzák (1. Táblázat). Az embrióban a hemocita irányban elkötelezett prohemociták a GATA családba tartozó Serpent (Srp) transzkripciós faktort termelik. Az embriogenezis során mind a plazmatociták, mind a kristálysejtek a Serpent-t kifejező prohemocitákból fejlődnek, a

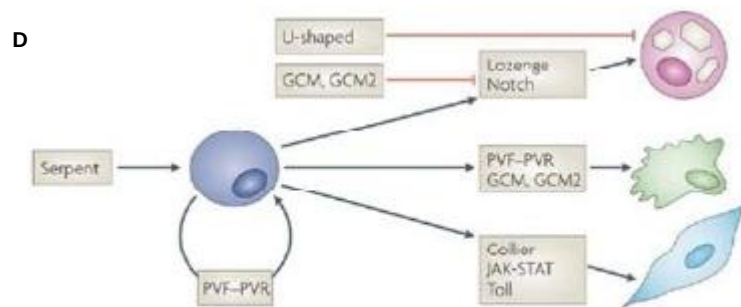
kristálysetek az emlős RUNX homológ Lozenge (Lz) irányításával, a plazmatociták a Glial cells missing (Gcm) és Glial cells missing-2 (Gcm2) közreműködésével [Lebestky és mtsai., 2000, Duvic és mtsai., 2002, Fossett és mtsai., 2003, Waltzer és mtsai., 2003, Mandal és mtsai., 2004, Bataille és mtsai., 2005, Ferjoux és mtsai., 2007].

1. Táblázat.

A vérképzésben résztvevő transzkripciós faktorok *Drosophilában* és gerincesekben

	<i>Drosophila</i>	Gerinces homológ	
Serpent	vérsejt identitás	patkány GATA1,2,3	eritropoezis, megakariopoezis, T-sejt limfopoezis
U-shaped	kristálysejt sors gátlás	patkány FOG1	eritropoezis megakariopoezis,
Lozenge	kristálysejt sors kialakítás	patkány RUNX1	definitív hematopoiesis megakariocita differenciálódás
Gcm/Gcm2	plazmatocita sors	patkány Gcm1,2	funkció nem ismert
Collier	lamellocita sors	patkány EBF1	B sejt limfopoezis

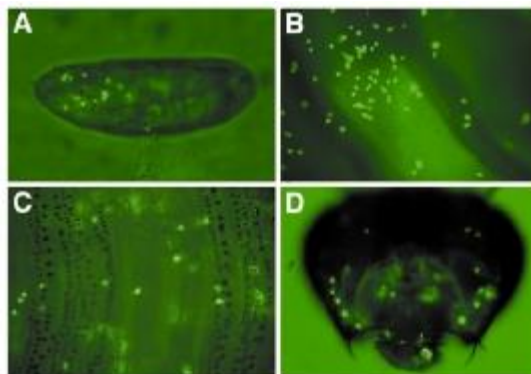




13. Ábra. Hemocita képződés *Drosophilában*

(A) A hemociták identitását korai embrióban a GATA faktor Serpent (Srp) kifejeződése határozza meg. Az embrionális élet középső szakaszában a hemociták a Srp-t kifejező pro-hemocitákból alakulnak ki a Notch (N), a Glial-cells-missing (Gcm), valamint a Runx homológ Lozenge (Lz) transzkripciós faktorok segítségével. Ugyanekkor alakul ki a kardiogén mezoderma is, a Heartless (Htl), Decapentaplegic (Dpp), Wingless (Wg) és Noch (N) jelátviteli útvonalak közreműködésével. A késő embrionális, korai lárvális stádiumban az érett hemociták a vascular endothelial growth factor (VEGF) jelátviteli útvonal irányításával bebarangolják a testüreget, miközben a kardiogén mezodermből kifejlődik a szívcső a perikardiális sejtekkel és a szívcső két oldalán páros lebenyekből álló, prohemocitákat tartalmazó központi hemocita képző szerv, a lymph gland. A késői lárvá stádiumban Srp-t kifejező prohemociták a N, Toll (Tl) és Hopscotch (Hop) jelátviteli útvonalak közreműködésével élénken osztódnak, majd a N, Gcm, és Lz faktorok segítségével plazmatocitákká, vagy kristálysejteké differenciálódnak, minek következtében a lymph gland lebenyeinek mérete megnő. A különböző hemocita leszármazási útvonalak kialakulásának összehasonlítása (B) emlősökben és (C) rovarokban [Evans és mtsai., 2003. nyomán]. (D) A különböző sejsorsok, kristálysejt (piros) plazmatocita (kék) és lamellocita (zöld) kialakításában szerepet játszó transzkripciós faktorok és jelátviteli útvonalak. A PVR receptor tirozin kináz és három ligandja a PVF1, PVF2 és PVF3 az embrióban a hemociták fennmaradásában, a lymph glandban pedig a hemociták proliferációját szabályozzák. A friend-of-GATA homológ U-shaped az embrióban a kristálysejtek differenciálódását gátló faktor. A lymph gland-ben a lamellociták differenciálódását a JAK/STAT és a Toll jelátviteli útvonalak, valamint a Collier transzkripciós faktor szabályozza [Wood és Jacinto 2007].

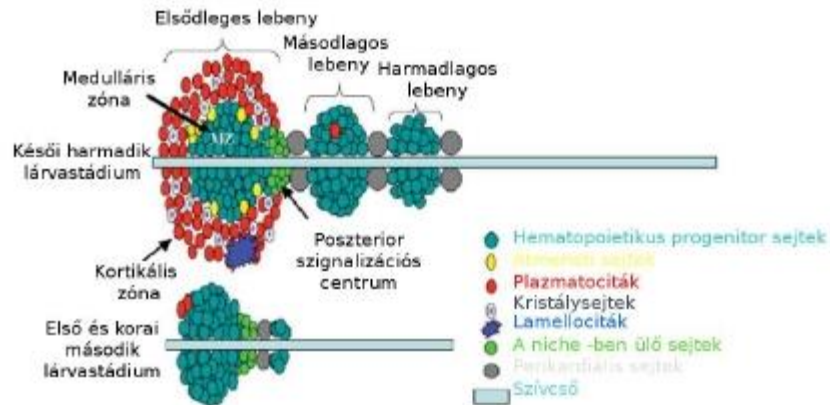
Az embrióban megközelítőleg 700 plazmatocita és 30 kristálysejt alakul ki. A zölden fluoreszkáló GFP fehérjével jelölt embrionális hemocitákat jelöletlen embriókba ültetve (14. Ábra A) az GFP fehérjével jelölt embrionális eredetű hemociták túlélnek a metamorfózist, majd kimutathatók mind a lárvá keringésében lévő hemociták között (14. Ábra B), mind a korai bábban (14. Ábra C) és a kifejlett egyedben (14. Ábra D) [Holz és mtsai., 2003].



14. Ábra. Hemocita transzplantáció *Drosophiában*

(A) Egyetlen transzplantált zölden fluoreszkáló GFP fehérjével jelölt embrionális hemocita utódai a GFP jelöletlen 17. stádiumú embrióban, (B) késői harmadik stádiumú lárvában, (C) pre-pupában és a (D) 14 napos kifejlett egyed fejében. [Holz és mtsai., 2003].

Sokáig egyeduralkodó volt az a nézet, hogy a lárvális vérképzés kizárólagos helye a központi vérsejtképző szerv, a lymph gland. A harmadik lárv stádiumban a lymph gland két első lebenye a szerkezetileg tagolódnak, a medulláris részét éretlen prohemociták alkotják, melyek progenitor státuszát a JAK/STAT jelátviteli rendszer tartja fenn [Agaisse és Perrimon 2004]. Ez a progenitor sejt populáció szignifikánsan magasabb koncentrációban tartalmaz reaktív oxigén módosulatokat (ROS), ami a Janus kináz (JNK) jelátviteli útvonalon keresztül differenciálódásra készíti a prohemocitákat. A lymph gland progenitor sejtjeiből csak a harmadik lárvális stádiumban kezdenek differenciálódni a plazmatociták, kristálysejtek és lamellociták, melyek a kortikális régiót népesítik be. Az első lebeny hátulsó részén található egy jelátviteli központot, a posterior hematopoietic center (PSC), amely a hemociták homeosztázisát sejtgyűlések, ún. citonémák közvetítésével irányítja. A PSC feltételezések szerint a gerinces hematopoietikus őssejtfészkekhez (niche) hasonlóan működik (15. Ábra) [Krzemien és mtsai., 2007, Mandal és mtsai., 2007, Owusu-Ansah és Banerjee 2009, Evans és mtsai., 2014].



15. Ábra. A lymph gland szerkezete a korai és késői lárvális élet során [Owusu-Ansah és Banerjee 2009. nyomán]

A lymph gland-ből hemociták csak a lárvális élet legvégén, a bábozódás előtt, annak felbomlása során jutnak a keringésbe, ahol túlnyomó többségük elsősorban a metamorfózis során lebomló szövetek bekebelezését végzi [Grigorian és mtsai., 2011]. Ez azt jelenti, hogy a központi vérsejtképző szervben zajló hematopoézis a korai lárvális stádiumokban nem járul hozzá a keringő hemocitákhoz, ami egy további lárvális vérsejtképző kompartmentum létezését valószínűsíti.

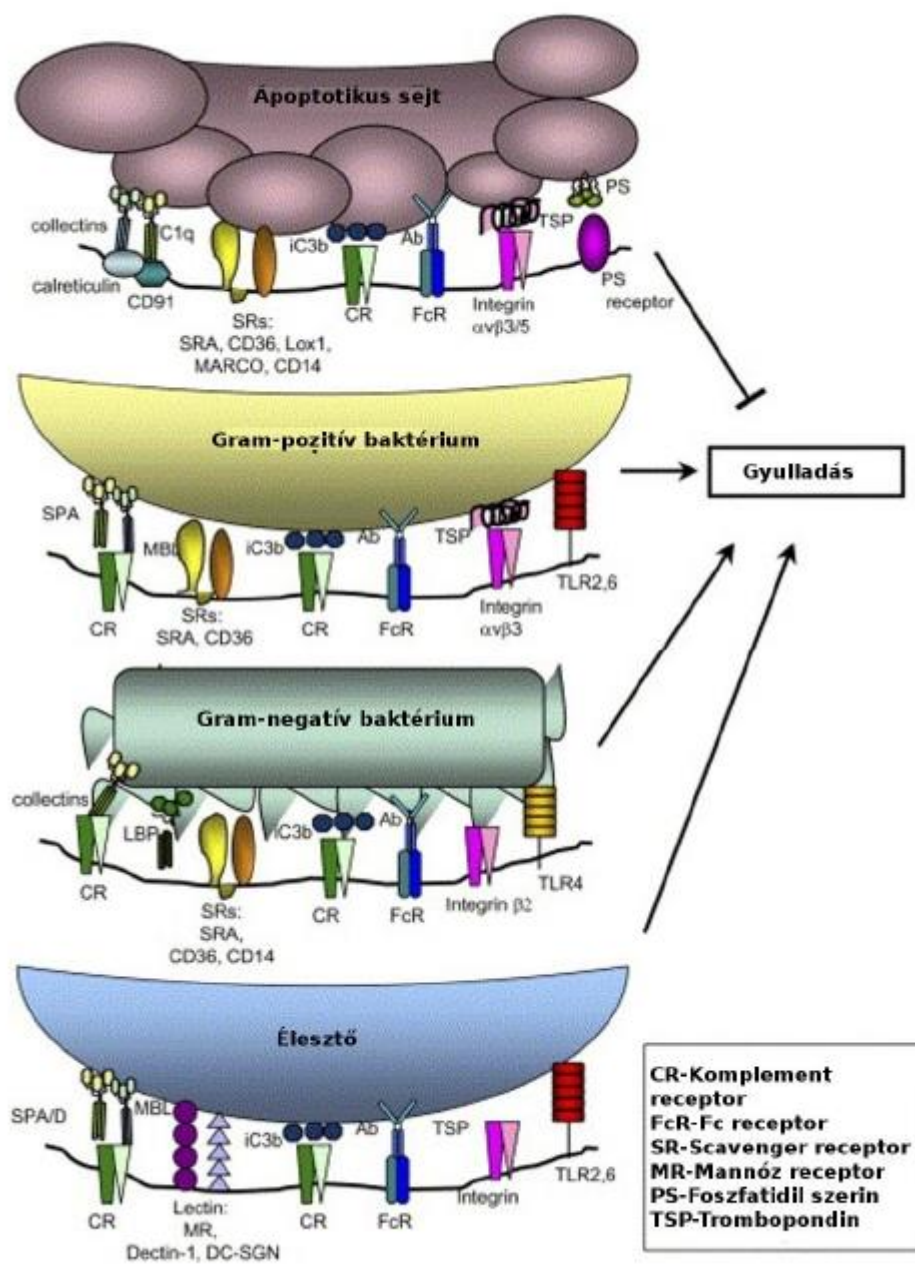
A hemociták proliferációját a gerincesek platelet-derived growth factor (PDGF) és vascular endothelial growth factor (VEGF) *Drosophila* homológja, a Pvr tirozin kináz receptor, valamint a Ras/Raf jelátviteli útvonal szabályozza [Bruckner és mtsai., 2004]. A Ras/Raf jelátviteli útvonal túlaktiválása mind emlősökben mind rovarokban, amint azt korábban csoportunk közreműködésével igazoltuk [Asha és mtsai., 2003], kontrollálatlan vérsejt proliferációhoz vezet. Az emlősök vérképzésében és immunválaszában szerepet játszó JAK/STAT jelátviteli útvonal túlműködése *Drosophila* lárvákban a plazmatociták proliferációját és lamellociták képződését eredményezi [Harrison és mtsai., 1995; Sorrentino és mtsai., 2002]. A

Drosophila Toll jelátviteli útvonala, amely hasonlóságot mutat a gerincesek Toll-like receptorok által indukált jelátviteli útvonalaéhoz, szintén szerepet játszik mind a központi vérsejtképző szervben, mind a keringésben lévő hemociták proliferációjának és differenciálódásának a szabályozásában [Qui és mtsai., 1998]. Az immunsejtek képződésében és funkciójában tapasztalt nagyfokú hasonlóság olyan távoli taxonómiai csoportok között, mint az emlősök és a rovarok, szintén alátámasztja a *Drosophila* modellrendszer létjogosultságát azokban az összehasonlító vizsgálatokban, amelyek a veleszületett immunitás folyamatainak megismerésére irányulnak [Gold és Brückner 2015].

1.4 A *Drosophila* sejt-közvetítette immunitása

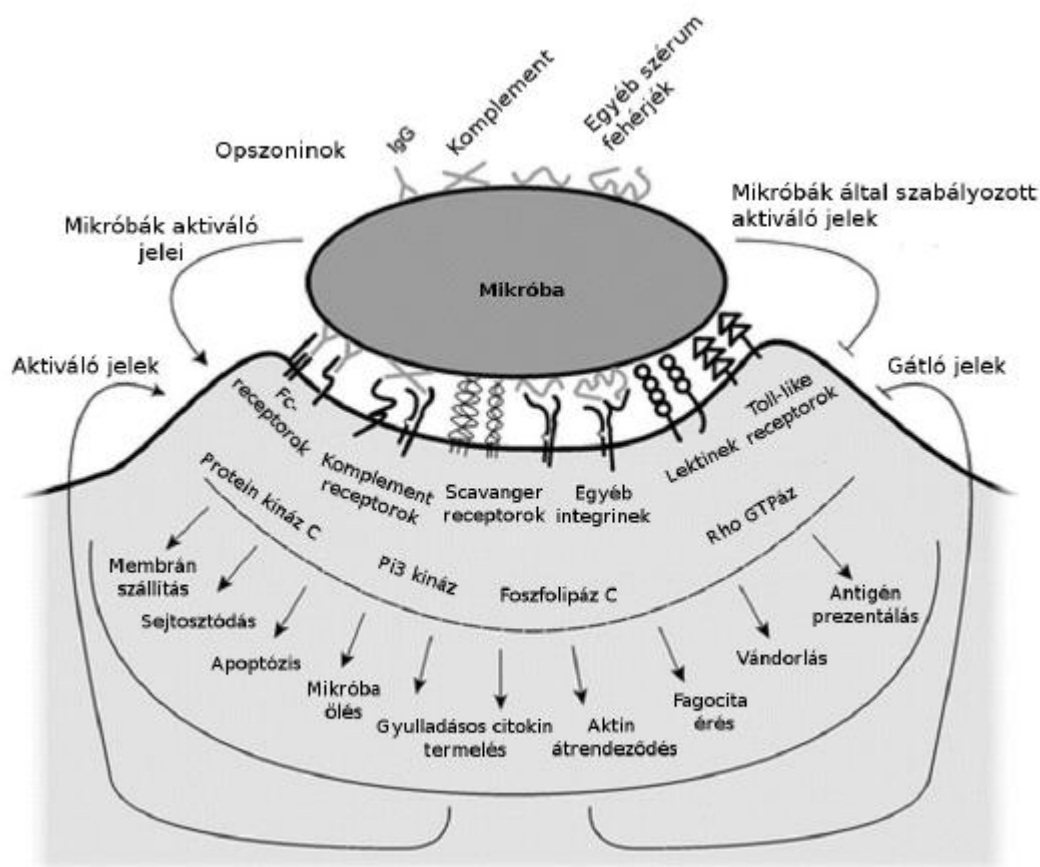
A *Drosophila* sejt közvetítette immunválasza a bekebelezés és a tokképző reakció [Rizki és Rizki 1984, Mackenzie és mtsai., 2011]. A *Drosophila* fagocita sejtjei, a plazmatociták, a gerincesekhez hasonlóan a mikroorganizmusok bekebelezését végzik. A nagyméretű és nem fagocitálható testidegen anyagokat, így a testüregebe kerülő parazitoid darazsak petéit a *Drosophila* hemocitái több rétegben körülvéve tokba zárják. Ebben a tokképző reakcióban minden típusú immunsejt részt vesz, először a plazmatociták tapadnak a pete felszínére, ezt követően a plazmatociták és a lamellociták beburkolják azt, majd a kristálysejtekből, illetve a legújabb eredmények szerint a lamellocitákból is felszabaduló oxido-reduktáz enzimek által kiváltott melanizáció- során képződő toxikus anyagok elpusztítják a petét [Williams és mtsai., 2005, Williams és mtsai., 2006; Williams 2007, Dudzic és mtsai. 2015].

A fagocitózis a különböző anyagok felismerésének, megkötésének, bekebelezésének és lebontásának összehangolt folyamata [Metchnikoff 1908, Aderem és Underhill 1999]. A fagocitózis egyaránt jól bevált formája az egysejtűek táplálkozásának, az egyedfejlődés folyamán a természetes sejthalált szenvedett sejtek lebontásának, valamint az veleszületett immunitás során a mikroorganizmusok eltávolításának [Greenberg és Grinstein 2002; Desjardins és mtsai., 2005]. A fagocita sejtek legkifinomultabb működése az emlősökben történő antigén feldolgozás és bemutatás, mellyel a fagociták a specifikus immunválasz végrehajtó sejtjei, a limfociták számára az antigén felismerését teszik lehetővé [Kovacsócs-Bankowski és Rock 1995, Medzhitov és mtsai., 1997, Houde és mtsai., 2003, Barral és Brenner 2007]. Az emlősök professzionális fagocita sejtjei a makrofágok és a neutrofil granulociták, melyeknek *Drosophila* megfelelői a plazmatociták [Gordon és mtsai., 1986, Stuart és Ezekowitz 2005]. A fagocitózis folyamata az emlősökben és rovarokban hasonlóan zajlik, így a receptorok, az opszoninok, az aktin sejtváza átrendeződése és a fagoszómák szintjén is hasonlóságokat mutat. A fagocita sejtek rendkívül változatos receptor molekulákkal különböztetik meg a saját és nem saját struktúrákat, illetve az apoptotikus sejteket (16. Ábra) [Stroschein-Stevenson és mtsai., 2005].



16. Ábra. A mikroorganizmusok és apoptotikus sejtek felismerésében és megkötésében szerepet játszó receptorok [Stuart és Ezekowitz 2005. nyomán]

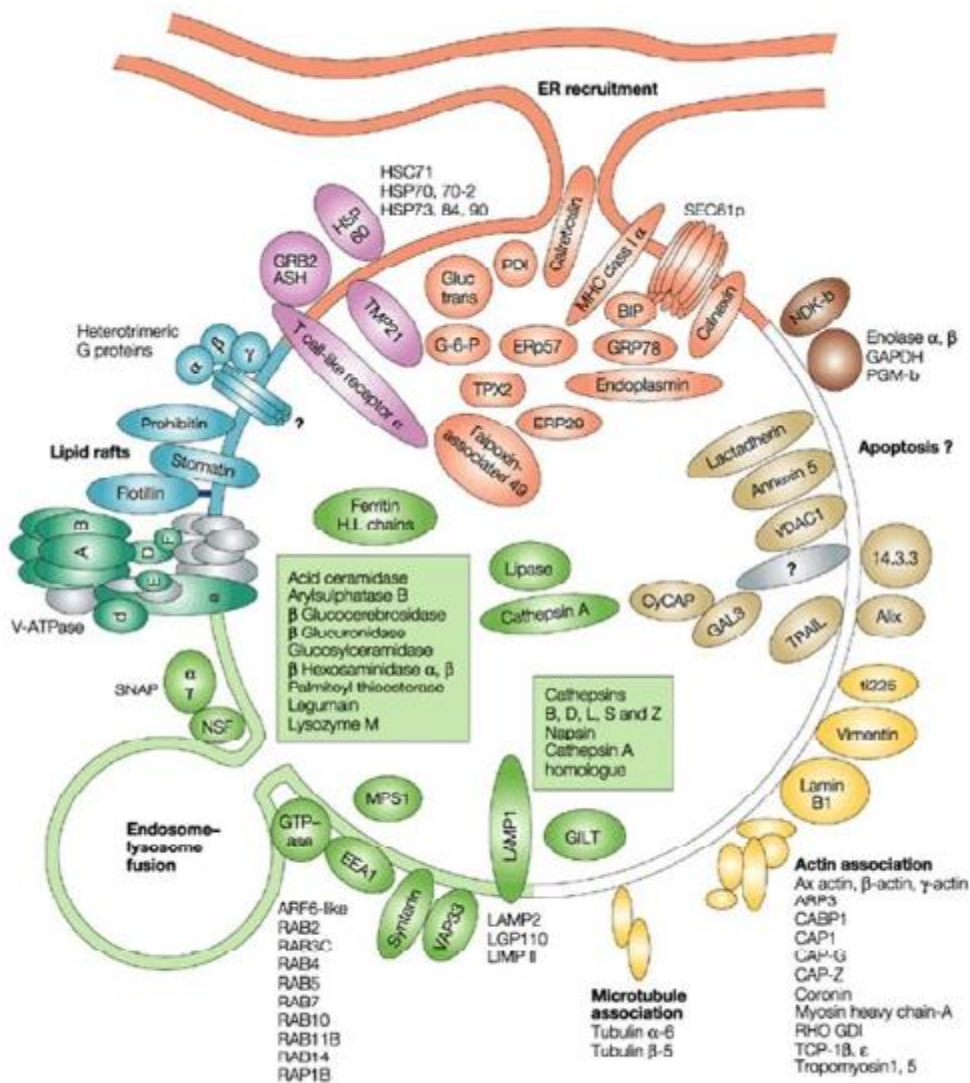
A receptor molekulák ligandkötése különböző jelátviteli útvonalakon keresztül az aktin sejtváza és a sejtmembrán átrendeződéséhez vezet, a megkötött testidegen részecske a fagoszómába zárva a sejt citoplazmájába kerül (17. Ábra) [Swanson és mtsai., 2004, Castellano és mtsai., 2001, Antonny és mtsai., 2006].



17. Ábra. A fagocitózis összetett folyamata

A különböző receptor molekulák közvetlenül, vagy opszoninok közreműködésével kötik a mikroorganizmusokat. A receptorok ligandkötése során aktiválódó jelátviteli útvonalakon keresztül a fagocitózist elősegítő, illetve gátló impulzusok érik a fagocita sejteket.

A fagoszóma ezután endoszómákkal és lizoszómákkal egyesül és savas hidrolízissel bontja le a bekebelezett részecskéket. A fagoszóma rendkívül komplex sejtorganellumok. A *Drosophila* fagoszóma legalább hatszáz olyan fehérjét tartalmaz, amely szerepet játszik a működésében, ezek hetven százalékának emlős ortológjait is azonosították, ami arra utal, hogy a *Drosophila* a fagocitózis vizsgálatára is alkalmas modellrendszer (18. Ábra) [Garin és mtsai., 2001, Desjardins 2001, Desjardins 2003, Stuart és mtsai., 2007].

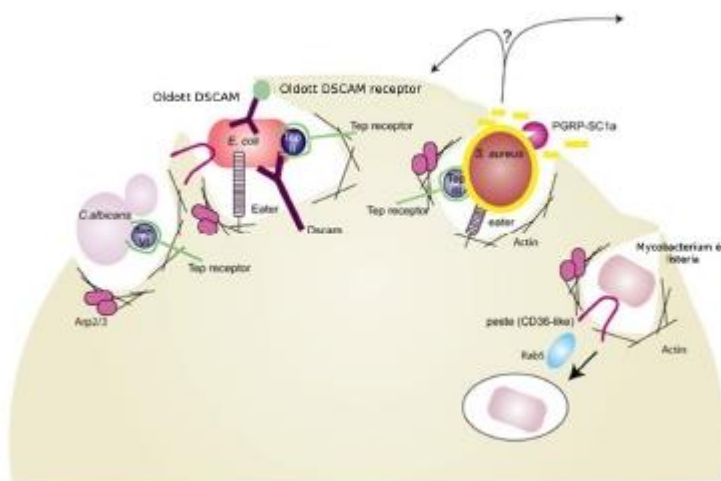


17. Ábra. Proteomikai módszerekkel azonosított fagoszómális fehérjék [Desjardins 2003]

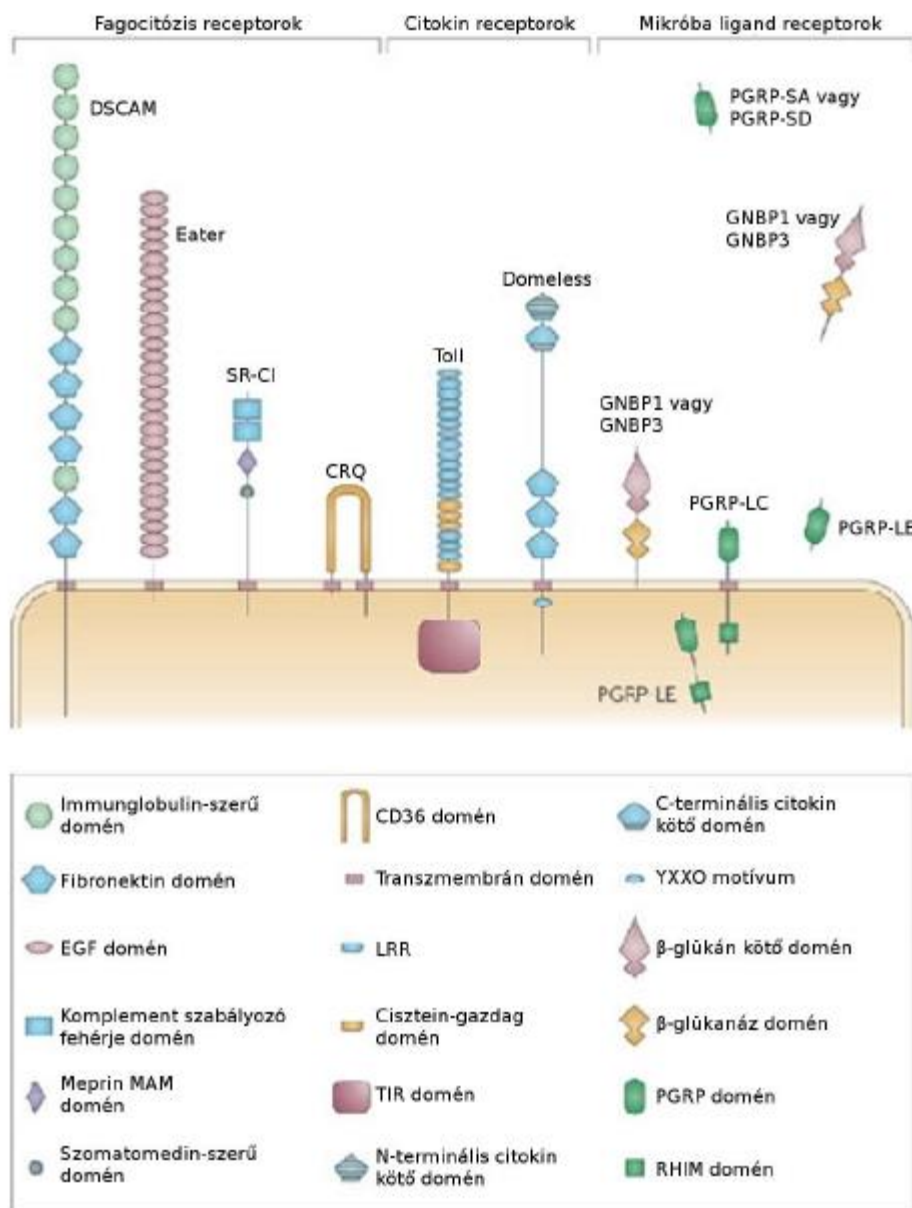
A fagocitózis komplex folyamatának vizsgálata, elsősorban a kulcsfontosságú komponenseinek redundanciája miatt, nem egyszerű feladat. Az emlősök fagocita sejtjein megnyilvánuló receptor molekulák szerepének tisztázására e receptorokat elsősorban a COS-7 afrikai zöld majom vese sejtvonalban, vagy génkiűtött egerekből származó sejtekben fejeztették ki [Ezekowitz és mtsai., 1991]. Így derítettek fényt többek között az Fc receptorok fagocitózisban betöltött szerepére is [Indik és mtsai., 1995]. Mivel a *Drosophila* is rendelkezik fagocita sejtekkel és genetikai rendszere az emlősökénél könnyebben kezelhető, kézenfekvőnek látszott a fagocitózis folyamatát és a fagocitózisban résztvevő receptorokat *Drosophila* modellrendszerben tanulmányozni [Rämet és mtsai., 2002].

Drosophilában a fagocitózisban résztvevő molekulák (19, 20 Ábra) és folyamatok vizsgálatára elsősorban az embrionális makrofágokból alapított Schneider2 (S2) sejtvonalat használják [Rämet és mtsai., 2001b, Ulvila és mtsai., 2006]. Az S2 sejtekben a teljes genomot átfedő kettősszállú RNS interferenciával történő géntermék csendesítéssel azonosítottak a fagocitózisban szerepet játszó géneket. Ezzel a módszerrel több olyan génterméket sikerült azonosítani, amelyek a vezikula transzportban, vagy az aktin sejtvezeték átrendeződésében vesznek részt [Rämet és mtsai., 2002, Stuart és mtsai., 2005, Philips és mtsai., 2005, Stroschein-Stevenson és mtsai., 2005, Agaisse és mtsai., 2005, Cheng és mtsai., 2005, Kocks és mtsai., 2005]. Szintén e módszer alkalmazásával találták meg a Gram-negatív baktériumok fagocitálásában szerepet játszó peptidoglikán receptor membránba ágyazott formáját (PGRP-LC), valamint az első *Drosophila* scavenger receptort (SR-CI) is [Takehana és mtsai., 2004, Rämet és mtsai., 2001b, Pearson és mtsai., 2005]. További kettősszállú RNS interferencián alapuló vizsgálatok olyan fagocitózisban szerepet játszó molekulák azonosításához vezettek, mint az opszoninként funkcionáló tioészter tartalmú fehérjék (TEP), amelyek szelektíven kötik a *C. albicans*-t (MCR), az *E. coli*-t (TEPII) és a *S. aureus*-t (TEPIII), vagy a baktériumokat kötő, epidermális növekedési faktorhoz (EGF) hasonló ismétlődő szekvenciákat tartalmazó Eater receptor molekula [Levashina és mtsai., 1995, Stroschein-Stevenson és mtsai., 2005, Kocks és mtsai., 2005, Chung és Kocks 2012].

Drosophilában eddig két, a humán CD36-hoz hasonló molekulát azonosítottak. Az egyik a Croquemort (CRQ), nevének jelentése, temetkezési vállalkozó, az embrió egyedfejlődése során természetes sejthalált szenvedett sejtek eltávolításában játszott szerepére utal [Franc és mtsai., 1996, Franc és mtsai., 1999, Philips és mtsai., 2005]. A Croquemort kifejlett állatokban történő megnyilvánulása rávilágított a molekula egy másik funkciójára, a *Staphylococcus aureus*-t kötő képességére. Ez a felismerés vezetett el ahhoz, hogy később az emlősökben is kimutatták a CD36 molekula *S. aureus* kötő képességét és közreműködését a TLR2 és TLR6 jelátviteli útvonalakban [Stuart és mtsai., 2005, Hoebe és mtsai., 2005]. A másik humán CD36 homolog a Peste molekula, amely a sejten belül szaporodó opportunistá patogén *Mycobacterium fortuitum* megkötését végzi *Drosophilában* és, mint később kiderült, emberben is [Philips és mtsai., 2005].



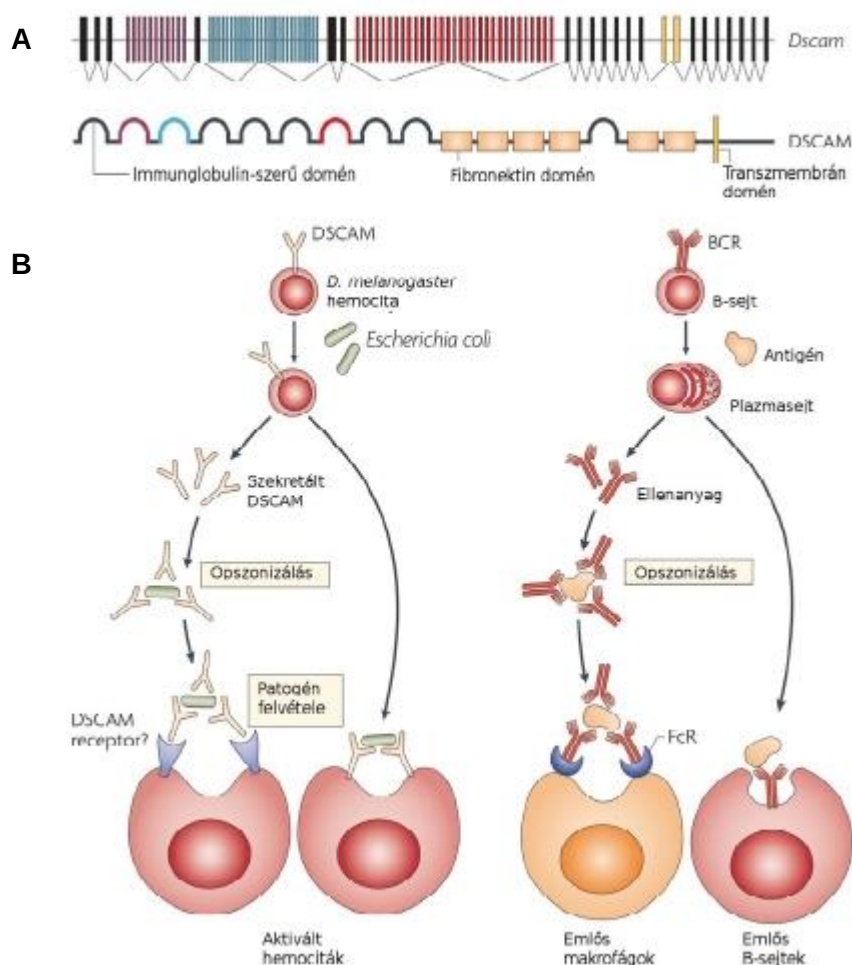
19. Ábra. A *Drosophila* fagocitózisában szerepet játszó molekulák [Cherry és Silverman 2006. nyomán]



20. Ábra. A *Drosophila* fagocitózisában szerepet játszó molekulák domén szerkezete

[Ferrandon és mtsai., 2007. nyomán]

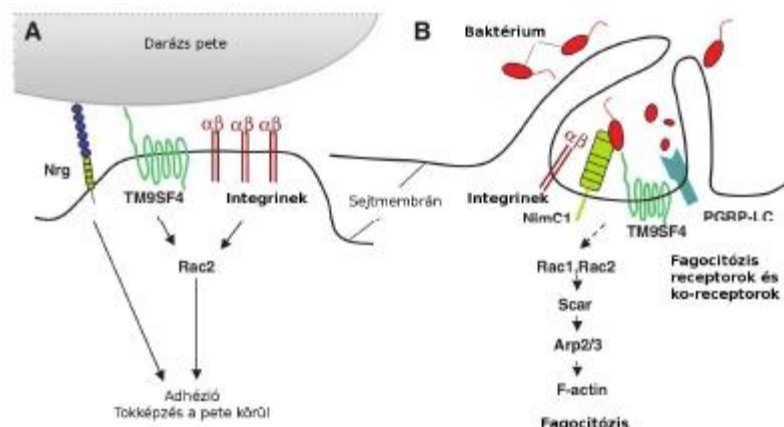
A baktériumok széles skáláját megkötni képes Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam) molekula rendkívüli diverzitását négy exonja alternatív kivágódása biztosítja, amely elméletileg harmincnyolc-ezer féle fehérje izoformát képes létrehozni (21. Ábra) [Schmucker és mtsai., 2000, Watson és mtsai., 2005, Meijers és mtsai., 2007]. Ez a diverzitás elsősorban a molekula extracelluláris régiójában található immunglobulin- és fibronectin szerű egységeit érinti. A plazmamembránba ágyazott formáján kívül a hemolimfában oldott állapotban opsoninként is működik, a gombákban található b-1,3-glucan-t kötő Gram negatív baktériumkötő fehérje (GNBP) molekulákhoz, vagy a PGRP receptorokhoz hasonlóan.



21. Ábra. A DSCAM molekula és az emlős immunoglobulin molekulák

(A) A *Drosophila* DSCAM molekula és a *Dscam* gén szerkezete. (B) A *Drosophila* DSCAM molekula az emlősök immunoglobulin molekuláihoz hasonlóan ismeri fel a testidegen antigéneket, mind sejthez kötött, mind szekretált formában. [Stuart és Ezekowitz 2008. nyomán].

A *Drosophila* sejt-közvetítette immunválaszának másik formája a tokképzés, amelyet a lárvába bekerülő nagyméretű, ezért nem fagocitálható testidegen részecskék váltanak ki. A *Drosophilá*ba helyezett parazitoid darázspeték hatására a lárvában hirtelen megemelkedik a hemolimfában keringő vérsejtek száma [Russo és mtsai., 1996]. A darázspete környezetében plazmatociták gyülekeznek, melyek ellaposodva rátapadnak a petére, miközben kifejlődik egy új típusú hemocita, a lamellocita [Rizki és Rizki 1992, Carton és mtsai., 1997, Letourneau és mtsai., 2016]. A plazmatociták adhéziójában és alakváltoztatásában az integrinek [Irving és mtsai., 2005], valamint a kis GTP-áz Rac2 molekula játszik kitüntetett szerepet (22. Ábra) [Williams és mtsai., 2005, Williams és mtsai., 2006, Avet-Rochex és mtsai., 2007, Fauvarque és Williams 2011].

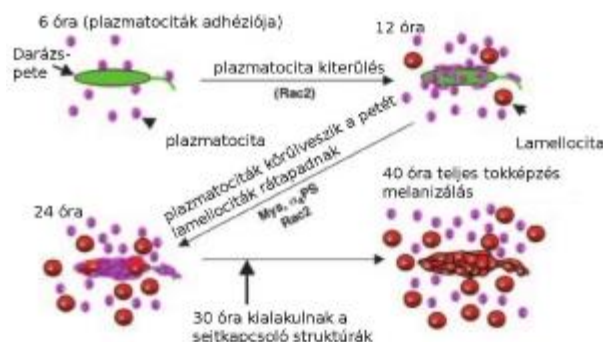


22. Ábra. A hemociták alakváltozásában szerepet játszó reakció utak

(A) A darázipetéhez tapadó hemocitákban a kilenc transzmembrán doménnel rendelkező *Drosophila* nonaspanin TM9SF, a human L1CAM homológ Neuroglial (Nrg) és a β PS integrinek a kis GTP-áz Rac2 közreműködésével váltják ki a sejtalak megváltoztatásához szükséges F-aktin citoszkeleton átrendeződését.

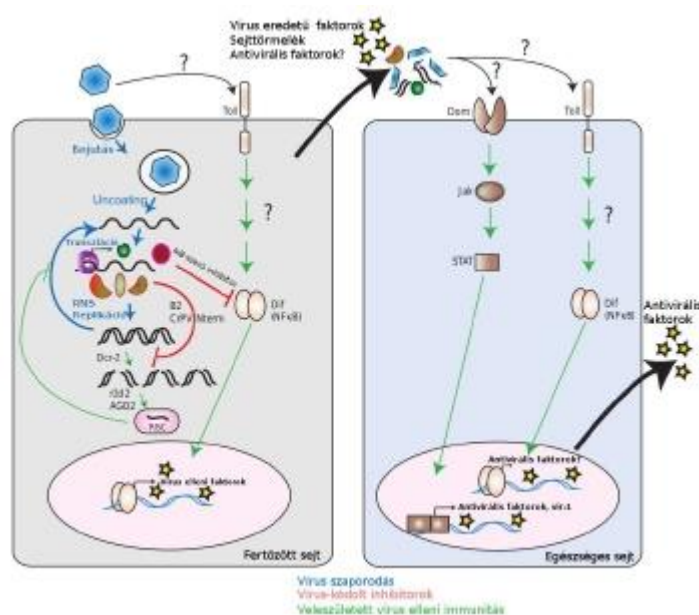
(B) A fagocitózis folyamatában még nem ismerjük azokat a ko-receptorokat, (talán az integrinek lehetnek ilyen ko-receptorok) amelyek a fagocitózis receptorok ligand kötését követően a bekebelezéshez szükséges citoszkeletális átrendeződésekhez elengedhetetlen jeleket szolgáltatják a kis GTP-áz Rac1, Rac2, a Scar aktin nukleációt elősegítő faktoron, és az Arp2/3 actin-related proteinen keresztül [Fauvarque és Williams 2011. nyomán].

A plazmatocitákkal körülvett darázipetére ezután lamellociták tapadnak, és több rétegű tokot képeznek a parazita körül (23. Ábra), amely végül a kristálysejtekből és a lamellocitákból felszabaduló profenoloxidáz katalizáló hatására melanizálódik [Söderhäll és Cerenius 1998, Dudzic és mtsai., 2015]. A *Drosophilában* azonosított három profenoloxidáz izoforma közül kettő kristálysejtekben (DoxA1, DoxA3), míg a harmadik (CG8193) lamellocitákban termelődő zimogén formában is aktív, ami arra utal, hogy a lamellociták önmagukban is képesek melanizációt kiváltani [Irving és mtsai. 2005]. A parazita peték enkapszulációjának folyamatában még számtalan kérdés megválaszolásra vár. Nem tudjuk, hogy mely molekulák teszik lehetővé a fejlődéstaniilag ilyen közelálló rovarfajok között a testidegen struktúrák azonosítását és azt sem, hogy melyek azok a lamellocitákon megnyilvánuló receptor, illetve adhézións molekulák, amelyek szerepet játszanak a tokképzés folyamatában.



23. Ábra. A parazitoid darázipete körül kialakuló tokképző reakció folyamata [Williams 2007. nyomán]

A veleszületett immunitás a vírusok ellen is védelmet nyújt (24. Ábra). Az emlősök a vírusok struktúrfelhéjére, illetve nukleinsavaira specifikus mintázatfelismerő receptorokkal rendelkeznek. Egyes Toll-szerű molekulák szintén a vírusok megkötésére specializálódtak. A sejten belüli kettősszalú RNS felismerését citoplazmatikus mintázat felismerő receptorok végzik és Toll-szerű receptorok által használt jelátviteli mechanizmusok aktiválásával, az NF- κ B transzkripciós faktoron keresztül az I-es típusú interferonok termelődéséhez vezetnek. Az RNS interferencia, amely egy általános antivirális mechanizmus, *Drosophilában* az endogén retrotranszpozonok mozgását és aktiválódását is gátolja, mellyel ellenőrzés alatt tartja a mutációs frekvenciát.

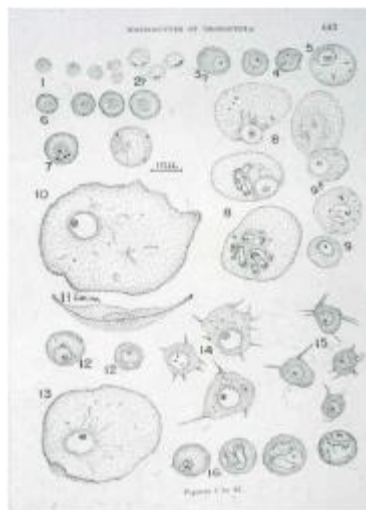


24. Ábra. *Drosophila* védekezése a vírusok ellen

A vírusfertőzés során a vírus életciklusának minden lépéséhez a gazdasejt erőforrásait használja (kék). A vírus RNS replikációjának következtében a sejtben megjelenő kettősszalú vírus eredetű RNS molekulákat a gazdasejt RNS interferencia mechanizmusa lebontja (zöld), de a vírusok a gazdasejt antivirális folyamatait gátló faktorokat termeltetve csökkenthetik ennek hatékonyságát (piros). A különböző vírusfertőzések hatására különböző jelátviteli útvonalak aktiválódhatnak, pl. a *Drosophila* X vírus fertőzése a Toll, a *Drosophila* C vírus fertőzése a JAK/STAT jelátviteli útvonalakat indítja be, melynek következtében vírus ellenes faktorok termelődnek [Cherry és Silverman 2006. nyomán].

1.5 Hemocita alpopulációk azonosítása *Drosophilában*

A *Drosophila* lárva hemocitáit korábban kizárólag morfológiai jegyeik alapján különböztették meg egymástól. A plazmatociták és kristálysejtek 10-15 μ m átmérőjű szférikus sejtek, de a kristálysejtek általában zárványokat is tartalmaznak, míg a lamellociták 30-50 μ m átmérőjű lemezszerűen ellapult sejtek (25. Ábra). A morfológiailag jellemzett hemocitákhoz később funkciót is sikerült kapcsolni; a plazmatociták bekebelezik a mikrobákat és az apoptotikus sejteket, a lamellociták tumorokban fordulnak elő és a paraziták petéi körül tokot képeznek, míg a kristálysejtek a melanizációhoz szükséges enzimeket szolgáltatják.



24. Ábra. A *Drosophila* lárva hemocitái [Rizki és Rizki 1980]

A *Drosophila* tipikus hemocita alakjai mellett a keringésben és a testüreg falához tapadó szesszilis szigeteken a hemociták között számtalan morfológiai átmenet figyelhető meg és a morfológiai jellemzők nem minden esetben egyeznek a meghatározott funkcióval. A szilárd fázishoz kitapadó plazmatociták ellapulva nagyobbak tűnnek, a lamellociták differenciálódásuk során szintén változtatják alakjukat és méretüket és a kristálysejtek sem minden esetben tartalmaznak zárványokat, ezért világossá vált, hogy a hemociták rendszerezéséhez és funkcióik meghatározásához molekuláris markerekre van szükség.

Munkatársaimmal a kilencvenes évek közepén született meg az az elhatározásunk, hogy a veleszületett immunitás tanulmányozását az emberi, a bovin és a porcin hemociták CD (Cluster of Differentiation) rendszerének létrehozásában végzett munkáink [Andó és mtsai., 1984, Kurucz és mtsai., 1993, Vilmos és mtsai., 1996] tapasztalatait felhasználva, a nagy múltú és széleskörűen jellemzett genetikai háttérrel rendelkező *Drosophila* modellszervezetben folytatjuk tovább.

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 a felhasználásával 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

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 hemocitákon kifejeződő molekulák azonosítása

A *Drosophila* lárva hemocitáinak azonosításához hemocita specifikusan kifejeződő molekulákat, a hemociták különböző alosztályainak immunválaszban betöltött szerepének a vizsgálatához a plazmatocitákon, a kristálysejteken, illetve a lamellocitákon szelektíven megnyilvánuló molekulákat azonosítottunk. A *Drosophila* hemocitáinak minden típusát és fejlődési állapotát egy időben reprezentáló hemocita túltermelő *l(3)mbn-1* tumor szuppresszor mutáns [Konrad és mtsai., 1994] harmadik stádiumú lárváiból izolált hemocitákkal egereket immunizáltunk és monoklonális ellenanyagokat (mAb) állítottunk elő [Kurucz és mtsai., 2007a]. A hibridóma felülűszókkal az *l(3)mbn-1* mutáns és a vad típusú Oregon R lárvák hemocitáit festettük. Az ellenanyagok által azonosított antigének egy része minden hemocitán kifejeződött (H1, H2, H3), mások a morfológiai és funkcionális kritériumok alapján meghatározott hemocita populációknak megfelelően a fagocitáló plazmatocitákon (P1, P3), a tokképző lamellocitákon (L1, L2, L3, L4, L5, L6) vagy a kristálysejteken (C2, C3, C4, C5) nyilvánultak meg (1. Táblázat). Az antigének molekulatömegét Western blot analízissel határoztuk meg (1. Táblázat). Eritópoanalízissel a P1 molekulán két epitópot (P1a és P1b), az L1 molekulán három epitópot (L1a, L1b, L1c) azonosítottunk.

A *Drosophila* immunsejtjeinek heterogenitását definiáló molekuláris markereket a human leukocitákon monoklonális ellenanyagokkal azonosított markerekhez hasonlóan klaszterekbe soroltuk (1. Táblázat) [Kurucz és mtsai., 2007a].

1. Táblázat.

Drosophila hemocitáin azonosított molekuláris marker molekulák

Hemocita típus		Molekulatömeg (kDa)	Monoklonális ellenanyagok (mAb)	
Lárvális hemocitákon kifejeződő markerek:				
H1	minden hemocita	150	anti-H1 (H11)	IgG1
H2	minden hemocita	30–60	anti-H2 (1.2)	IgG2a
H3	minden hemocita	16	anti-H3 (4A12)	IgG1
P1a	plazmatocita	95	anti-P1a (N1)	IgG1
P1b	plazmatocita	95	anti-P1b (N47)	IgG1
P3	plazmatocita alpopuláció	*	anti-P3 (8B1)	IgG1
L1a	lamellocita	16	anti-L1a (H10)	IgG1
L1b	lamellocita	16	anti-L1b (7A6)	IgG1
L1c	lamellocita	16	anti-L1c (29D4)	IgG1
L2	lamellocita	20, 50, 110	anti-L2 (31A4)	IgG2a
L4	lamellocita	86	anti-L4 (1F12)	IgG1
L5	lamellocyte alpopuláció	90, 240	anti-L5 (4B8)	IgG1
L6	lamellocyte alpopuláció	*	anti-L6 (H3)	IgM
C2	kristálysejt	*	anti-C2 (21D3)	ND
C3	kristálysejt	*	anti-C3 (10D2)	ND
C4	kristálysejt	*	anti-C4 (9C8)	ND
C5	kristálysejt	*	anti-C5 (1.19)	ND

A kifejlett egyed hemocitáin kifejeződő marker:

Ad1	minden felnőtt hemocita	8	anti-Ad1 (7C8)	IgG3
-----	-------------------------	---	----------------	------

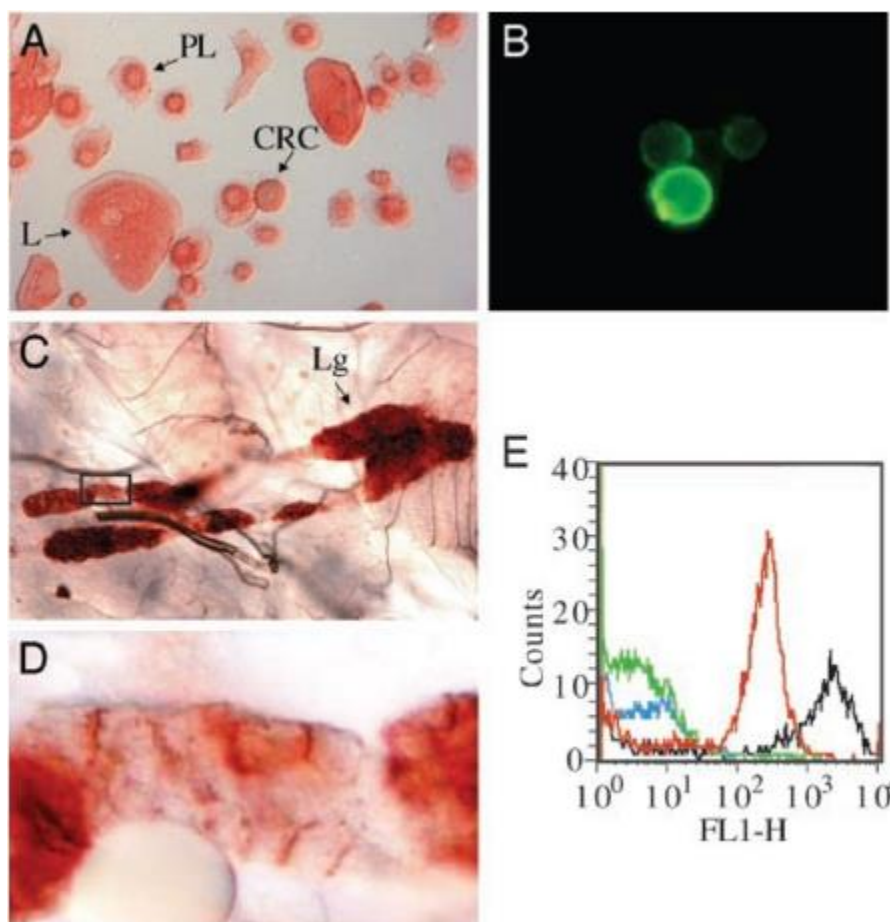
* Western blot analízissel nem detektálható; az ellenanyag minden bizonnyal olyan konformáció függő epitópot ismer fel, melynek szerkezete denaturáló körülmények között megváltozik.

ND: Nem lett meghatározva [Kurucz és mtsai., 2007a nyomán].

3.2. A paraziták elleni tokképző reakció molekuláris vizsgálata

3.2.1. A *Hemese* gén szerepe a lamellociták kialakulásában

A laboratóriumunkban előállított ellenanyagok tesztelése során azt tapasztaltuk, hogy a H2 antigén a *Drosophila* egyedfejlődése során az embrióban nem, de a lárvában hemocita specifikusan fejeződik ki. A lárvá keringésében minden típusú hemocitán, a plazmatocitákon (PL), a lamellocitákon (L) és a kristálysejteken (CRC) (1. Táblázat és 1. A ábra) is megnyilvánul, a központi vérsejtképző szervben lévő hemocitákon (1. C Ábra), valamint a testüreg falához kitapadt szesszilis hemocitákon szintén kifejeződik, de egyéb szövetekben nem mutatható ki. A H2 molekula a bábban található hemocitákon még megfigyelhető, de a felnőtt egyedek vérsejtjein már nincs jelen. Az élő hemociták indirekt immunfluoreszcencia festést követő mikroszkópos (1. Ábra B) és áramlási citometriás vizsgálata (1. Ábra E) megmutatja, hogy a H2 antigén a hemociták sejtmembránjába ágyazódó molekula, mely mind a vad típusú Oregon R lárva (1. Ábra E, piros), mind az *l(3)mbn-1* mutáns (1. Ábra E, fekete) keringő hemocitáinak több mint 98%-án jelen van.



1. Ábra. A H2 molekula szöveti lokalizációja és áramlási citometria analízise

Az *l(3)mbn-1* lárvákból izolált hemocitákat (A) és lymph gland-et (C, D) fixálás után anti-H2, StreptABComplex HRP-Duet kít ellenanyaggal (A, C, D) reagáltattuk. Az élő sejteket (B, E) anti-H2 ellenanyaggal és FITC-tal jelölt anti-egér ellenanyaggal tettük láthatóvá. A H2 molekula az összes keringő hemocitában, a lamellocitákban (L), a plazmatocitákban (PL) és a kristály sejtekben (CRC), valamint a lymph gland-ben (Lg) is kifejeződik. Az Oregon R (piros) és az *l(3)mbn-1* mutáns (fekete) élő hemocitáinak indirekt immunfluoreszcenciát követő áramlási citometria vizsgálat során a keringő hemocitákat anti-H2 ellenanyagot tartalmazó hibridóma felülúszóval és FITC-tal jelzett anti-egér ellenanyaggal festettünk. A negatív kontrol minták esetében (Oregon R: zöld; *l(3)mbn-1*: kék) szövettényésztő médiumot és FITC-tal jelzett anti-egér ellenanyagot használtunk (E).

[Kurucz és mtsai., 2003 nyomán]

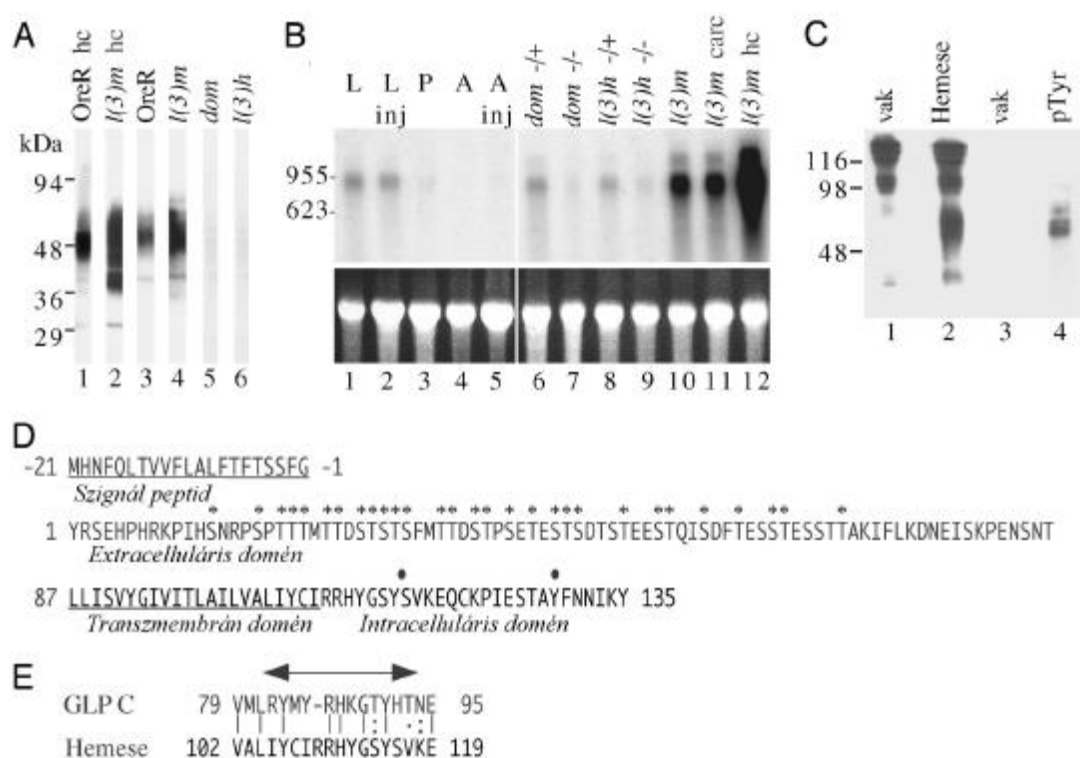
A H2 antigén molekulatömegét Western blot analízissel határoztuk meg (2. Ábra A). Vad típusú Oregon R és *l(3)mbn-1* mutáns teljes lárvákból és a lárvákból izolált hemocitákból kivonat készítettünk, negatív kontrollként a hemocita hiányos *domino* és *l(3)hem* törzseket használtuk. A hemocitákat tartalmazó mintákban (2. Ábra A 1-4) 37-70 kDa molekulatömeg közötti tartományban erős jelet kaptunk, míg a hemocita hiányos *domino* és *l(3)hem* mutánsok lárváiból készített kivonatban a H2 molekula jelenléte nem volt kimutatható, tehát a H2 molekula a hemociták jelenlétéhez köthető.

A H2 molekulát kódoló gén azonosításához az *l(3)mbn-1* mutáns lárvákból expressziós génkönyvtárat hoztunk létre (Anyagok és Módszerek) és azt a H2 molekulát felismerő monoklonális ellenanyaggal teszteltük. A génkönyvtárból három olyan, egymástól független,

cDNS klónt izoláltunk, melyek szekvenciájuk alapján transzmembrán fehérjét kódolnak. Az azonosított cDNS-ek Northern blot analízise (2. Ábra, B) hemocita specifikus kifejeződést mutatott. A *Drosophila* lárva és báb összes hemocitáján megnyilvánuló H2 molekulát kódoló gént, a magyarok ősanijáról, Emeséről neveztük el, a "H" betű a hemocitákon történő kifejeződésre utal.

A *Hemese* gén egyedfejlődés során történő RNS szintű kifejeződését, vad típusú Oregon R lárvában (2. Ábra B 1. minta), *Enterobacter cloacae* baktériummal fertőzött vad típusú Oregon R lárvában (2. Ábra B 2. minta), bábban (2. Ábra B 3. minta), felnőtt egyedekben (2. Ábra B 4. minta) valamint *Enterobacter cloacae* baktériummal fertőzött felnőtt egyedekben (2. Ábra B 5. minta) vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy a *Hemese* gén transzkripciója a H2 antigén kifejeződéséhez hasonlóan, kizárólag a lárvális és báb egyedfejlődési stádiumokban történik meg. A *Hemese* gén felnőtt egyedekben nem nyilvánul meg. Az *l(3)mbn-1* mutáns esetében a *Hemese* gén transzkripcióját tapasztaltuk mind a teljes lárvákban (2. Ábra B 10. minta) mind az *l(3)mbn-1* lárvákban izolált hemocita mintákban (2. Ábra B 12. minta). A kivérezetett lárva maradványban (carcas) is jelentős mennyiségű *Hemese* mRNS-t találtunk (2. Ábra B 11. minta), ami valószínűleg a testüreg falára kitapadt szesszilis hemocitákból és a központi vérsejtképző szerv hemocitáiból származott. A hemocita hiányos *domino* mutáns (2. Ábra B 7. minta), és az *l(3)hem* homozigóta lárvákban (2. Ábra B 9. minta) a heterozigóta kontrollokkal (2. Ábra B 6. és 8. minta) összehasonlítva csak kis mennyiségű *Hemese* mRNS-t detektáltunk. A *Hemese* cDNS klónok közel azonos nagyságú poliadenilált inszerteket tartalmaznak, a transzkript teljes hossza 673 nukleotid, amely megfelel a Northern blot analízissel kapott 0.7-0,8 kb értéknek. Bár a *Hemese* gén szekvenciája nem illett rá egyetlen, a *Drosophila* genom szekvencia adatbázisban található prediktált gén szekvenciájára sem, viszont három ún. expressed sequence tag (EST) szekvenciában és egy publikálatlan adatbázisban (GenBank accession nos. A1534405, B1633401, B1636404, AY034881) felleltük. Ennek alapján a *Hemese* gén a *Drosophila* 2. kromoszómáján a 34E1-2 citológiai régióban található. A *Hemese* transzkript egyetlen 156 aminosavból álló open reading frame-t (ORF) tartalmaz, ami egy transzmembrán régióval rendelkező, a szignálpeptidet leszámítva 15 kDa molekulatömegű fehérjét kódol (2. Ábra D). A 86 aminosavból álló N-terminális sejtén kívüli régió 29 potenciális O-glikozilációs helyet tartalmaz; feltehetően az erős O-glikozilációnak köszönhető a Western blot analízissel kapott molekuláris heterogenitás. A *Hemese* fehérje erősen hidrofób transzmembrán régióját egy rövid, sejtén belüli domén követi, amely egy potenciális tirozin és egy potenciális szerin foszforilációs helyet tartalmaz. Immunprecipitációt követő Western blot analízissel anti-foszfotirozin ellenanyag segítségével kísérletesen is kimutattuk a *Hemese* molekula tömegének megfelelő tartományban a tirozin foszforilációját (2. Ábra C).

Bár az adatbázisokban BLAST kereséssel nem találtunk *Hemese* homológokat, a magas O-glikoziláció (sziálsav) alapján a *Hemese* fehérje az emlősök glikoforinjaival mutat hasonlóságot, melyek a vörösvértestek membránjába ágyazódott glikoproteinek. A glikoforinokhoz hasonlóan a *Hemese* is egy kisméretű erősen O-glikozilált transzmembrán fehérje, mely az intracelluláris régiójában tartalmaz egy, a glikoforin C Band4.1 fehérjét kötő szekvenciához hasonló rövid szekvenciát [Marfatia és mtsai., 1995]. Néhány glikoforinra jellemző, hogy SDS-ellenálló homodimereket képeznek, ezért valószínűsíthető, hogy a Western blot analízis során kapott 50-70 kDa-os erőteljes jelek (2. Ábra A) dimerizációval keletkezett termékek.



2. Ábra. A Hemese gén kifejeződése és szekvenciája

(A) A hemocitákon megnyilvánuló H2 molekula Western blot analízise vad típusú Oregon R (ORE) és hemocita túltermelő *l(3)mbn-1* lárvákból származó hemocita (hc) (1. és 2. minta), valamint teljes lárvákból (3. és 4. minta) származó mintákban, illetve a hemocita hiányos *domino* (*dom*) (5. minta) és hemocita hiányos *l(3)hem* (*l(3)h*) mutánsokból (6. minta) készített kivonatokban, anti-H2 ellenanyag felhasználásával.

(B.) Vad típusú Oregon R lárvákból (L) (1. minta), *Enterobacter cloacae* baktériummal injektált (inj) Oregon R lárvákból (L) (2. minta), Oregon R bábokból (P) (3. minta), Oregon R felnőtt egyedekből (A) (4. minta), *Enterobacter cloacae* baktériummal injektált (inj) Oregon R felnőtt egyedekből (A) (5. minta), a hemocita hiányos *domino* és *l(3)hem* mutánsok heterozigóta (6. és 8. minta) és homozigóta (7. és 9. minta) lárváiból, valamint a hemocitákat túltermelő *l(3)mbn-1* mutáns lárváiból (10. minta), *l(3)mbn-1* mutáns kivérezetett lárvá maradványból (*carc*) (11. minta), illetve az *l(3)mbn-1* mutáns izolált hemocitáiból (12. minta) teljes RNS-t izoláltunk és Hemese cDNS próbával Northern blot analízist végeztünk (felső sor). Az izolált RNS-k minőségét és mennyiségét az etidiumbromid kontroll szemlélteti (alsó sor).

(C) A Hemese fehérje tirozin foszforilációja. A Hemese fehérjét *l(3)mbn-1* hemociták kivonataiból immunprecipitáltuk, majd gélelektroforézist követően Western blot analízisnek vetettük alá anti-H2 (2. minta), és anti-foszfortirozin ellenanyag (3. minta) alkalmazásával. Az 1. és 3. minta (vak) képe a negatív kontrollként használt, hemocita lizátummal nem inkubált ProteinG Szefarózhhoz kötött ellenanyag Western blot analízisét mutatja.

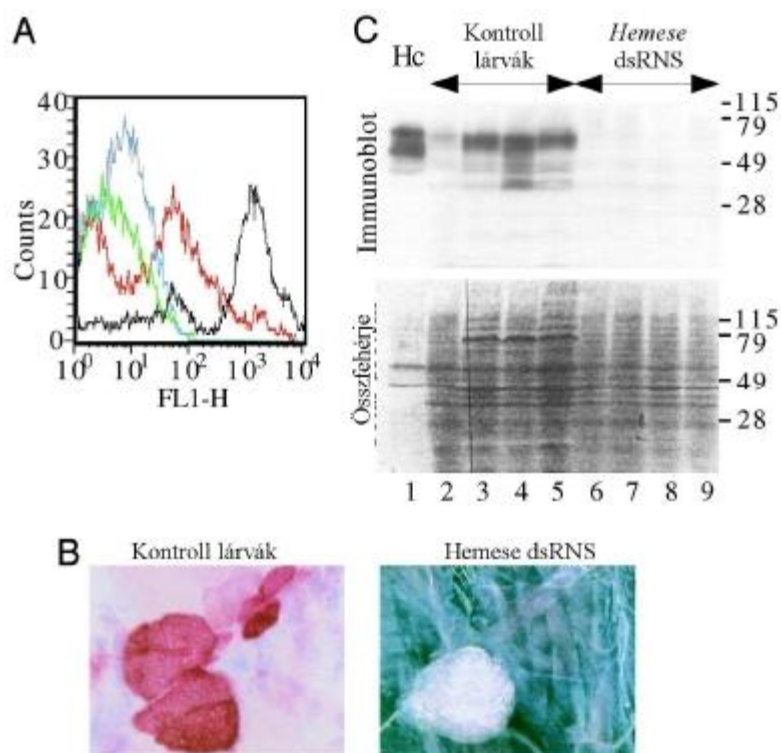
(D) A Hemese gén által kódolt fehérje aminosav szekvenciájában fellelhető hidrofób szakaszokat, a szignál peptidet és transzmembrán régiót aláhúzással emeltük ki, míg a lehetséges glikozilációs helyeket csillaggal, a foszforilációs helyeket pedig pontokkal jelöltük.

(E) A Hemese fehérje és a human glikoforin C (GLP C) molekula konzervált motívumai. A nyílak a glikoforin C molekulának a Band 4.1 fehérjével történő kapcsolódási régióját szemléltetik.

[Kurucz és mtsai., 2003 nyomán]

Annak igazolására, hogy a Hemese fehérjét valóban a Hemese gén kódolja, a fehérje kifejeződését kettősszálú RNS interferencián alapuló géntermék csendesítéssel gátoltuk. Az Oregon R és *l(3)mbn-1* mutáns embriókat Hemese specifikus kettősszálú RNS-sel injektáltuk, negatív kontrollként egy semleges fehérje, a zölden fluoreszkáló fehérjére (GFP) specifikus

kettősszálú RNS-t használtuk. Eredményeink szerint a *Hemese* specifikus kettős szálú RNS injektálása jelentősen csökkentette az *l(3)mbn-1* hemocitákon a Hemese fehérje kifejeződését, amit egyrészt az élő hemociták áramlási citometriai analízisével (3. Ábra A), másrészt a hemocitákból készített kivonat Western blot analízisével (3. Ábra C) mutattunk ki. A Hemese fehérje kifejeződésének gátlása a központi vérsejtképző szervben, a lymph gland-ben is kimutatható (3. Ábra B). Ezen eredményeink azt igazolják, hogy a Hemese fehérjét valóban a *Hemese* gén kódolja.



3. Ábra. A Hemese fehérje kifejeződésének gátlása kettősszálú RNS interferenciával

(A) Az ábrán az *l(3)mbn-1* mutáns lárvából származó hemociták áramlási citometriai analízise látható az anti-H2 és anti-egér FITC ellenanyagokkal történő indirekt immunfluoreszcencia festést követően (fekete), negatív kontrollként szövettényésztő tápfolyadékot használtunk (kék). A *Hemese* kettősszálú RNS-sel injektált állatokból származó hemociták áramlási citometriai analízise anti-H2 ellenanyaggal (piros), illetve szövettényésztő médiummal (zöld) történt inkubálást követően.

(B) A lymph gland immunhisztokémiai festődése anti-H2 és StreptABComplex HRP-Duet kittel a kontroll (piros festődés, világos háttér), illetve a *Hemese* kettősszálú RNS-sel injektált lárva (sötét háttér) esetében.

(C) A felső fotón a Hemese fehérje megnyilvánulásának Western blot analízise látható az *l(3)mbn-1* lárvákból származó hemocita kivonatokban (Hc) (1. minta), négy egyedi GFP kettősszálú RNS-sel injektált kontroll lárva (2.-5. minta) és négy egyedi *Hemese* kettősszálú RNS-sel injektált lárva (6.-9. minta). Az alsó képen ugyanezeknek a mintáknak az összfehérje tartalmát tükröző Ponceau S festését mutatjuk be.

[Kurucz és mtsai., 2003 nyomán]

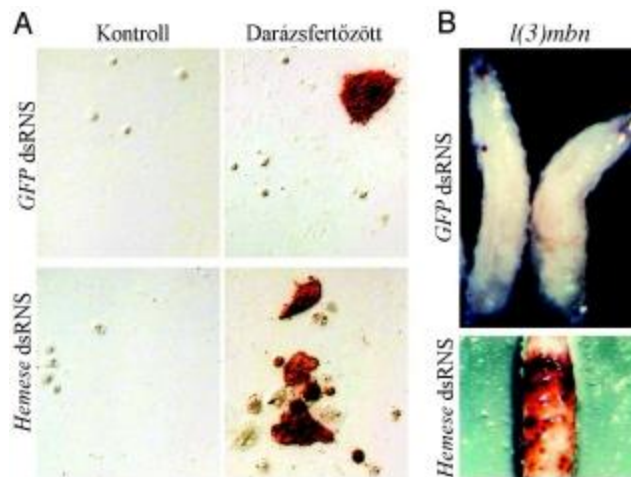
Kísérleteink szerint a *Hemese* géntermék kettősszálú RNS interferenciával történő csendesítése a lárva hemocita kompartmentumainak fejlődését nem befolyásolta, a lymph gland lebenyek száma és mérete, a keringő hemociták száma és morfológiai jellemzői nem változtak. Parazitoid darázs által kiváltott immunválasz során viszont, mind a teljes hemocita szám, mind a lamellocita szám emelkedését tapasztaltuk. Az egymástól független kísérletekben az egyes

állatok immunválaszának erősségében ugyan különbségeket mértünk (2. Táblázat), de a Hemese-csendesített egyedekben mindig erősebb hemocita proliferációt és differenciálódást észleltünk. Mind az össz hemocita szám, mind a *Leptopilina boucardi* (*L. boucardi*) darázsfertőzés hatására differenciálódó lamellocita szám jóval meghaladta a negatív kontrollként használt GFP specifikus kettős szálú RNS-sel oltott egyedekben kapott értékeket (4. Ábra A és 2. Táblázat).

2. Táblázat.

L. boucardi darázsfertőzés hatására differenciálódó lamellociták száma RNS interferenciával csendesített és kontroll állatokban

Lárvaszám	Kettősszálú RNS	<i>L. boucardi</i> G486 darázsfertőzés	Összes hemocita		Lamellocita	
1. Kísérlet						
6	Nem	Nem	889±133	NS	0	
3	<i>Hemese</i>	Nem	897±94		0	
12	Nem	Igen	2237±715	P < 0.05	49±37	P < 0.001
11	<i>Hemese</i>	Igen	4894±1116		975±281	
2. Kísérlet						
12	Nem	Nem	559±63	NS (P = 0.4)	0	
12	GFP	Nem	570±38	NS (P = 0.2)	0	
12	<i>Hemese</i>	Nem	498±42		0	
12	Nem	Igen	553±50	P < 0.05	101±29	P < 0.001
12	GFP	Igen	527±43	P < 0.05	97±21	P < 0.001



4. Ábra. A *Hemese* géntermék csendesítésének hatása a *Drosophila* lárva hemocitáira

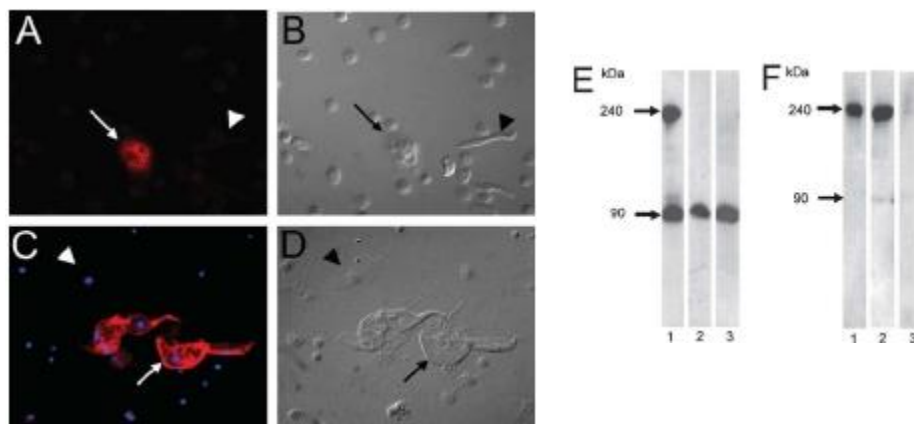
(A) *Hemese* kettősszálú RNS-sel és kontrollként GFP kettősszálú RNS-sel injektált embriókból származó hemociták és parazitoid darázssal fertőzött Oregon R lárvák hemocitáinak immunhisztokémiai festése az anti-L1a lamellocita specifikus [Kurucz és mtsai., 2007a], és StreptABComplex HRP-Duet kittel. A *Hemese* fehérje megnyilvánulásának gátlása megemeli a parazitoid darázsfertőzés hatására differenciálódó lamellociták számát. (B) A *Hemese* gén csendesített *l(3)mbn-1* lárvákban a melanotikus tumorok képződése is fokozódik. [Kurucz és mtsai., 2003 nyomán].

Az magas hemocita számmal és melanotikus tumorok képződésével jellemzett *l(3)mbn-1* mutáns lárváiban a *Hemese* kettős szálú RNS-sel történő csendesítést követően a hemocita szám további növekedését és a tumor képződés felgyorsulását tapasztaltuk. A *Hemese*-csendesített állatokban már a hatodik napon megjelentek a tumorok, amelyek a 12. napon az állatok pusztulását okozták (4. Ábra B alsó kép), míg a kontroll állatokban csak a 12. napon indult meg a tumorok kifejlődése (4. Ábra B felső kép).

Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a *Drosophila* lárvá hemocitáiban megnyilvánuló *Hemese* gén a lamellociták differenciálódásának gátlásával fontos szerepet játszik a parazitoid darázsfertőzés által kiváltott sejt-közvetítette immunválasz szabályozásában [Kurucz és mtsai., 2003].

3.2.2 A *Drosophila* Filamin-240 a lamellocita differenciálódás szuppresszora

Az előállított ellenanyag panel (1. Táblázat) további vizsgálata során azt találtuk, hogy az anti-L5 mind az *l(3)mbn-1* mutáns (5. Ábra A nyíl), mind a *L. boulandi* parazitoid darázs által indukált vad típusú Oregon R lárvában (5. Ábra C nyíl) differenciálódó, acetonnal fixált és permeabilizált lamellociták egy részét ismeri fel. Az anti-L5 ellenanyag élő hemocitákkal nem reagált, ami arra utal, hogy egy sejten belül megnyilvánuló molekulát azonosít. Az L5 molekula Western blot analízise során azt tapasztaltuk, hogy az anti-L5 ellenanyag a lamellocitákat termelő *l(3)mbn-1* mutáns lárvákból készített kivonatban egy 90 és egy 240 kDa molekulatömegű fehérjével reagál (5. Ábra E 1. minta), míg a lamellocitákat nem tartalmazó vad típusú Oregon R, illetve a hemocita hiányos homozigóta *domino1* mutáns lárvák kivonatában kizárólag egy 90 kDa-os fehérjét azonosít (5. Ábra E 2. és 3. minta). A 240 kDa-os fehérje kizárólag a lamellocitákat is tartalmazó *l(3)mbn-1* mutáns hemocitáiból (5. Ábra F 1. minta) és a lamellocitákat is tartalmazó darázssal fertőzött Oregon R lárvák hemocitáiból készített mintákban (5. Ábra F 2. minta) volt jelen, míg a lamellocitákat nem tartalmazó Oregon R lárvák hemocitáiból származó kivonatban (5. Ábra F 3. minta) nem volt kimutatható. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy az anti-L5 ellenanyag által felismert 240 kDa molekulatömegű molekula a lamellociták jelenlétéhez kötött.

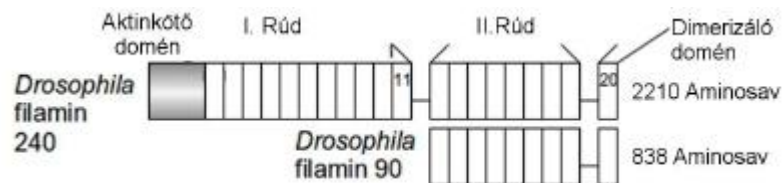


5. Ábra. Az L5 molekula hemocitákon történő megnyilvánulása és Western blot analízise

(A) Az *l(3)mbn-1* mutáns és (C) *L. bouhardi* darázs által indukált Oregon R lárvák keringő hemocitáinak indirekt immunfluoreszcencia festése anti-L5 és anti-egér-Cy3 ellenanyagok (piros) segítségével. A festődő sejteket nyilakkal, a negatív sejteket a nyílhegyekkel jelöltük. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék). (B, D) Nomarski felvételek. (E) Teljes lárva kivonatok (1. minta *l(3)mbn-1*, 2. minta Oregon R, 3. minta *domino1*) és (F) lárvákból izolált hemociták kivonatainak (1. minta *l(3)mbn-1*, 2. minta darázssal indukált Oregon R, 3. minta nem indukált Oregon R) Western blot analízise anti-L5 és anti-egér HRPO ellenanyagok felhasználásával.

[Rus és mtsai., 2006 nyomán]

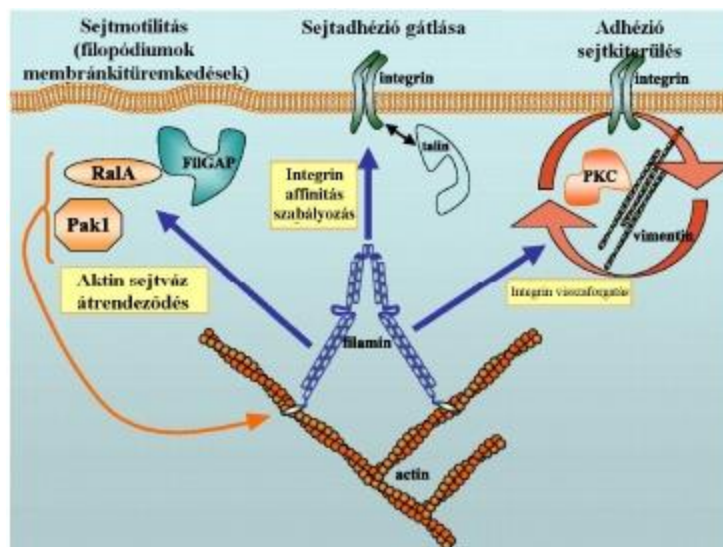
Az L5 molekulát kódoló gén azonosításához az *l(3)mbn-1* lárvákból készített expressziós génkönyvtárat az anti-L5 ellenanyaggal is teszteltük. Ennek során öt olyan cDNS-t izoláltunk, amelyek a *Drosophila* Filamin molekulát kódoló *cheerio* gén exonjaira illettek és azt az un. Filamin-folding domént határozták meg, amelynek konszenzus szekvenciáját a létező hús Filamin ismétlődés szekvenciája alapján alkották meg. A *Drosophila* Filaminnak négy izoformája ismert (FlyBase Accession Nos. FBpp0088478, FBpp0088480, FBpp0088965, FBpp0003455), melyek a *cheerio* génről alternatív kivágódással létrejövő mRNS-ekről jönnek létre.



6. Ábra A *Drosophila* Filamin-240 és Filamin-90 szerkezete. [Sokol és mtsai., 1999. nyomán]

A *Drosophila* Filamin rövidebb izoformája, az aktin kötő doménnel nem rendelkező Filamin-90 funkciója még nem ismert, a Filamin-240-es izoforma a felnőtt egyedek petefészkének gyűrűsatornáiban az aktin filamentumokat kapcsolja a sejtmembránhoz [Sokol és mtsai., 1999]. Élesztő két-hibrid rendszerben vizsgálva kimutatták, hogy a Filamin kölcsönhatásban áll a *Drosophila* immunválaszában és vérvégzésében résztvevő Toll jelátviteli útvonal Toll receptorával és Tube fehérjéjével [Edwards és mtsai., 1997; Govind 1999]. A Toll jelátviteli útvonal komponenseinek, a Toll receptornak, illetve a Cactus molekulának mutáns alléljairól ismert, hogy azok a lamellociták differenciálódását és melanotikus tumorok képződését okozzák [Qui és mtsai., 1998].

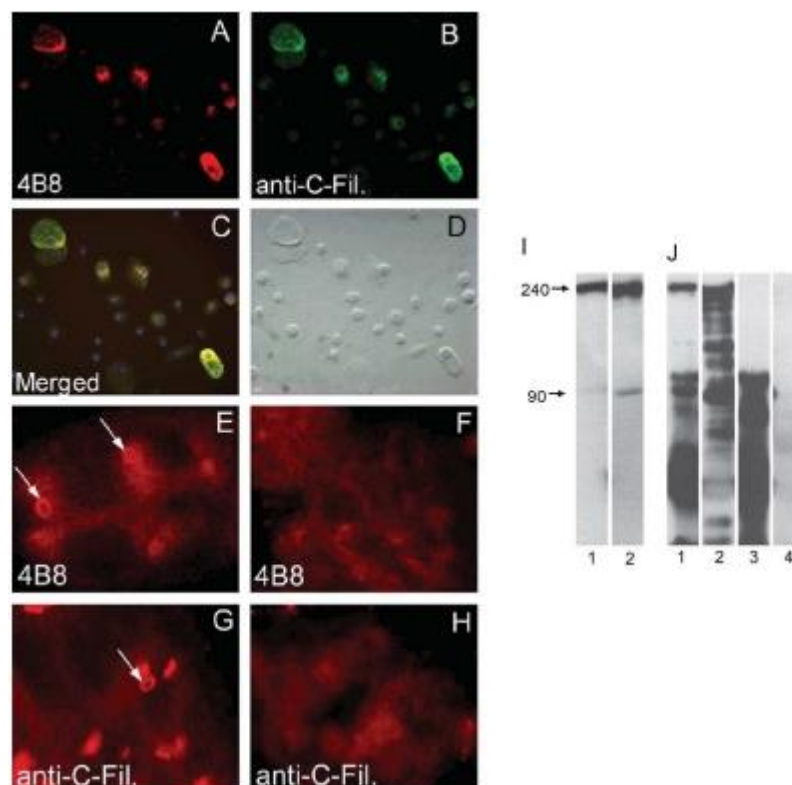
A human Filamin fő funkciója az F-aktin keresztkötése, de az aktin citoskeleton szabályozásán keresztül összetett szerepet játszik a sejtadhézió, a sejtalak változtatás és sejtmigráció folyamataiban [Popowicz és mtsai., 2006]. A tallin-integrin kapcsolat gátlásán keresztül az integrinek affinitását is szabályozza, sőt, a vimentin foszforilációjának serkentésével elősegíti az integrinek plazmamembránba történő recirkulációját, ami fokozza a sejtek adhézióját és kiterülését [MacPherson és Fagerholm 2010] (7. Ábra), ezen kívül a *Drosophila* Filamin tumorképződésben betöltött szerepére is fényt derítettek [Külshammer és mtsai., 2013].



7. Ábra. A Filaminok összetett szerepet játszanak a sejtek adhéziójában, alakváltoztatásában és mozgékonyágában [MacPherson és Fagerholm 2009. nyomán]

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az L5 molekula valóban azonos-e a Filamin magas molekulatömegű izoformájával, a Filamin-240-nel. Az *l(3)mbn-1* mutáns lárvából származó keringő lamellocitákat az anti-L5 és az anti-egér Cy3 ellenanyaggal piros színűre, míg a Filamin C-terminális 810. aminosava ellen termeltetett poliklonális *Drosophila* anti-Filamin C ellenanyaggal [Sokol és Cooley 1999] és anti-patkány FITC ellenanyaggal zöldre festettük (8. Ábra, A, B, C, D). Kísérletünk során azt tapasztaltuk, hogy ez a kétféle ellenanyag a keringő hemocitákon azonos festődési mintázatot mutatott.

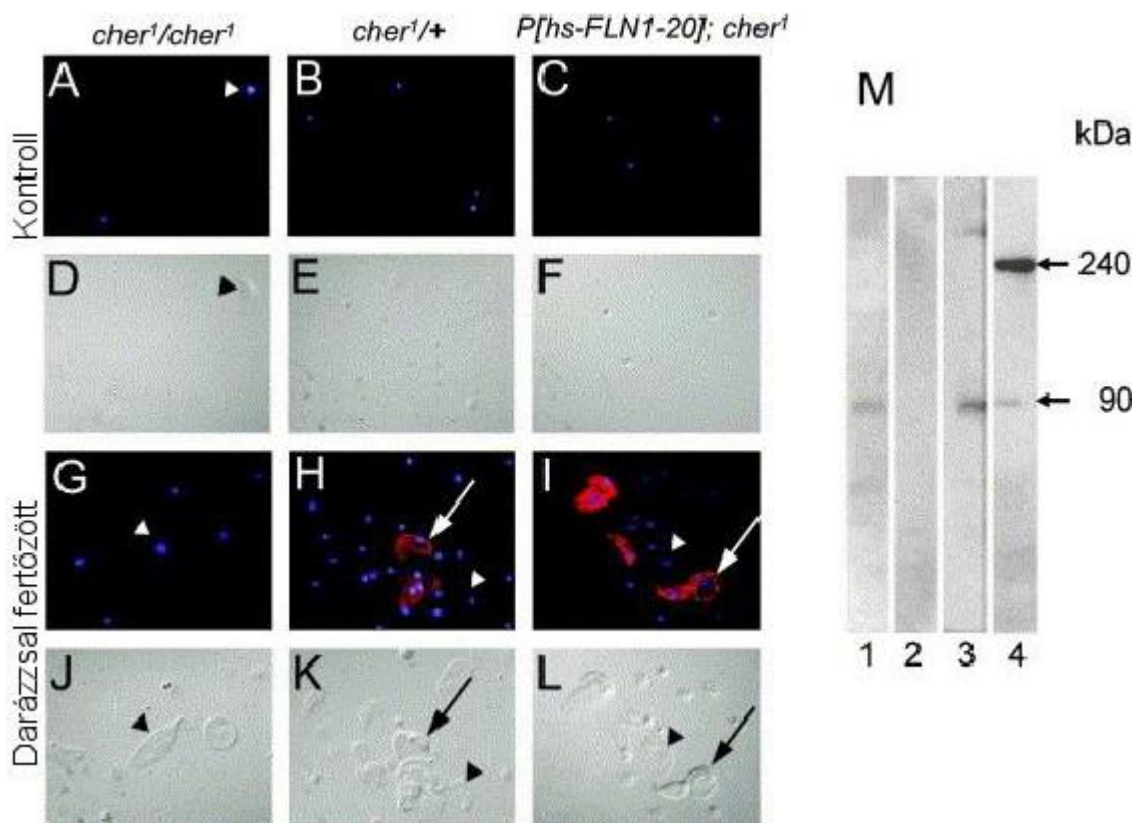
A *Drosophila* Filamin-240 izoformát érintő mutánsokban a *shi kong (sko)* és a *cheerio (cher)* [Sokol és Cooley 1999, Li és mtsai.,1999] esetében a gyűrűcsatornában az aktin összeszerelődése zavart szenved, kisméretű, életképtelen peték képződnek, ami nőstények sterilizációját idézi elő. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú Oregon R egyedekben az anti-L5 és az anti-Filamin C ellenanyagok a gyűrűcsatornákkal reagáltak (8. Ábra E, G), míg a homozigóta *cher1* mutáns gyűrűcsatornáit egyik ellenanyag sem festette (8. Ábra, F, H). Western blot analízissel szintén azt tapasztaltuk, hogy az anti-L5 monoklonális és az anti-Filamin C poliklonális ellenanyagok ugyanazokon a fehérjéken, a Filamin-240-en és a Filamin-90-en megnyilvánuló epitópokat ismernek fel (8. Ábra I, J).



8. Ábra. Az anti-L5 és anti-Filamin ellenanyagok által azonosított epitópok kolokalizációja és immunprecipitátumok Western blot analízise.

(A) Az *l(3)mbn-1* hemocitáinak indirekt immunfluoreszcencia festése anti-L5 és anti-egér Cy3 (piros) valamint (B) anti-Filamin C és anti-patkány-FITC (zöld) ellenanyagokkal. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék). (C) Az egyesített képen a sárga szín a kettős festődést mutatja. (D) Nomarski felvétel. (E, G) Oregon R és (F, H) homozigóta *cher1* nőstényekből származó petefészkek festése (E, F) anti-L5 és anti-egér Cy3, valamint (G, H) anti-Filamin C és anti-patkány-Cy3 ellenanyagokkal, a nyílhegyek a gyűrűsatornák festődését mutatják. (I) Az *l(3)mbn-1* hemocita lizátum és az (J) anti-L5 ellenanyaggal immunprecipitált minták Western blot analízise (1. minta) anti-L5, (2. minta) anti-Filamin ellenanyagokkal. A 3. és 4. minták az IgG kontrollok reakcióit mutatják be [Rus és mtsai., 2006 nyomán].

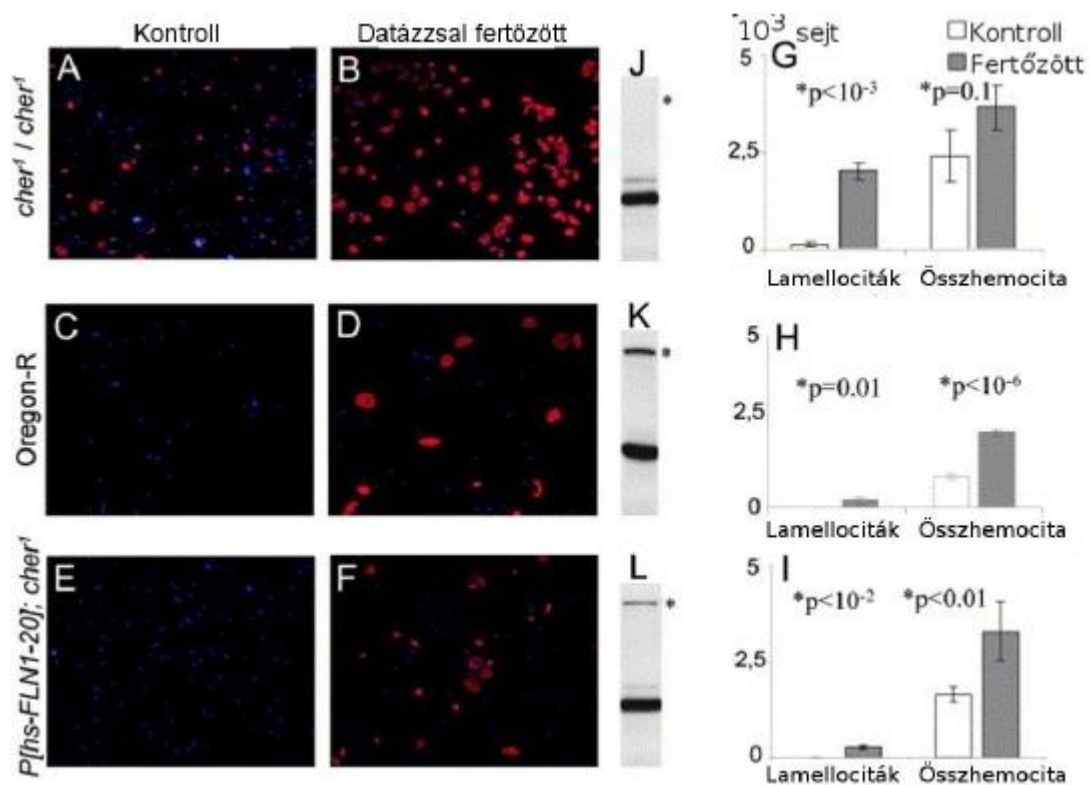
Eredményeink szerint a Filamin-240 és a Filamin-90 izoformák a *Drosophila* hemocitáin sejt-típus specifikusan nyilvánulnak meg, ezért a Filamin-240 izoforma kifejeződését parazitoid darázs fertőzést követő lamellocita differenciálódás során is megvizsgáltuk a *cher1* homozigóta, *cher1* heterozigóta, valamint a Filamin-240 izoformát kódoló teljes hosszúságú *cheerio* gén beépítésével létrehozott fenotípus menekített (P[hs-FLN1-20]) *cher1* homozigóta egyedekben (9. Ábra). Indirekt immunfluoreszcencia festést követően azt tapasztaltuk, hogy az anti-L5 ellenanyag a *cher1* homozigóta lárva hemocitáit még a darázs fertőzést követően sem ismerte fel, míg a *cher1* heterozigóta, és a (P[hs-FLN1-20]) *cher1* homozigóta állatokban differenciálódó lamellocitákkal viszont reagált. A *cher1* homozigóta, *cher1* heterozigóta, és (P[hs-FLN1-20]) *cher1* homozigóta lárvákból készített kivonatok Western blot analízise azt mutatta, hogy a Filamin-240 izoforma kizárólag a darázssal fertőzött azaz lamellocitákat tartalmazó *cher1* heterozigótákban mutatható ki (9. Ábra M 4. minta).



9. Ábra. A Filamin-240 izoformájának kifejeződése a lamellocitákban

A *cher1* homozigóta, *cher1* heterozigóta, valamint fenotípus menekített (*P[hs-FLN1-20]*) *cher1* lárvák hemocitáinak indirekt immunfluoreszcencia (A-L) és Western blot (M) analízise anti-L5 és anti-egér Cy3 ellenanyagokkal (A-F) nem fertőzött kontroll és (G-L) darázssal fertőzött lárvák esetében. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék). A Filamin-240 izoformát kifejező lamellocitákat nyilakkal, az anti-L5 ellenanyaggal nem festődő lamellocitákat nyílhegyekkel jelöltük [Rus és mtsai., 2006 nyomán].

Miután beláttuk, hogy a Filamin-240 a lamellocitákban nyilvánul meg, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a Filamin-240 izoforma szerepet játszik-e a lamellociták differenciálódásának szabályozásában. Kísérleteinkhez kontroll (10. Ábra A, C, E) és darázssal immunindukált (10. Ábra B, D, F, J, K, L) homozigóta *cher1*, homozigóta fenotípus menekített (*P[hs-FLN1-20]*) *cher1*, valamint a vad típusú Oregon R keringő hemocitáit használtuk. Eredményeink szerint a homozigóta *cher1* mutánsba bejuttatott teljes hosszúságú *cheerio* cDNS nemcsak a Filamin-240 izoforma lamellocitákon történő megnyilvánulását idézi elő (10. Ábra I, L), hanem a darázsfertőzés hatására differenciálódó lamellociták számát is csökkenti (10. Ábra F, I).



10. Ábra. A *Drosophila* Filamin izoformáinak sejtípus specifikus megnyilvánulása

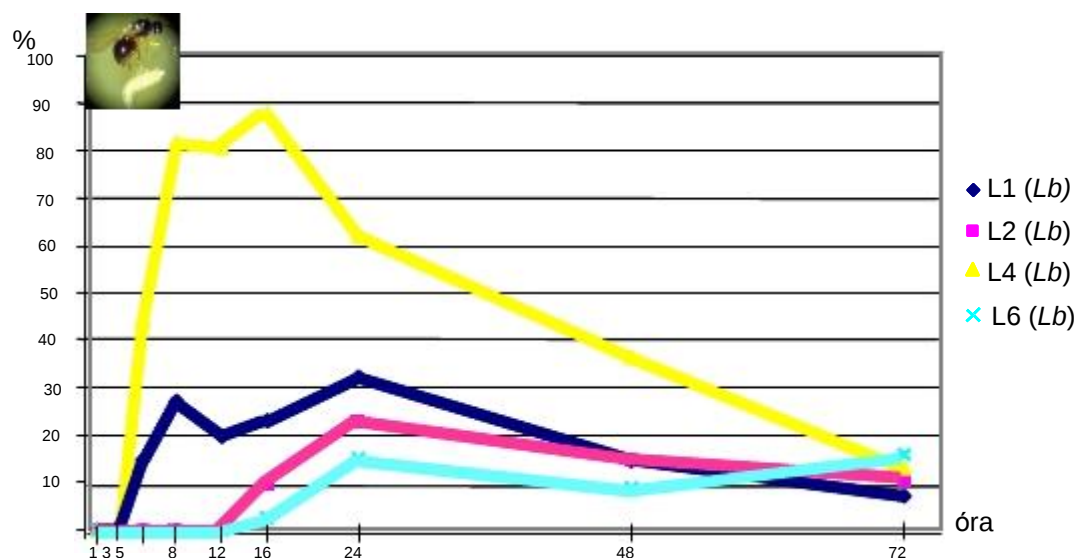
(A, C, E) Normál és (B, D, F, J, K, L) *L. bouvardi* parazitoid darázzsal fertőzött (A, B, J) *cher1* homozigóta, (C, D, K) Oregon R és (E, F, L) fenotípus menekített (*P[hs-FLN1-20]*) *cher1* lárvák hemocitáinak indirekt immunfluoreszcencia festése a lamellocitákat festő anti-L1 és anti-egér Cy3 ellenanyaggal, valamint Western blot analízise az anti-L5 és anti-egérHRPO ellenanyagok felhasználásával. (A csillag a 240 kDa molekulatömeg pozícióját jelöli.) A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék).

(G) A *cher1* homozigóta lárvák keringésében több hemocitát és ezen belül több lamellocitát találtunk, mint a (H) vad típusú Oregon R lárvákban, míg a (I) fenotípus menekített (*P[hs-FLN1-20]*) *cher1* lárvákban a (G) *cher1* homozigóta lárvákhoz képest kevesebb lamellocitát számoltunk [Rus és mtsai., 2006 nyomán].

Ezekből az eredményeinkből arra következtettünk, hogy a fenotípus menekített (*P[hs-FLN1-20]*) *cher1* egyedek lamellocitáiban, a petefészkekhez hasonlóan [Sokol és Cooley 2003], a Filamin fehérje a szokásos posztranszlációs módosításon megy keresztül, valamint a Filamin magas molekulatömegű izoformája, a Filamin-240, a lamellociták differenciálódásának szuppresszáálásában játszik szerepet [Rus és mtsai., 2006].

3.2.3. Tokképző hemocitákban kifejeződő molekulák azonosítása

A *Drosophila melanogaster* a sejteknél nagyobb méretű testidegenként felismert részecskéket (tumorokat, paraziták petéit) egy speciális, a gerincesek idegentest-granulomaképzéséhez hasonló védekezési mechanizmussal, a tokképzési reakcióval határolja el a környező szövetektől. Az immunindukciót követően a lárva hemocita kompartmentumai átrendeződnek; a prekursor típusú sejtek morfológiai változásokon mennek keresztül és immunológiai sajátosságai is alapvetően megváltoznak. A lárvális keringésben a kis szférikus sejtek egy része először diszkoidális, majd nagyméretű kiterült lamellocitákká alakul. A differenciálódás folyamán bekövetkező génexpressziós változások egy részét immunológiai módszerekkel is nyomon követhetjük a laboratóriumunkban előállított ellenanyagokkal definiált, lamellocita specifikusan megnyilvánuló markerek expressziós mintázatának követésével [Kurucz és mtsai., 2007a]. Ezek a marker molekulák az Oregon R lárzában a darázsfertőzést követő differenciálódási folyamat során képződő lamellocitákon szekvenciálisan jelennek meg (11. Ábra).

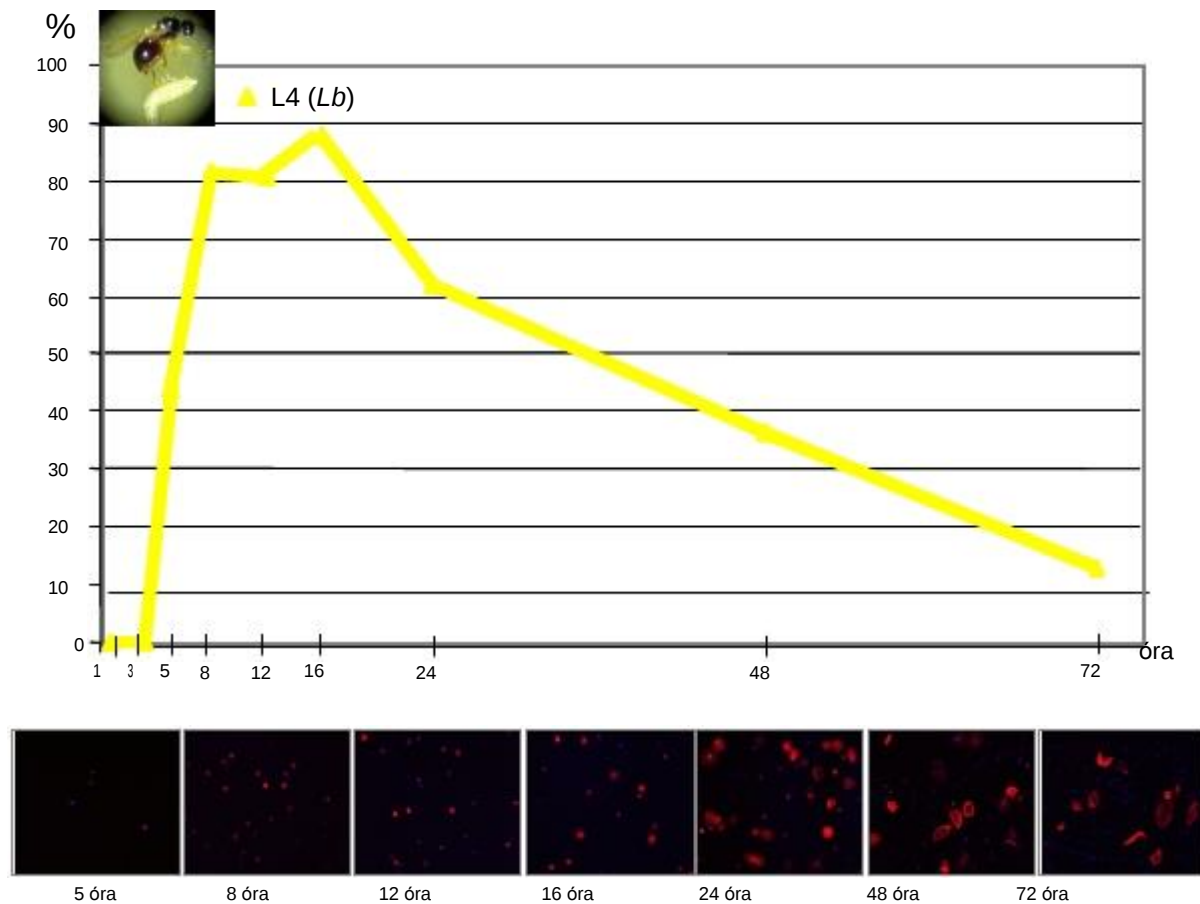


11. Ábra. A *L. bouhardi* parazitoid darázsfertőzést követően kifejeződő molekuláris markerek az Oregon R lárva keringő hemocitáin

Az L1 (kék rombusz), L2 (piros négyzet), L4 (sárga háromszög) és L6 (zöld kereszt) molekulák megjelenése a keringő hemocitákon a darázsszúrás követő 1, 3, 5, 8, 16, 24, 48 és 72 órában. A grafikon a feltüntetett időpontokban a festődő hemociták %-os arányát ábrázolja [Honti és mtsai., 2010. nyomán].

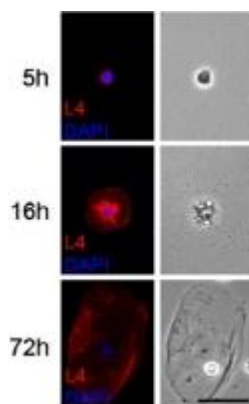
3.2.3.1. A *Drosophila* β PS integrin (L4)

Az Oregon R lárzában a darázsfertőzést követően először az L4 molekula jelenik meg a keringő hemocitákon. Az L4 molekula az immunindukciót követő 4 óra elteltével a kis szférikus sejteken, 16 óra elteltével a diszkoidális lamellocitákon, 72 óra után pedig a nagyméretű, kiterült lamellocitákon figyelhető meg (13. Ábra képek). Öt órával a fertőzés után az L4 molekula a keringő kis kerek hemociták több mint 80%-án megnyilvánul, 16 óráig még további 10%-ot emelkedik az L4 pozitív sejtek száma, majd fokozatosan csökkenve 72 óránál a sejteknek már csak a hemociták kb. 10%-n mutatható ki, ami megfelel az ebben az időpontban megfigyelhető nagyméretű, kiterült lamellociták arányának (12. Ábra grafikon).



12. Ábra. Az L4 molekula kifejeződése Oregon R lárva keringő hemocitáin a parazitoid darázsfertőzést követően

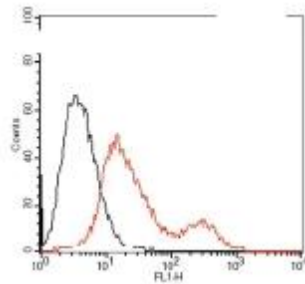
Oregon R lárva keringő hemocitáit a *L. bouleari* (*Lb*) darázsfertőzést követően 5, 8, 12, 16, 24, és 72 óra elteltével anti-L4 és anti-egeér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal festettük majd megszámoltuk a festődő sejteket (piros), és az összes hemocita DAPI-val festett sejtmagjait (kék). A grafikon a feltüntetett időpontokban az L4 kifejeződést mutató hemociták %-os arányát ábrázolja [Honti és mtsai., 2010. nyomán].



13. Ábra. A keringő hemociták parazitoid darázsfertőzés hatására bekövetkező morfológiai átalakulása

Oregon R lárva keringő hemocitáinak indirekt immunfluoreszcencia festése az anti-L4 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal a darázsszúrás követő 5 óra, 16 óra és 72 óra elteltével. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék) (méret jelzés: 20µm) [Honti és mtsai., 2010 nyomán].

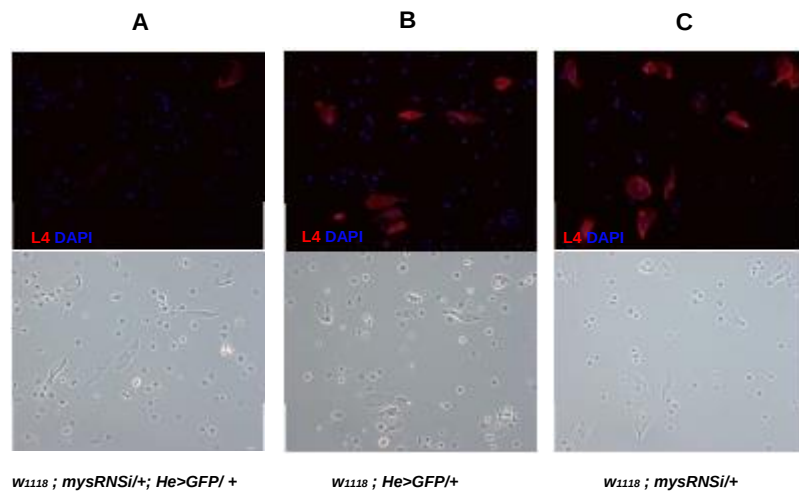
Az L4 molekulát élő keringő hemocitákon indirekt immunfluoreszcencia festést követő áramlási citometriával (14. Ábra) és Western blot analízissel 88 kDa molekulatömegű, a sejtfelületen megnyilvánuló transzmembrán fehérjeként azonosítottuk.



14. Ábra. Az L4 molekula indirekt immunfluoreszcenciát követő áramlási citometriai analízise

Az *l(3)mbn-1* mutáns lárvából izolált élő keringő hemocitákat anti-L4 ellenanyaggal (piros), illetve szövettenyésztő médiummal (fekete), majd anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyaggal festettük, ezután FACS Calibur készülékkel analizáltuk [Kurucz É]

Az L4 molekulát a hemocita túltermelő *l(3)mbn-1* mutáns lárvából izolált hemociták kivonatából immunprecipitáltuk, majd az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Tömegspektrometriai Laboratóriumában Dr. Medzihradsky Katalin csoportjával együttműködve MALDI-TOF tömegspektrometriai analízissel a *Drosophila melanogaster* β PS integrin fehérjeként azonosítottuk. *Drosophilában* a β PS integrint a *myospheroid* gén kódolja [MacKrell és mtsai., 1988], ezért a *myospheroid* gént csendesítő RNSi konstrukciót (1560R-2, Kyoto Törzsközpont) a *Hemese-GAL4* meghajtó elem segítségével hemocita specifikusan kifejeztettük, és a parazitoid darázssal immunindukált egyedek hemocitáin az anti-L4 ellenanyag segítségével meghatároztuk az L4 molekula kifejeződésének a mértékét. A *myospheroid* gén termékének kettősszállú RNS interferenciával történő csendesítését követően azt tapasztaltuk, hogy a *w¹¹¹⁸* ; *mysRNSi/+* ; *He>GFP/+* lárvák hemocitáin az L4 kifejeződése (15. Ábra A) drasztikusan csökkent a szülői törzsekből származó hemocitákkal (15. Ábra B,C) összevetve.



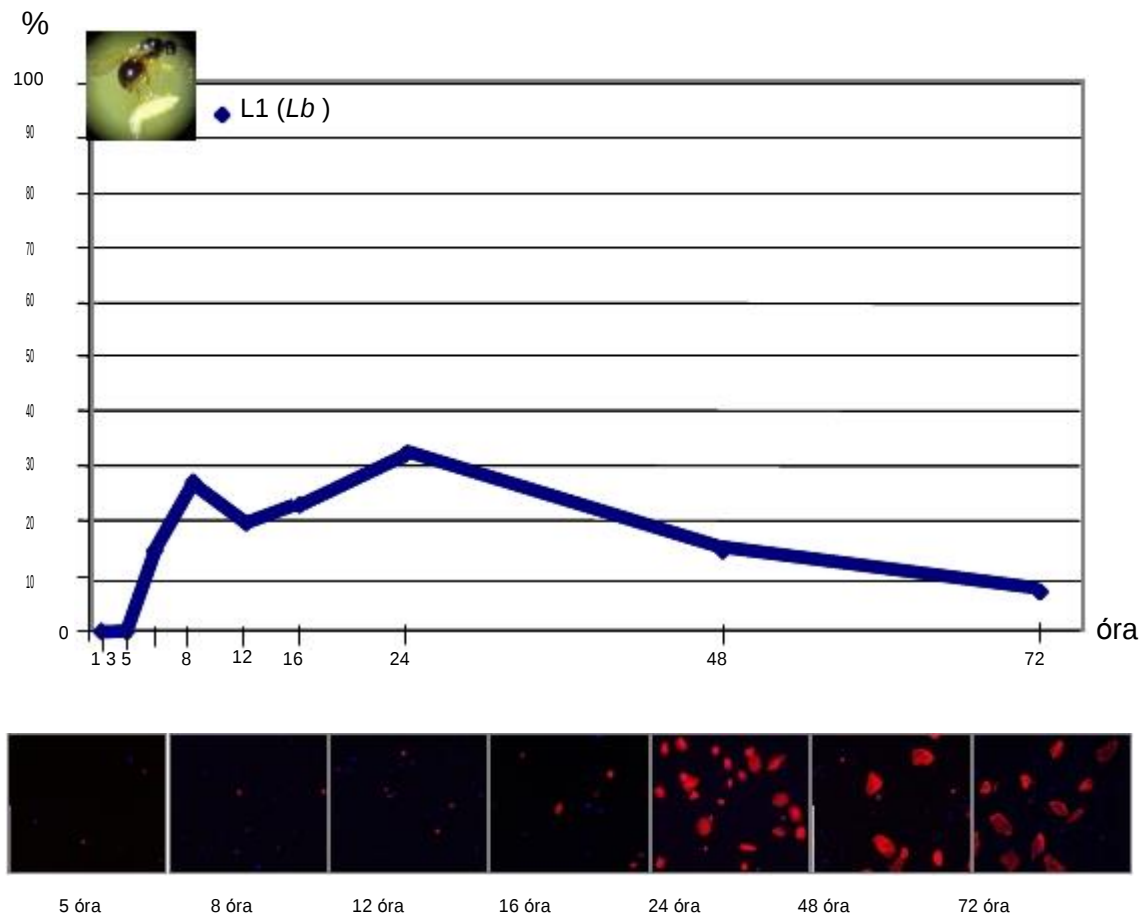
15. Ábra. A *mysospheroid* gén csendesítése hemocitákban

(A) A *Hemese-GAL4* meghajtó elem segítségével hemocita specifikusan kifejeztettük a *mysRNSi* (1560R-2, Kyoto Törzsközpont) konstrukciót, majd az immunindukált egyedek hemocitáin az anti-L4 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagok segítségével a hemocitákon megvizsgáltuk az L4 molekula kifejeződését. (B) és (C) a szülői törzsek hemocitáinak immunfestése. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék) [Honti V.].

Az immunindukció hatására a hemocitákon megnyilvánuló L4 molekulát tehát a *Drosophila* β PS integrinként azonosítottuk. A *Drosophila* pozíció specifikus (PS) antigének családjába tartozó transzmembrán fehérjék, a gerinces homológjaikhoz az integrinekhez hasonlóan, a sejt-sejt és a sejt-matrix kölcsönhatásokban játszanak szerepet. *Drosophilában* a β PS integrint kódoló *lethal(l)mysospheroid* gén (*mys*) a szárny a szem és az izom fejlődéséhez nélkülözhetetlen [Zusman és mtsai., 1990], továbbá mutációja esetén zavart szenved a hemociták migrációja [Fauvarque és mtsai., 2011, Comber és mtsai., 2013], valamint darázsfertőzést követően a lamellociták nem képesek megfelelő tokot képezni a parazita petéje körül [Irving és mtsai., 2005]. Eredményeink szerint a β PS integrin az immunindukciót követően először a kis szférikus sejteken, majd később a diszkoidális lamellocitákon is kifejeződik, viszont a darázsfertőzés késői szakaszában kizárólag a nagyméretű kiterült lamellocitákon mutatható ki. A lamellocita differenciálódás során kifejeződő β PS integrin anti-L4 ellenanyaggal történő nyomon követésével fehérje szinten sikerült megerősítenünk Irving és munkatársai azon megállapítását, hogy a lamellociták tokképző reakciójához a *mysospheroid* gén transzkripciója elengedhetetlenül szükséges [Irving és mtsai., 2005].

3.2.3.2. Az Atila fehérje (L1) a Ly6 család tagja

Az L1 molekula a *Drosophila* lárva darázsfertőzését követően három órával már megjelenik a hemocitákon, először a kis kerek sejteken (16. Ábra képek 5-12 óra), majd a differenciálódó diszkoidális (16. Ábra képek 16 óra) és nagy, elnyúlt lamellocitákon (16. Ábra képek 24-72 óra) figyelhető meg. A fertőzést követő 24 óra elteltével az L1 pozitív hemociták száma alig haladja meg a teljes hemocitaszám 30%-át, ezután az L1 pozitív hemociták száma fokozatosan csökken majd a 48. órát követően az L1 molekula kifejeződése a nagy elnyúlt lamellocitákra korlátozódik (16. Ábra grafikon).



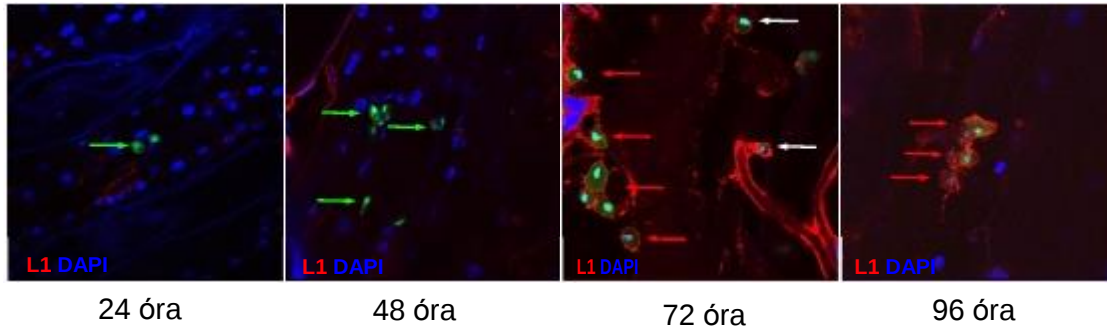
16. Ábra. Az L1 molekula kifejeződése Oregon R lárva keringő hemocitáin *L. bouardi* parazitoid darázsfertőzést követően

Oregon R lárva keringő hemocitáit a darázsfertőzést követően 5, 8, 12, 16, 24, és 72 óra elteltével anti-L1 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal festettük és számoltuk a festődő sejteket (piros). A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék). A grafikon a feltüntetett időpontokban az L1 kifejeződést mutató hemociták %-os arányát ábrázolja [Honti és mtsai., 2010 nyomán].

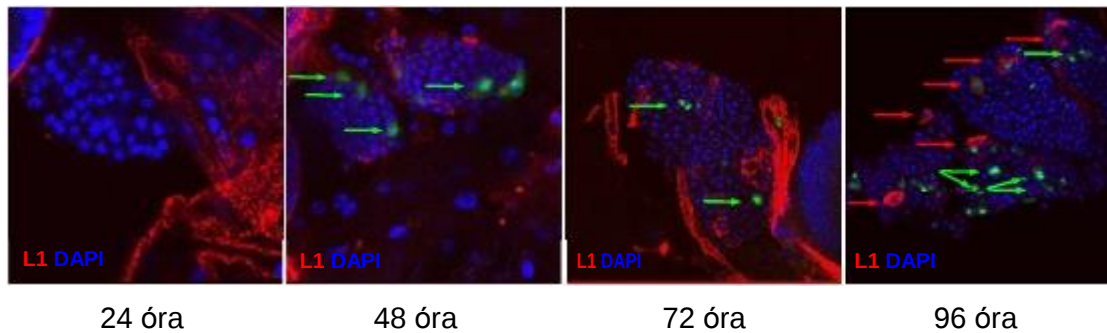
Az L1 molekula kifejeződését a keringő hemocitákon kívül a lárva másik két hemocita kompartmentumában, a szesszilis szövetben (17. Ábra, A) és a központi vérsejtképző szervben, a lymph gland-ben (17. Ábra, B) is megvizsgáltuk *Hemese>GAL4* meghajtó elemmel vezérelt *UAS>GFPnls* (*Hemese>GFPnls*) [Zettervall és mtsai., 2004], a sejtmagjukban GFP-t kifejező lárvákban és azt tapasztaltuk, hogy a szesszilis szövetben az L1 molekula darázsfertőzést követő

72 óra eltelte után (17. Ábra, A 72 óra, 96 óra) míg a központi vérsejtképző szervben (17. Ábra, B) 96 óra után nyilvánul meg a differenciálódó lamellocitákon.

A



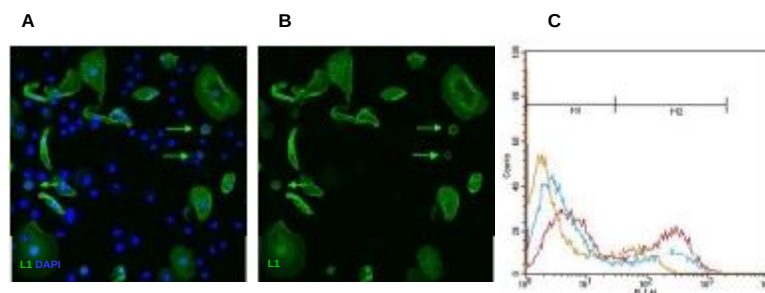
B



17. Ábra. Az L1 molekula *L. bouhardi* darázsfertőzést követő kifejeződése a szexszilis hemocitákon és a központi vérsejtképző szervben

(A) A *Hemese>GFPnls* lárva hemocitái (zöld) a szexszilis szövetben valamint (B) a központi vérsejtképző szervben anti-L1 és anti-egér Cy3 ellenanyagokkal festve (piros) a darázsszúrás követő 24, 48, 72 és 96 óra eltelte után. A szöveteket Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A nyilak a GFP-t kifejező hemocitákat jelölik. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék) [Márkus R.].

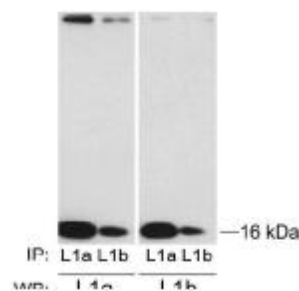
Az *l(3)mbn-1* hemocita túltermelő mutáns lárva keringésében az L1 molekula a lamellocitákon (18. Ábra A, B) és néhány kis kerek hemocitán (18. Ábra B nyilak) fejeződik ki. Az élő hemociták áramlási citometriaival az azt találtuk, hogy az L1 molekula a hemociták plazmamembránjába ágyazottan nyilvánul meg (18. Ábra C) és az immunológiai epitópok a sejtmembrán külső felületén helyezkednek el.



18. Ábra. Az L1 molekula kifejeződése az *l(3)mbn-1* mutáns lárva keringő hemocitáin

(A, B) Az *l(3)mbn-1* hemocita túltermelő mutáns lárvá keringő hemocitáit acetonos fixálás után anti-L1 és anti-egér Alexa Fluor 488 ellenanyagokkal festettük (zöld). A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék). A nyilak a kis kerek sejtek festődését mutatják. (C) Az *l(3)mbn-1* élő keringő hemocitáit külön-külön festettük az anti-L1a (piros), anti-L1b (kék) és anti-L1c (narancssárga), valamint anti-egér Alexa Fluor 633 ellenanyagokkal [Laurinyecz B., Kurucz É.].

Az anti-L1a és anti-L1b ellenanyagokkal kereszt-immunprecipitációt követő Western blot analízist végeztünk és azt találtuk, hogy az L1a és L1b epitópok ugyanazon a 16 kDa-os molekulán fejeződnek ki (19. Ábra). Redukáló ágensek jelenlétében történő gélelektroforézist követő Western blot analízis során nem kaptunk jeleket, ami arra utal, hogy a molekulát intramolekuláris diszulfid hidak stabilizálják és az ellenanyagok a 16 kDa-os molekulán konformáció függő epitópokat ismernek fel.

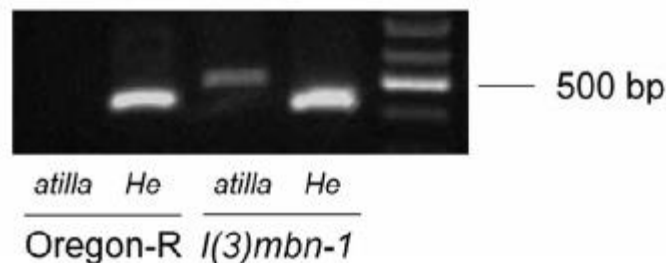


19. Ábra. Az L1 molekula immunprecipitálása és molekulatömegének meghatározása Western blot analízissel

Az L1 molekulát az anti-L1a és anti-L1b ellenanyagokkal az *l(3)mbn-1* hemociták kivonatából immunprecipitáltuk, majd azokat az L1a és L1b ellenanyagok felhasználásával Western blot analízisnek vetettük alá [Laurinyecz B., Kurucz É.].

Az immunprecipitált 16 kDa-os L1 molekulát az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Tömegspektrometriai Laboratóriumában Dr. Medzihradszky Katalin csoportjával együttműködve folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriai analízissel (LC-MS/MS) analizáltuk, melynek során három olyan peptidszekvenciát is találtunk (AGTIVSR – [120-126], IDSASNIR – [82-89], DKIDSASNIR – [80-89]) amelyek egy eddig ismeretlen *Drosophila* fehérjét, az CG6579-PA (accession number: Q9VK99) határoztak meg. Az L1 molekulát kódoló *Drosophila* gént *atilla*-nak neveztünk el. Az *atilla* gén a *Drosophila* 2. kromoszómájának bal karján helyezkedik el, citológiaiilag a 33D2 sávban lokalizálódik.

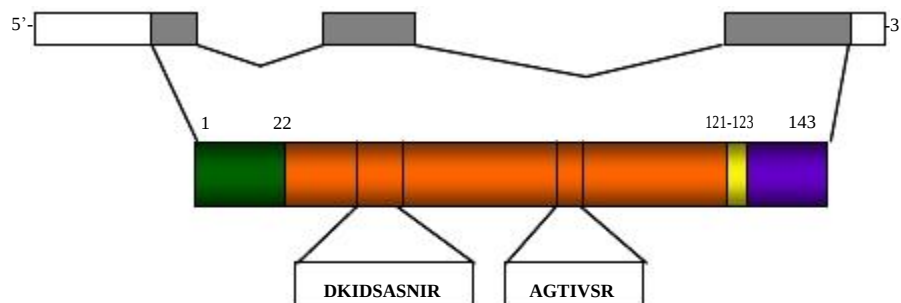
Az *atilla* gén hemocitákban történő kifejeződését a lamellocitákat nagy mennyiségben tartalmazó *l(3)mbn-1* lárvá keringő hemocitáiban és a lamellocitákat nem tartalmazó Oregon R lárvá keringő hemocitáiban vizsgáltuk. Az *l(3)mbn-1* és Oregon R lárvákból készített teljes RNS-eken random hexamer primerekkel reverz transzkripciót végeztünk, majd az így kapott cDNS templáton az *atilla* specifikus primerekkel polimeráz láncreakcióval (PCR) a lamellocitákat is tartalmazó hemocita populációból származó cDNS templáton tudtuk amplifikálni az annotált génnek megfelelő DNS szakaszt, míg a lamellocitákat nem tartalmazó mintákban nem kaptunk terméket. Ebből arra következtettünk, hogy az *atilla* gén átíródik a lamellocitákban (20. Ábra). Kontrollként a hemociták minden alpopulációjában megnyilvánuló *Hemese* (*He*) gén kifejeződését vizsgáltuk.



20. Ábra. Az *atilla* gén transzkripciója Oregon R és *l(3)mbn-1* lárvák hemocitáiban

A lamellocitákat nem tartalmazó Oregon R és a lamellocitákat tartalmazó *l(3)mbn-1* mutáns harmadik stádiumú lárváinak keringő hemocitáiból teljes RNS-t izoláltunk, majd az *atilla*, illetve *Hemese* specifikus primer-ek felhasználásával RT-PCR-t végeztünk [Laurinyecz B].

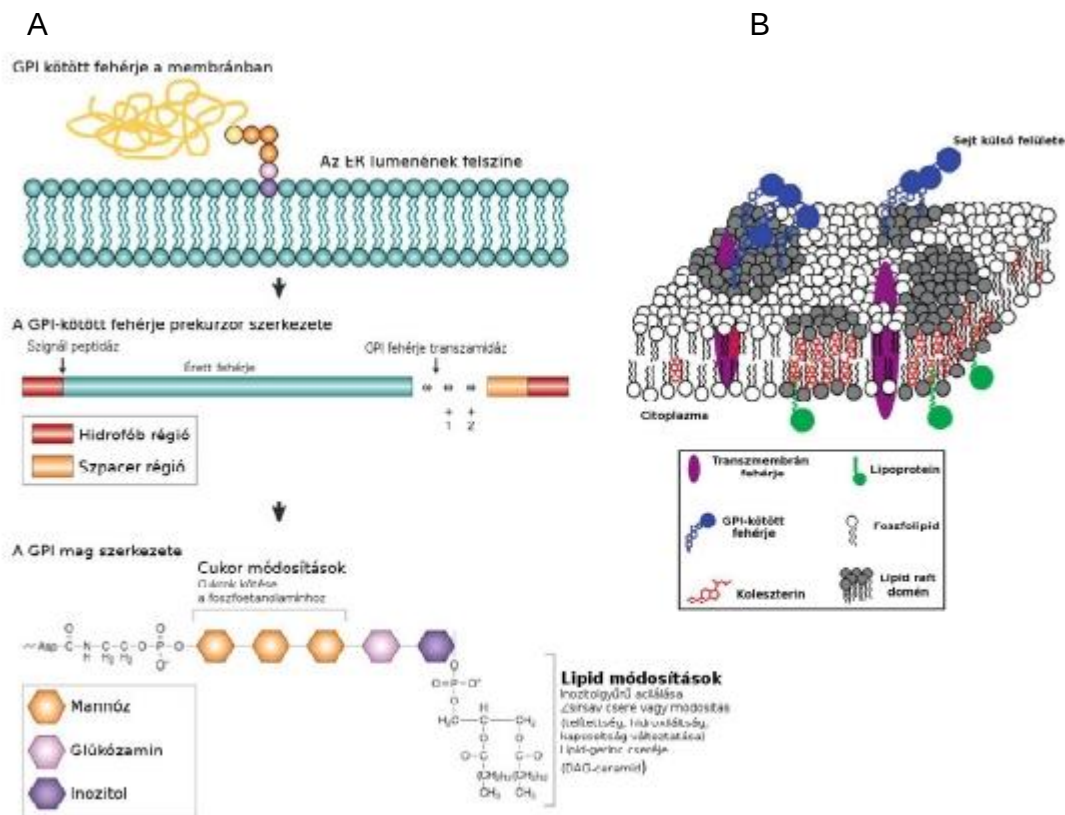
Az *atilla* gén 2436 bp hosszú, 3 exonja egy 834 nukleotid hosszúságú mRNS-t határoz meg, melynek 429 nukleotid nagyságú része íródik át fehérjévé. Az Atilla fehérje N-terminális részén található első 21 aminosav a szignál szekvencia, a sejten kívüli domén 100 aminosavat tartalmaz, a 22 aminosavat tartalmazó C-terminális rész transzmembrán hélixet alkot, sejten belüli régióval nem rendelkezik (21. Ábra). A fehérje aminosav szekvenciája alapján számított molekulatömege 15,6 kDa, amely közelítéssel megfelel a Western blot analízissel meghatározott 16 kDa molekulatömegnek.



21. Ábra. Az *atilla* gén és az Atilla fehérje szerkezete.

Az *atilla* gén exonjainak transzlálódó régiói (szürke), az Atilla fehérje szignál peptid (zöld), sejten kívüli domén (narancssárga), GPI-horgonyzó hely (sárga) és transzmembrán domén (kék) [Laurinyecz B].

Az Atilla 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 (22. Ábra).



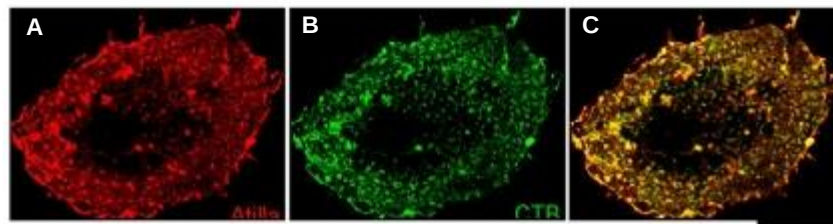
22. Ábra. A GPI-kapcsolt fehérjék elhelyezkedése a sejtmembránban

(A) A GPI-kapcsolt fehérjék nem hidrofób aminosavak által horgonyzódnak a sejtmembránba, hanem kovalensen kötött amfipatikus glükózil-foszfatidil-inozitolon (GPI) keresztül. A transzamináz enzim az eredeti hidrofób horgony szekvenciát, ezzel együtt a C-terminális szekvenciákat is eltávolítja, majd a maradék fehérjét egy GPI horgonyhoz szállítja. [Mayor és Riezman 2004 nyomán]. (B) A membrán fehérjék elhelyezkedése a lipid tutajokat tartalmazó sejtmembránban [Paulick and Bertozzi 2008 nyomán].

A sejtmembrán mikrodomének, vagy lipid tutajok különböző jelátviteli mechanizmusokban szerepet játszó receptor molekulák funkcionális komplexeit tartalmazzák. Ezek a plazmamembránban szerveződő sejtmembrán mikrodomének lehetővé teszik az egyes fehérjék laterális szegregációját, így a jelátviteli folyamatokban résztvevő molekulák sejtmembránban történő kompartmentalizálódását. A sejtmembrán mikrodoménekben egyes molekulák koncentrálnak, mások kizáródnak [Nosjean és mtsai., 1997], a lokalizálódó komponensek állandó változásával szabályozva a jelátviteli folyamatokat. A sejtmembrán mikrodoménekbe ágyazott humán GPI-kötött immunreceptorok pl. a bakteriális mitogén lipopoliszaharid receptor CD14 [Schmitz és Orsó 2002], az Fc receptor CD16 [McVicar 2008], a CD48 [Moran és Miceli 1998] és CD58 [Ariel és mtsai., 2009] adhézis, vagy kostimulációs molekulák. Bár a GPI-kötött fehérjék nem rendelkeznek a citoplazmába nyúló régióval, extracelluláris doménjeiket ellenanyagokkal keresztkötve, vagy a receptor-ligand kapcsolódás eredményeként létrejövő oligomerizációjuk során mégis képesek a sejtmembrán mikrodomének citoplazmatikus oldalához kapcsolódó Src-családba tartozó acilált, nem receptor típusú tirozin

kinázokat aktiválni egy feltételezett, a sejtmembrán mikrodoménekhez állandóan kapcsolódó adaptor molekulán keresztül [Cheng és mtsai., 2001].

Mivel az evolúció során konzerválódott sejtmembrán mikrodomének a *Drosophilában* is fellelhetők [Rietveld és mtsai., 1999], megvizsgáltuk, hogy az Atilla fehérje az emlős GPI-kapcsolt fehérjékhez hasonlóan a hemociták plazmamembránjának mikrodoménjeiben lokalizálódik-e. A sejtmembrán mikrodomének glikoszfingolipid komponense szelektíven köti a kolera toxin B alegységét, mely egy általánosan használt sejtmembrán mikrodomén marker, ezért élő sejteken fluoreszcens kettősfestéssel megvizsgáltuk a sejtmembrán mikrodomén (FITC-kolera toxin B) és az Atilla molekula együttes elhelyezkedését (23. Ábra).

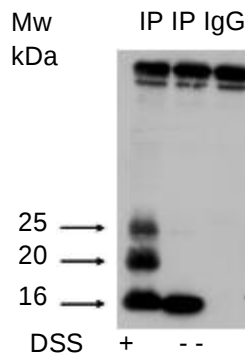


23. Ábra. Az Atilla és a kolera toxin B együttes megnyilvánulása lamellocitákon

(A) Az Atilla fehérje kifejeződése (anti-Atilla [anti-L1a+anti-L1b+anti-L1c] és anti-egér Alexa Fluor 633 piros), (B) a FITC-tal jelölt kolera toxin B (CTB zöld) és (C) együttes kifejeződésük az *l(3)mbn-1* mutáns lárvá lamellocitáin. A felvételek Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal készültek [Kurucz É.].

Az Atilla fehérje és a kolera toxin B alegységének együttes kifejeződése százalékos arányát FV10-ASW 1.6 Olympus konfokális programmal határoztuk meg. A hemocita túltermelő *l(3)mbn-1* mutáns lamellocitáin az Atilla és CTB molekulák együttes megnyilvánulásának aránya $76(\pm 2)\%$, ($n=16$), az *in vivo* immunindukciónak kitett, parazitoid darázssal fertőzött Oregon R törzs lamellocitáin ez az arány $74(\pm 3)\%$ ($n=7$).

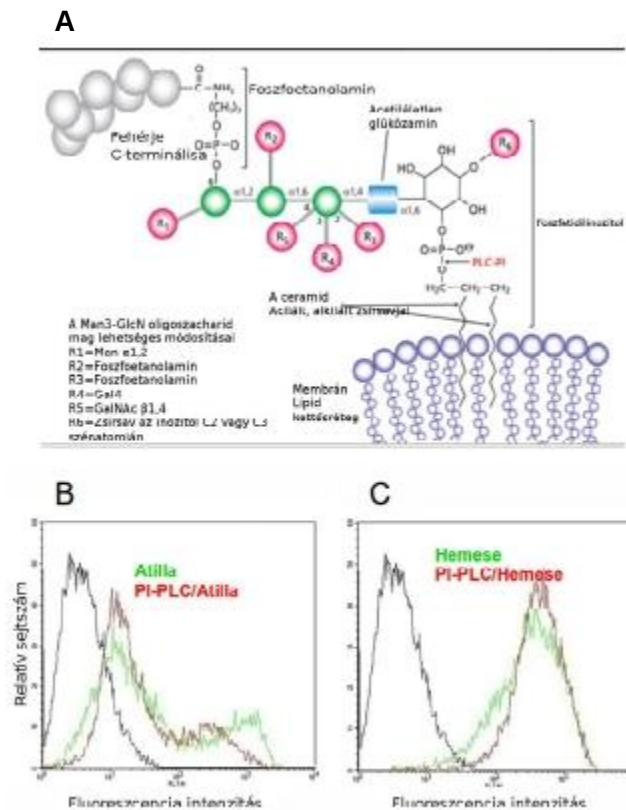
A lipid tutajok dinamikus képződése és megszűnése lehetőséget ad a jelátviteli komplexek létrejöttére. Amennyiben az Atilla lipid tutajokkal asszociált, a molekulával laterálisan kölcsönható molekulák különböző távolságokban kémiai keresztkötést létesítő homobifunkcionális reagensekkel hozzákötethetők. Disuccinimidyl suberate (DSS) keresztkötő reagens alkalmazásával, a hemociták kivonatából a 16 kDa molekulatömegű Atilla molekula mellett egy 20 és egy 25 kDa molekulatömegű (tömegspektrometriai analízissel eddig nem azonosítható) fehérjét ko-immunprecipitáltunk (24. Ábra), amely arra utal, hogy az Atilla molekula a lipid tutajokban egyéb molekulákkal léphet laterális kölcsönhatásba.



24. Ábra. Az Atilla molekulával laterálisan kölcsönható molekulák kimutatása

Az *l(3)mbn-1* mutáns lárvákból élő hemocitákat izoláltunk, DSS keresztkötő ágenssel kezeltünk a lizátumban lévő fehérjét anti-Atilla ellenanyaggal immunprecipitáltuk, majd anti-L1 és anti-egér HRPO ellenanyagok felhasználásával Westen blot analízist végeztünk. Kontrollként a keresztkötés nélküli immunprecipitátumot és a Protein G Sepharose-hoz kötött ellenanyagot használtunk [Kurucz É.].

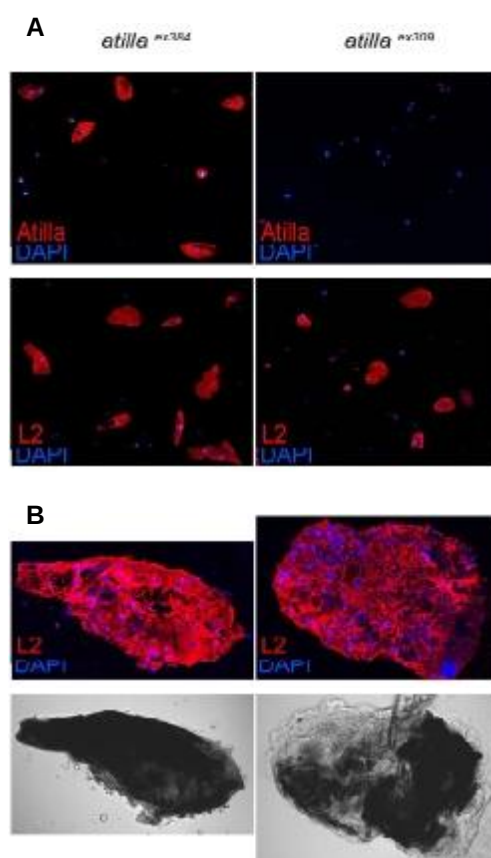
Az Atilla fehérjében közvetlenül a transzmembrán domén előtt GPI hasítóhelyre utaló szekvenciát azonosítottunk, ezért megvizsgáltuk, hogy a GPI-kötött fehérjéket hasító foszfoszfatidilinozitol foszfolipáz C (PI-PLC) emésztéssel [Halova és mtsai., 2002] (25. Ábra A) az Atilla fehérje eltávolítható-e a hemociták plazmamembránjáról. A PI-PLC emésztést követően áramlási citometriával az Atilla fehérje csökkent mennyiségét mértük a kezelt hemocitákon (25. Ábra B piros görbe) a kezeletlen kontrollhoz képest (25. Ábra B zöld görbe). Kontrollként a Hemese transzmembrán fehérje [Kurucz és mtsai., 2003] kifejeződését vizsgáltuk, amely a PI-PLC emésztés során nem változott (25. Ábra C).



25. Ábra. A PI-PLC emésztés hatása a hemocitákon megnyilvánuló Atilla és Hemese fehérjék mennyiségére
Élő hemocitákat izoláltunk az *l(3)mbn-1* mutáns lárvákból, melyeket PI-PLC emésztést követően (A) anti-Atilla és anti-egér Alexa Fluor 633, illetve (B) anti-Hemese és anti-egér Alexa Fluor 633 ellenanyagokkal történő festést követően áramlási citometriával analizáltunk [Kurucz É.].

Az *atilla* gén immunválaszban betöltött szerepét deléciós mutánsok létrehozásával vizsgáltuk. A mutánsokat két olyan EP-elem kiugratásával állítottuk elő, amelyek két gén közötti nem kódoló régióban helyezkednek el kb. egy kilobázis távolságra az *atilla* gén 3' végétől. Az EP elemek remobilizációja során előfordulhat, hogy a genomból való kiugráskor a P-elem ún. „local hop”-pal magával visz egy DNS darabot a környezetéből, deléciót hagyva maga mögött, amely

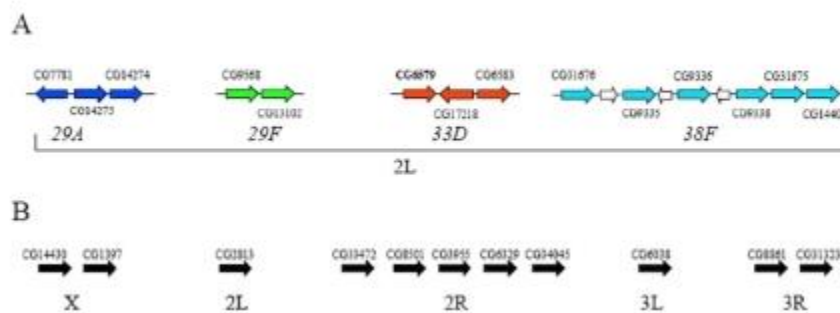
érinthesi a környező géneket is. A homozigóta életképes EP364 inszerció mobilizációja során képződött nyolc deléciós jelöltből törzseket alapítottunk, melyek mindegyike (*atilla*₄₀, *atilla*₄₁, *atilla*₂₇₅, *atilla*₃₀₉, *atilla*₃₄₆, *atilla*₃₇₁, *atilla*₃₇₆, *atilla*₃₈₇) homozigóta életképes volt. A deléciók töréspontjainak meghatározása után a további kísérleteinkben a legnagyobb méretű deléciót hordozó *atilla*₃₀₉ allélt, kontrollként pedig a P elem pontos kivágódásával létrejött *atilla*₃₈₄ excíziós allélt használtuk. Az *atilla*₃₀₉ és *atilla*₃₈₄ törzsek második stádiumú lárváiban darázsszúrással lamellocita differenciálódást indukáltunk, majd a hemociták anti-L1 ellenanyaggal végzett indirekt immunfluoreszcencia festése után azt tapasztaltuk, hogy az Atilla fehérje az *atilla*₃₀₉ deléciós törzsben nem mutatható ki (26. Ábra A), míg a kontrollként használt *atilla*₃₈₄ törzs lamellocitáiban jelen van. Bár a deléciós mutánsban a lamellociták az Atilla fehérjét nem fejezik ki, egy másik, a lamellocitákat festő ellenanyaggal az anti-L2-vel kimutattuk, hogy az *atilla*₃₀₉ deléciós törzsben a lamellociták differenciálódása és tokképzése zavartalan (26. Ábra A alsó képek), a lamellociták több rétegben körülveszik a parazita petét (26. Ábra B felső képek), valamint a tok melanizációja is maradéktalanul végbemegy (26. Ábra B alsó képek).



26. Ábra. Az *atilla*₈₄₉ és *atilla*₃₀₉ mutánsok keringő hemocitáinak, valamint tokképző sejtjeinek fenotípusa

Az *atilla*₈₄₉ és *atilla*₃₀₉ mutánsok keringő hemocitáinak, valamint tokképző sejtjeinek immunhisztokémiai festődése anti-Atilla és anti-egér Alexa Fluor 568, illetve anti-L2 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék) [Laurinyecz B., Kurucz É.].

Eredményeink szerint az Atilla fehérje hiánya nem befolyásolja sem a lamellociták differenciálódását, sem a lamellociták tokképző reakcióját. A veleszületett immunitásban szerepet játszó molekulák funkcióinak vizsgálatát megnehezíti, hogy ezek a védekező folyamatok gyakran túlbiztosítottak, ezért egy-egy molekula kiesése nem okozza a rendszer működésének összeomlását, hanem azok szerepét sok esetben akár szerkezeti homológok is képesek átvenni. 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 (27. Ábra).



27. Ábra. Az „atilla-szerű” gének genomi elhelyezkedése a *Drosophila melanogaster* genomjában.

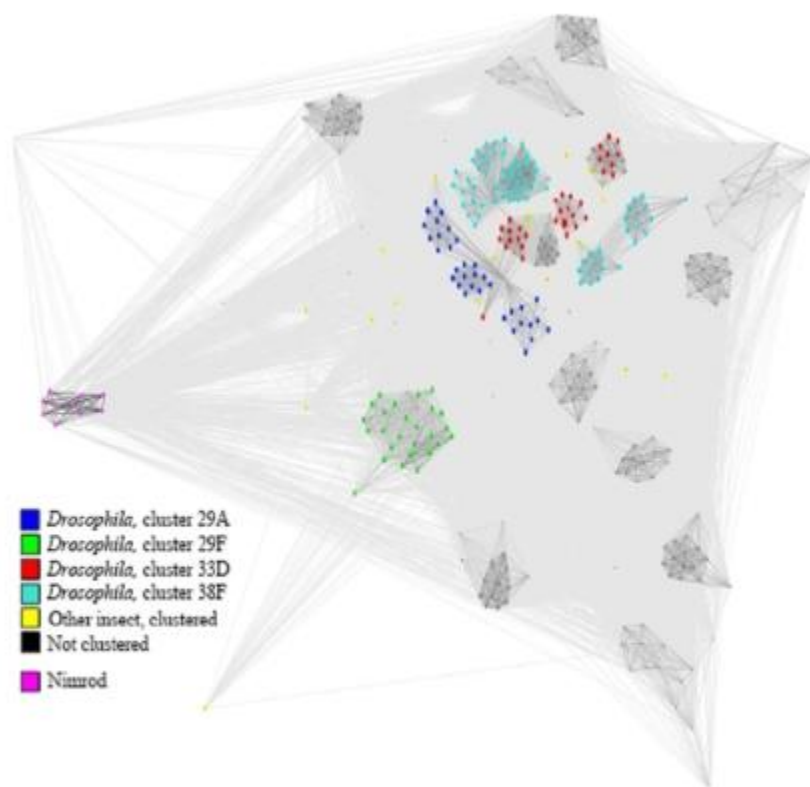
(A) A klaszterben lévő géneket vonallal kötöttük össze és az egyes klaszterek szerint színeztük. A fehér színű gének nem „atilla-szerű”-ek.

(B) Klasztereken kívüli gének (fekete) [Somogyi K.]

A legtöbb atilla-szerű génről átfordított fehérje szekvenciája GPI hasítási helyet, valamint az *u-PAR/Ly-6 toxin* családra jellemző domént tartalmaz. A fehérjék közötti kapcsolatok kialakításában szerepet játszó Ly6 domént tartalmazó fehérjék alkotják a Ly6 fehérje szupercsaládot. A humán Ly6 fehérje szupercsaládba tartozó fehérjék közül eddig mindössze néhánynak a funkcióját ismerjük. Ezek a sejtadhézióban, proliferációban és migrációban szerepet játszó urokináz plasminogén aktivátor receptor (uPAR) [Blasi és Carmeliet 2002], vagy a komplement aktivitást gátló CD59 molekula [Davies és mtsai., 1989].

Homológia kereséseinkkel átfedő eredményeket kaptunk Hijazi és munkatársai eredményeivel, akik a *Drosophila* genomjában 36 korábban még nem jellemzett olyan gént találtak, amelyek egy vagy több Ly6 motívumot tartalmazó fehérjét kódolnak [Hijazi és mtsai., 2009].

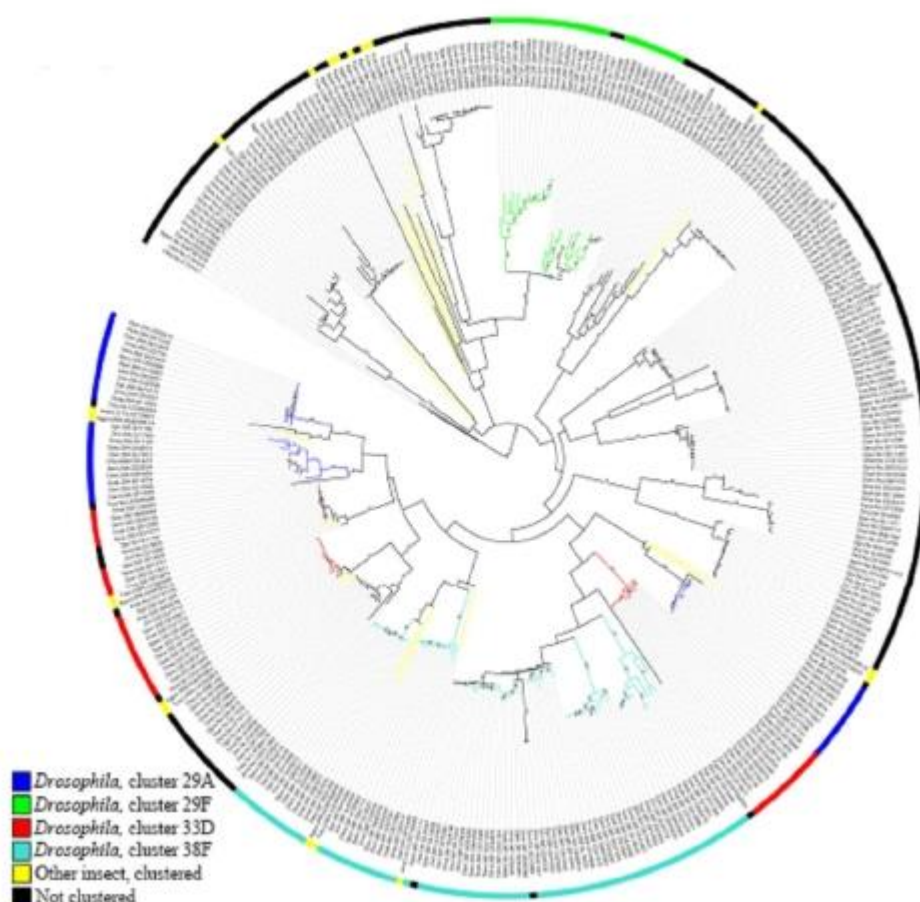
Klaszterekbe csoportosuló „atilla-szerű” géneket találtunk egyéb rovar genomokban is, a *D. melanogaster*en kívül egyéb *Drosophilidae*ekben, továbbá az *Anopheles gambiae*ben, *Tribolium castaneum*ban és az *Apis mellifera*ban (28. Ábra). A kétdimenziós csoportosítás eredményeként a legtöbb *Drosophila* gén klaszter egymás közelében lokalizálódott, kivéve a 29F-et, amely azt valószínűsíti, hogy azok még közelebbi rokonságban állnak egymással.



28. Ábra. Az *atilla*-szerű szekvenciák kétdimenziós csoportosítása

A *Drosophila* gének színezése megegyezik a 27. Ábra színekkel, a többi rovar fajban azonosított *atilla*-szerű szekvenciát sárga színnel jelöltük. A kontrollként használt, az *atilla*-szerű szekvenciáktól független *Drosophila* - *nimród* (3.4.1) szekvenciák elhelyezkedését rózsaszínnel ábrázoltuk (CLANS version 09.Oct.2006) [Somogyi K.].

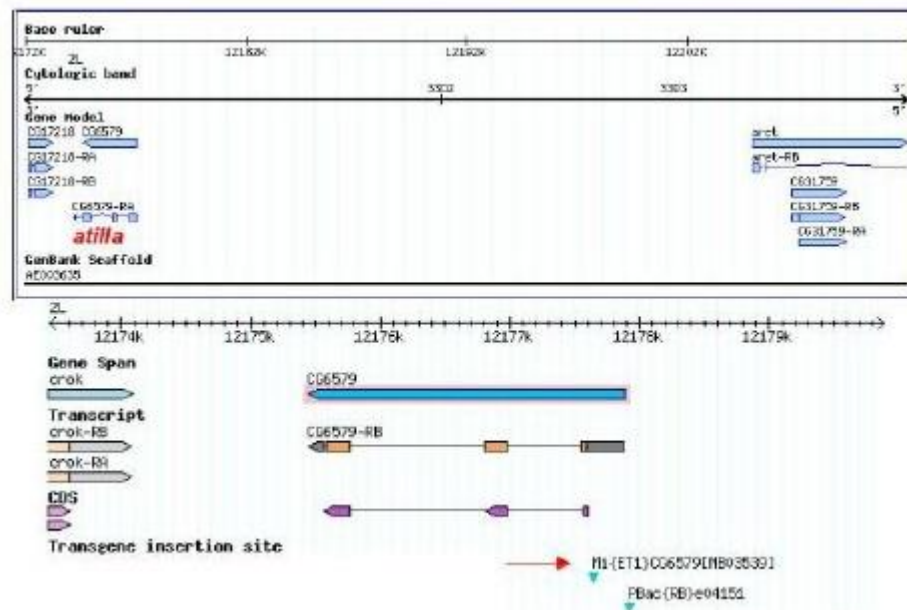
A rovarok *atilla*-szerű szekvenciáinak felhasználásával filogenetikai leszármazási fát szerkesztettünk (29. Ábra), amelynek analízise azt mutatja, hogy a jelenlegi génklaszterek kialakulásában az evolúció során egész klaszterek duplikációja is közrejátszhatott.



29. Ábra. A rovarok atilla-szerű szekvenciáinak Maximum Likelihood filogenetikai fája

A *Drosophila* géneket a klaszterek szerinti színekkel, az egyéb rovarokat sárgával, a klaszteren kívüli géneket feketével jelöltük. A számításokat PhyML (version 2.4.4; WAG+G modell, 4 gamma categories, 100 bootstrap replications) segítségével végeztük [Somogyi K.].

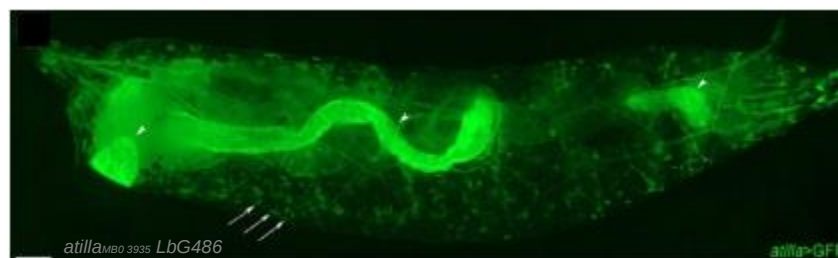
A lamellociták élő állatban történő tanulmányozásához, illetve hemociták jelátviteli útvonalaiban szerepet játszó gének lamellocitákban történő túltermeléséhez lamellocita specifikusan működő meghajtó elemet kívántunk létrehozni. Az *atilla* gén 5' regulátor régiója igen nagyméretű, közel 30 kb, ezért az *atilla* gén promóterétől 5' irányban elhelyezkedő öt, egyenként 6 kb hosszúságú, egymással átfedő DNS szakaszt választottunk ki az *atilla* gén kifejeződését tükröző GAL4 meghajtó elemek előállítására. A regulátor szakaszokat CaSpeR vektorba klónoztuk és *white* embriókba injektáltuk, majd a *white* marker gén alapján azonosítottuk az inszerciót hordozó egyedeket. Ezután a hímeket UAS-GFP konstrukciót hordozó szüzekhez kereszteztük. Az utódokat parazitoid darázssal immunindukáltuk és lamellocita specifikusan GFP-t kifejező egyedeket kerestünk. Lamellocita specifikusan megnyilvánuló GFP-t egyetlen beépülés esetében sem találtunk, ezért a Flybase adatbázisában kerestünk potenciális enhanszer csapdázó inszerciókat. Ilyen az *atilla* gén 5' nem transzlálódó régiójában található *minos* (MiET1) inszerció (30. Ábra).



30. Ábra. Az *atilla* gén genomai környezetében található *minos* (MiET1) inszerció
MiET1 inszerció (piros nyíl) [Fly Base nyomán].

A MiET1 elem enhanszerek csapdázásra képes [Metaxakis és mtsai., 2005], az elemben található egy 3xP3 promóterrel ellátott EGFP riporter gén és egy hsp70 promóter által vezérelt GAL4 gén. Kísérleteink során mind a *L. boulandi* parazitoid darázs pete által kiváltott immunindukció során differenciálódott lamellociták, mind a *l(3)mbn-1* hemocita tumoros genetikai háttéren képződő lamellociták kifejezik a GFP riporter gént, ami arra utal, hogy a Mi[ET1]CG6579MB03539 jelű inszerció valóban csapdázza az *atilla* gén lamellocita specifikus enhanszerét [Honti és mtsai., 2009].

Bár az inszercióban található GAL4 gén aktivitását genetikai rendszerekkel nem tudtuk kimutatni így ez az inszerció nem használható lamellocita specifikus meghajtó elemként, mégis egyedi eszközként szolgál a lamellociták *in vivo* történő nyomon követésében (31. Ábra), továbbá egyéb hemocita specifikusan kifejeződő GAL4 forrásokkal kombinálva az inszerció *in vivo* kettős jelöléses rendszerekben is alkalmazható [Honti és mtsai., 2009].

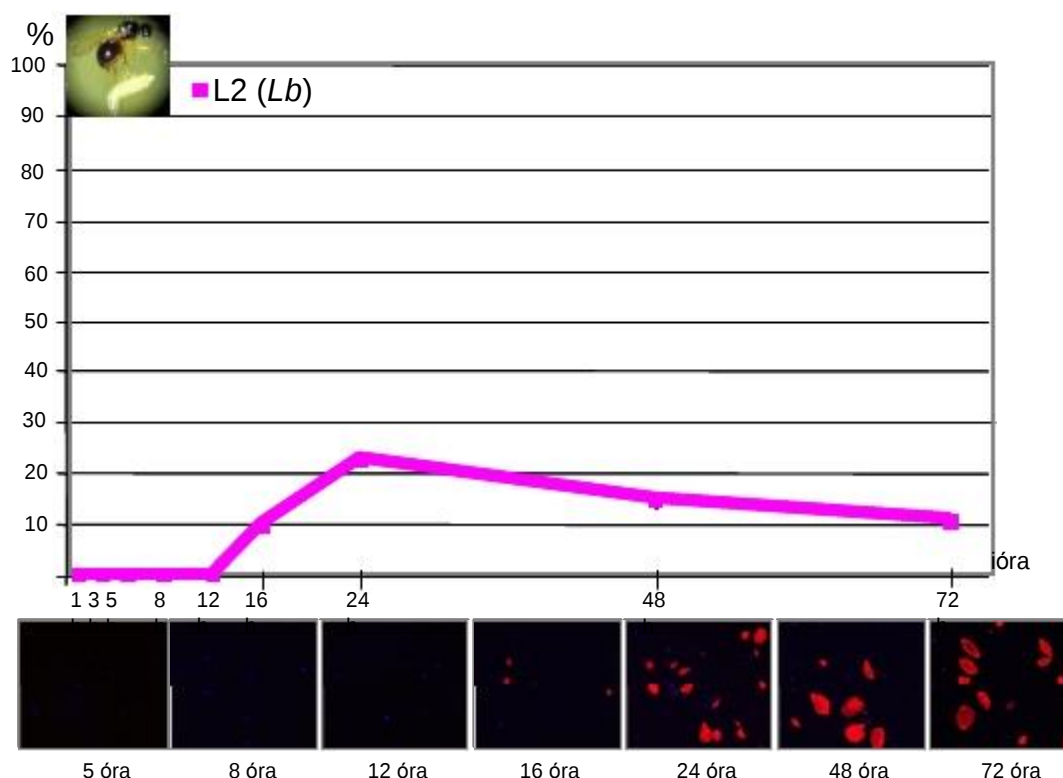


31. Ábra. Lamellociták az Mi[ET1]CG6579[MB03539] lárvában

A *L. bouhardi* darázsfertőzést követően differenciálódó GFP-t kifejező lamellociták (nyilak) jól láthatóak az élő lárvákutikuláján keresztül. Az egyes szervek MiET1 elemre jellemző háttér fluoreszcenciáját [Metaxakis és mtsai., 2005] a nyílhegyek mutatják (Méret jelzés: 100 μ m) [Honti és mtsai., 2009 nyomán].

3.2.3.3. Az aktinnal kapcsolt L2 molekula

Vizsgálataink szerint az L2 molekula a darázsszindrómát követő 16 óra elteltével jelenik meg először a kisméretű, de már lamellocita morfológiájú hemocitákon, melyek a keringő hemociták közel 10%-át teszik ki ebben az időpontban. A darázsfertőzést követő 24 óráig az L2-t kifejező lamellociták száma és mérete fokozatosan emelkedik (32. Ábra).

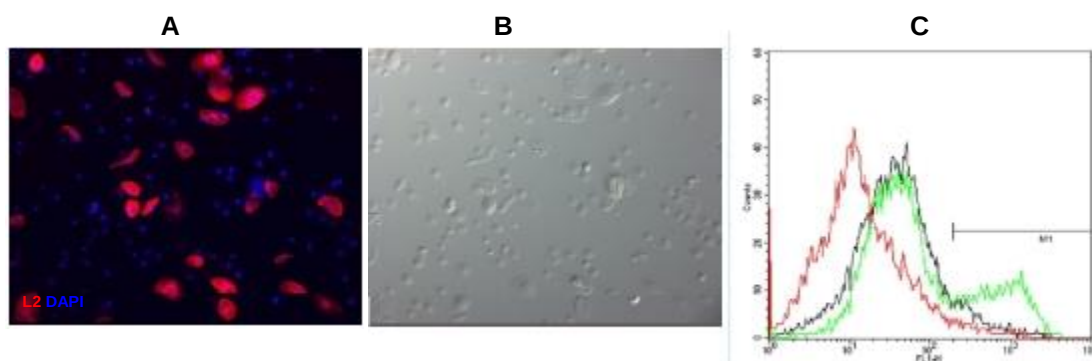


32. Ábra. Az L2 molekula kifejeződése a *L. bouhardi* darázsfertőzés hatására differenciálódó hemocitákon

Oregon R lárvák keringő hemocitáinak indirekt immunfluoreszcencia festése anti-L2 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal a *L. bouhardi* darázsfertőzést követő 1, 3, 5, 8, 12, 16, 24, 48 és 72 órában. A grafikonon a feltüntetett

időpontokban az L2 kifejeződést mutató hemociták %-os arányát ábrázolja. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék) [Honti és mtsai., 2010. nyomán].

A nagyméretű, kiterült lamellocitákon megnyilvánuló L2 molekula fluoreszcens mikroszkópiával (33. Ábra, A) és áramlási citometriaival (33. Ábra, C) kizárólag a hemociták permeabilizálása után mutatható ki, ami arra utal, hogy az L2 molekula a lamellociták citoplazmájában fejeződik ki.



33. Ábra. Az L2 molekula kifejeződése *l(3)mbn-1* lárva keringő hemocitáin

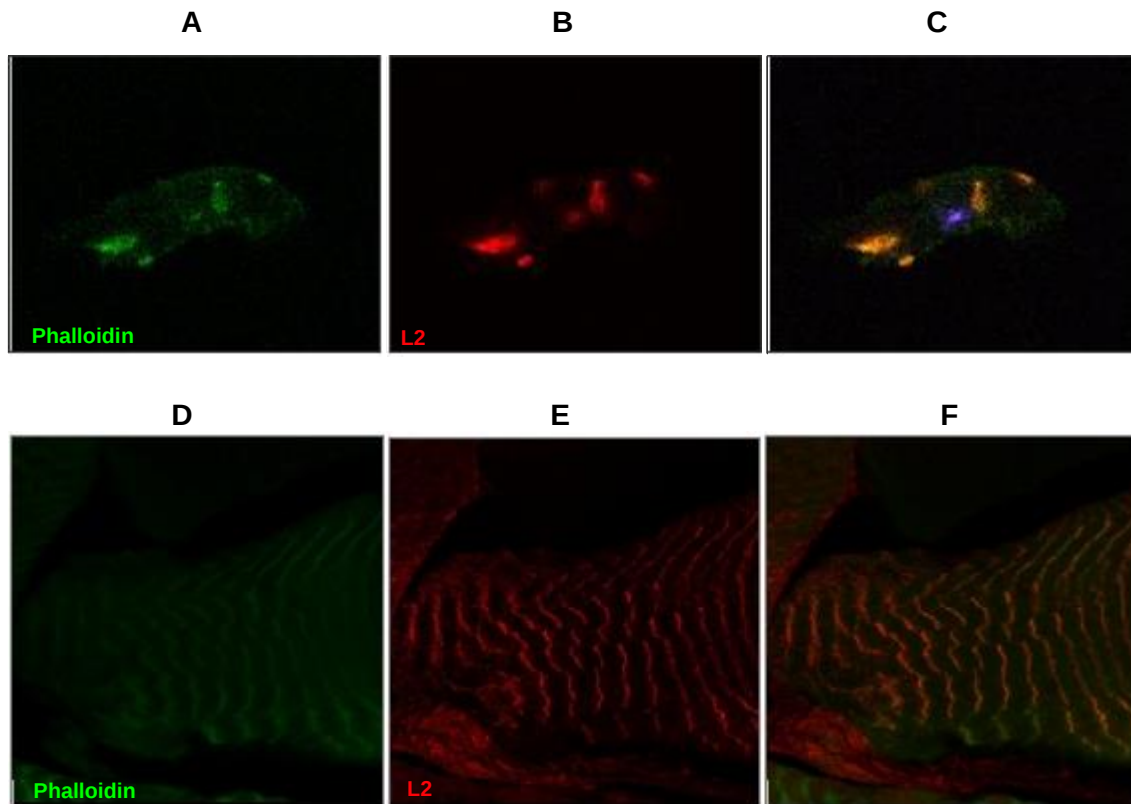
(A) Acetonnal fixált hemociták fluoreszcens mikroszkópos, (B) Nomarski, valamint (C) az élő hemociták (piros), paraformaldehiddel fixált hemociták (fekete), továbbá paraformaldehiddel fixált és Triton X- permeabilizált hemociták áramlási citometriaival (A) anti-L2 és anti-egér Alexa 568 illetve (C) anti-egér Alexa 633 ellenanyaggal történő festést követően [Kurucz É.].

Az L2 molekulát *l(3)mbn-1* lárvákból izolált hemociták kivonatából immunprecipitáltuk és a 45-55 kDa molekulatömegű immunprecipitált mintában MALDI-TOF tömegspektrometriai analízissel *Drosophila* Aktin 57B CG10067-PA, izoforma A (376AA) molekulára illő peptideket azonosítottunk.

Az aktin a sejtekben 42 kDa-os molekulatömegű globuláris monomer G-aktin és az aktin monomerekből felépülő polimer F-aktin formában fordul elő. A aktin hálózat fontos szerepet tölt be a sejtek alakjának, polaritásának meghatározásában, az intracelluláris vezikulák transzportjában, a sejtmozgásokban, a sejthalak változásokban, a lamellipodium és filopodium képzésében. Ezen folyamatok általában olyan F-aktin kötő fehérjék közreműködésével mennek végbe, mint a filamin, vagy az α -aktinin, melyek hatására az F-aktin filamentumok különbözőképpen rendeződnek [Pollard és mtsai., 2000].

Bár a természetben az aktinnak több mint 100 egyedi szekvenciájú formája létezik, azonban ezek közül a térszerkezeti, illetve funkcionális izoformák kiemelkedő homológiája mellett a különböző élőlényekben előforduló azonos izoformák közel 100%-os szekvenciális konzervativizmust mutatnak [Sheterline és mtsai., 1999]. Az emlősökben előforduló aktin izoformák közül az α -izoformák az izomsejtekben, a β -izoformák a nem-izomsejtekben fordulnak elő. A gyilkos galócában termelődő falloidin toxin szelektíven és nagy affinitással kötődik az F-aktinhoz, ezért a fluoreszkáló konjugátumaival a sejtek aktin hálózata láthatóvá tehető. Az *l(3)mbn-1* lárva keringő hemocitáiban (34. Ábra A, B, C) és az izomszövetben (34. Ábra D, E, F) az F-aktint a Alexa Fluor 488 phalloidinnal zöldre (34. Ábra, A, D), az L2 molekulákat anti-L2 ellenanyaggal pirosra (34. Ábra B, E) festettük. Az F-aktin és az L2

molekula a lamellociták citoplazmájában (fókuszosokban) (34. Ábra C) és a lárvák izomszövetében is kolokalizációt mutatott (34. Ábra F).



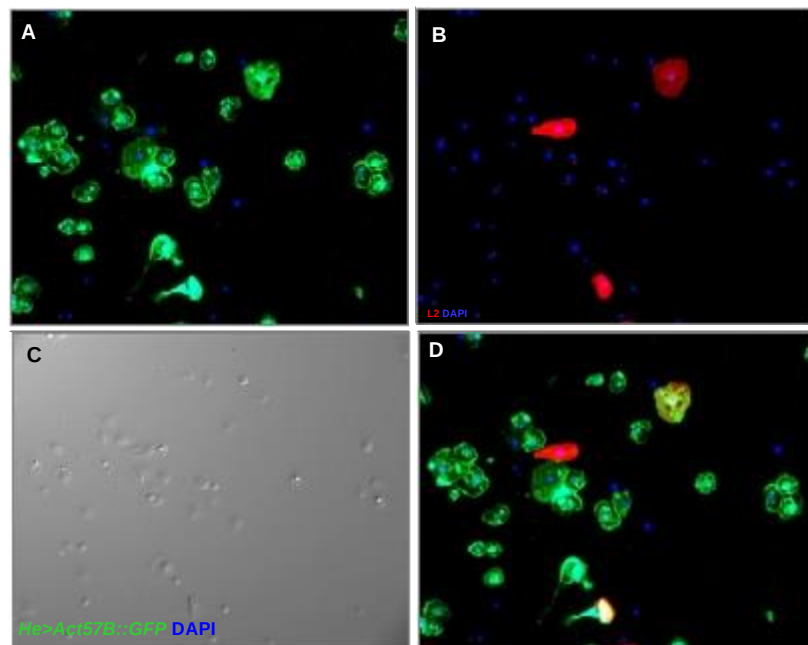
34. Ábra. Az L2 molekula és az F-aktin ko-lokalizációja hemocitákban és izomban

Az *l(3)mbn-1* lárvákból izolált hemociták kettős festése (A) Alexa Fluor 488 phalloidin (zöld) valamint (B) anti-L2 és anti-egér Alexa Fluor 563 (piros) ellenanyagokkal. (C) Ko-lokalizáció (sárga), Dapi (kék).

Az *l(3)mbn-1* lárvák izomszövetének kettős festése (D) Alexa Fluor 488 phalloidin (zöld) valamint (E) anti-L2 és anti-egér Alexa Fluor 563 (piros) ellenanyagokkal. (F) Ko-lokalizáció (sárga) A felvételek Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal készültek. [Vilmos P.]

Az egyetlen közölt aktin mutáns, a *Drosophila*-ban a *drxex8 actin57B* törzset [Davis és mtsai., 2003], sajnos nem tudtunk megszerezni, ezért az Act57B géntermék kifejeződését kettősszálú RNS interferenciával gátoltuk. A kettősszálú RNS interferencia konstrukciót tartalmazó törzs létrehozásához az *aktin57B* gén 3'UTR-ból építettünk be egy szakaszt CaSpeR vektorba, a hajtókanyar képzéséhez mindkét orientációban, mert a *Drosophila* aktin molekulák közül az *aktin57B* génre nézve kizárólag ez a szakasz rendelkezik egyedi szekvenciával. Az *UAS-aktin57B* RNAi hemocita specifikus kifejeztetéséhez a *Hemese>GAL4* meghajtó elemet használtuk. A *Hemese>aktin57B* RNSi utódokban a *L. bouvardi* parazitoid darázs immunindukció hatására képződött lamellocitákon az L2 molekula kifejeződését vizsgálva azt találtuk, hogy a molekula kifejeződése a szülői törzsekből származó lamellociták L2 kifejeződéséhez képest nem változott. Mivel az RNS interferenciával nem minden esetben gátolható a géntermék képződése, egy másik megközelítési móddal is megpróbálkoztunk: *UAS-aktin* GFP fúziós transzgéneket [Röper és mtsai., 2005] fejeztettük ki hemocitákban a *Hemese>GAL4* meghajtó elem

alkalmazásával. A *Hemese>aktin* GFP törzsek parazitoid darázzsal immunindukált lárváiban a hemociták döntő többsége zölden fluoreszkált (35. Ábra A), azaz kifejezte a GFP fúziós fehérjét, de L2 festődés kizárólag a lamellocitákon volt megfigyelhető (35. Ábra B), ami azt jelenheti, hogy az L2 molekulát azonosító anti-L2 ellenanyag nem közvetlenül kötődik az aktin molekulához, hanem valószínűleg egy aktinnal asszociált molekulát ismer fel.



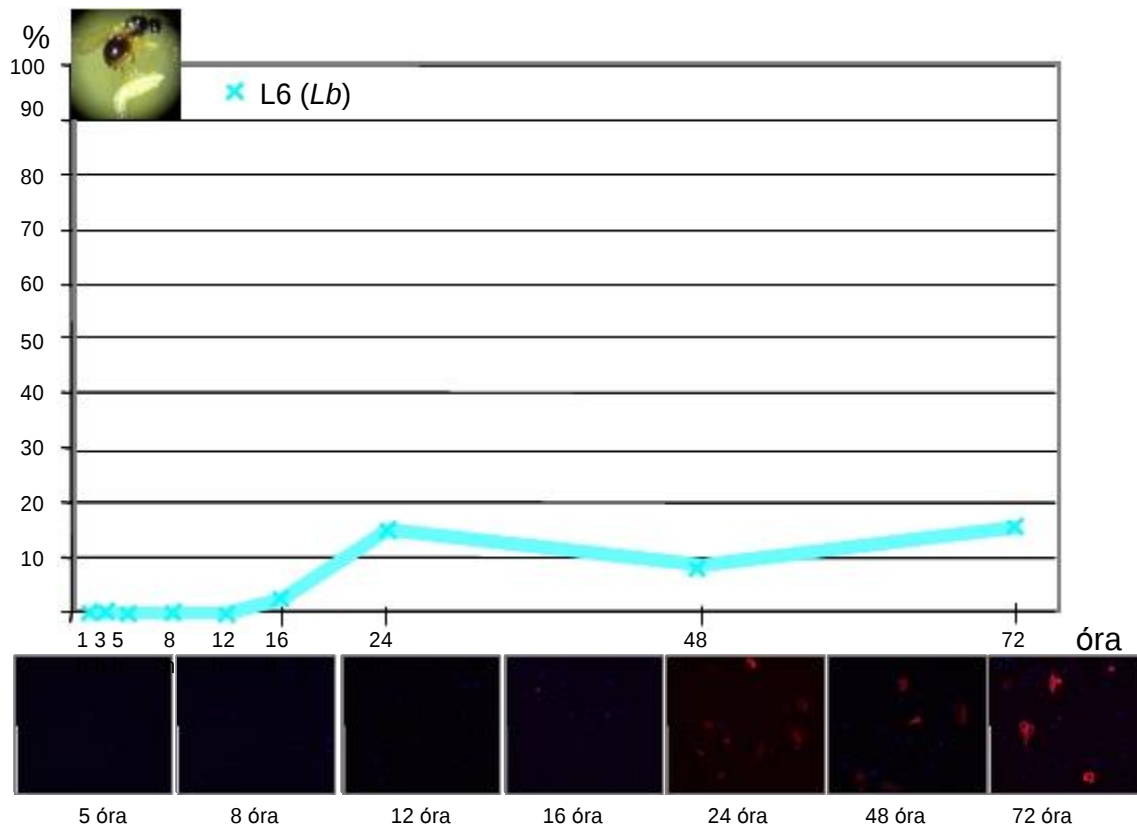
35. Ábra. Az L2 molekula kifejeződése a *L. bouhardi* parazitoid darázzsal fertőzött *Hemese>aktin* GFP lárvák keringő hemocitáiban

(A) *Hemese>aktin* GFP (*He>Act57B::GFP*) lárvák keringő hemocitáiban (zöld) a (B) L2 molekulát anti-L2 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal festettük (piros), a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék). (C) Nomarski optikával készült felvétel. (D) Az A és B kép egymásra helyezése [Honti V.].

A továbbiakban az L2 molekulát kódoló gént az *l(3)mbn-1* törzs hemocitáiból létrehozott expressziós génkönyvtárból is megkíséreltük meghatározni, azonban az anti-L2 ellenanyaggal L2 fúziós fehérjét kódoló cDNS-t nem sikerült izolálni. Bár jelenleg is nyitott kérdés, hogy az L2 molekula milyen szerepet játszhat a lamellociták által közvetített immunválaszban a molekulát felismerő lamellocita specifikus ellenanyag a hemocitákat tanulmányozó laboratóriumokban széleskörűen használt reagens.

3.2.3.4. A terminálisan differenciálódott lamellocitákon kifejeződő L6 molekula

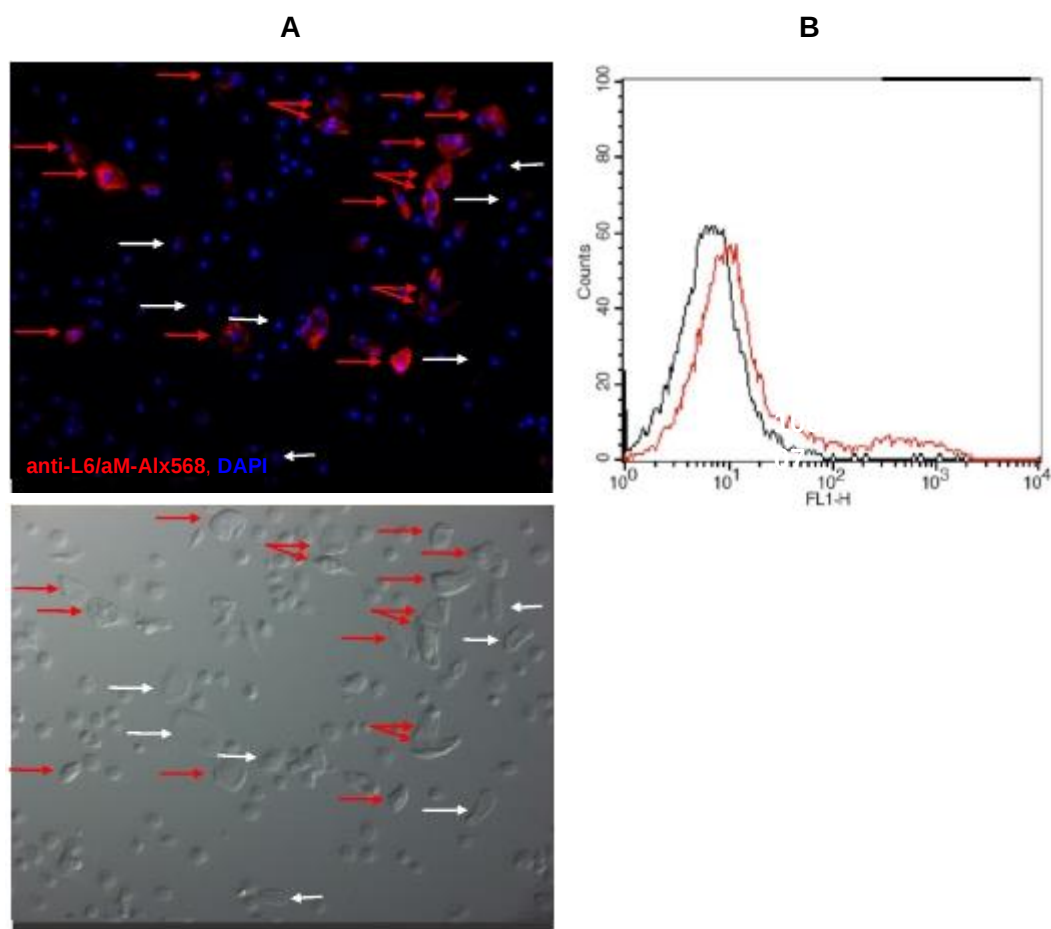
Az L6 molekula a vad típusú Oregon R lárva keringésében a darázsfertőzést követő 24. óra körül a hemociták 15%-án, a megjelenő nagy kiterült lamellociták egy alpopulációján fejeződik ki, de a fertőzés későbbi szakaszában sem éri el az összsejtszám 20 %-át (36. Ábra).



36. Ábra. Az L6 molekula megnyilvánulása keringő hemocitákon *L. boucardi* darázsfertőzést követően

Oregon R lárvák keringő hemocitáinak indirekt immunfluoreszcencia festése anti-L6 és anti-egér Alexa fluor 564 ellenanyagokkal (piros) a *L. boucardi* darázsfertőzést követő 1, 3, 5, 8, 12, 16, 24, 48, és 72 órában. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék). A grafikon a feltüntetett időpontokban az L6 kifejeződést mutató sejtek %-os arányát ábrázolja [Honti és mtsai., 2010. nyomán].

Az L6 molekula megnyilvánulását a különböző hemocita kompartmentumokban a hemocitákat kijelölő, a sejtmagjukban GFP fehérjét tartalmazó *Hemese>GFPnls* lárvákban vizsgáltuk. Az L6 molekula a darázsfertőzést követő 96. órában a keringő és a szesszilis lamellociták egy részében nyilvánul meg, míg a központi vérsejtképző szervben, a lymph gland-ben, nem találtunk L6 festődést mutató lamellocitákat. Az L6 molekula az *l(3)mbn-1* mutáns lárva keringő hemocitái közül a nagyméretű, kiterült lamellociták egy alpopulációján (37. Ábra, A), a sejtmembránba ágyazottan nyilvánul meg, ahogy ezt az élő sejtek indirekt immunfluoreszcenciát követő áramlási citometria analízise mutatja (37. Ábra, B).



37. Ábra Az L6 molekula kifejeződése *l(3)mbn-1* mutáns lárva keringő hemocitáin

(A) Az *l(3)mbn-1* mutáns lárva acetonnal fixált keringő hemocitáinak anti-L6 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal történő festést követő fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata. A nyilak anti-L2 ellenanyaggal festődő (piros) és nem festődő (fehér) lamellocitákat jelölnek. (B) Az *l(3)mbn-1* lárva élő keringő hemocitái anti-L6 és anti-egér Alexa Fluor 633 ellenanyagokkal történő festést követő áramlási citometriai vizsgálata (piros görbe), a fekete hisztogram az IgM izotípus kontrollt mutatja [Kurucz É].

Az L6 molekulatömegét SDS-poliakrilamid-gélelektroforézist követő Western blot analízissel nem tudtuk meghatározni, ezért feltételezhető, hogy az anti-L6 monoklonális ellenanyag az L6 molekulán konformáció függő epitópot ismer fel. Ezért az L6 molekulát kódoló gént az *l(3)mbn-1* törzs hemocitáiból létrehozott expressziós génkönyvtárból próbáltuk azonosítani, azonban az anti-L6 ellenanyaggal átvizsgált 106 baktériumtelep egyike sem adott pozitív reakciót.

3.3. A lamellocita differenciálódás vizsgálata

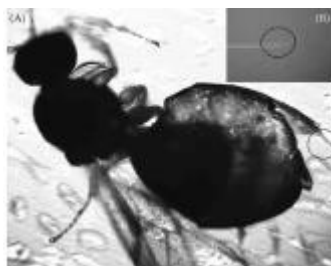
A *Leptopilina boulardi* G486 parazitoid darázs petéje a *Drosophila* lárvában sejt-közvetítette immunválaszt vált ki, a hemociták száma megemelkedik és új típusú hemociták, nagyméretű, lapos, tokképző lamellociták jelennek meg a keringésben. A lamellociták kialakulásának vizsgálata során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1.) a darázsszűrés során mi az a minimális inger, ami a lamellociták differenciálódását kiváltja,
- 2.) mely sejtpopulációból differenciálódnak a lamellociták,
- 3.) az immunindukció után mikor észlelhető először lamellociták differenciálódása,
- 4.) a központi nyirokszerv mellett létezik-e olyan hemocita képző kompartmentum, mely lamellocita előalakokat tartalmaz.

3.3.1. A lamellocita indukció alapvető feltétele

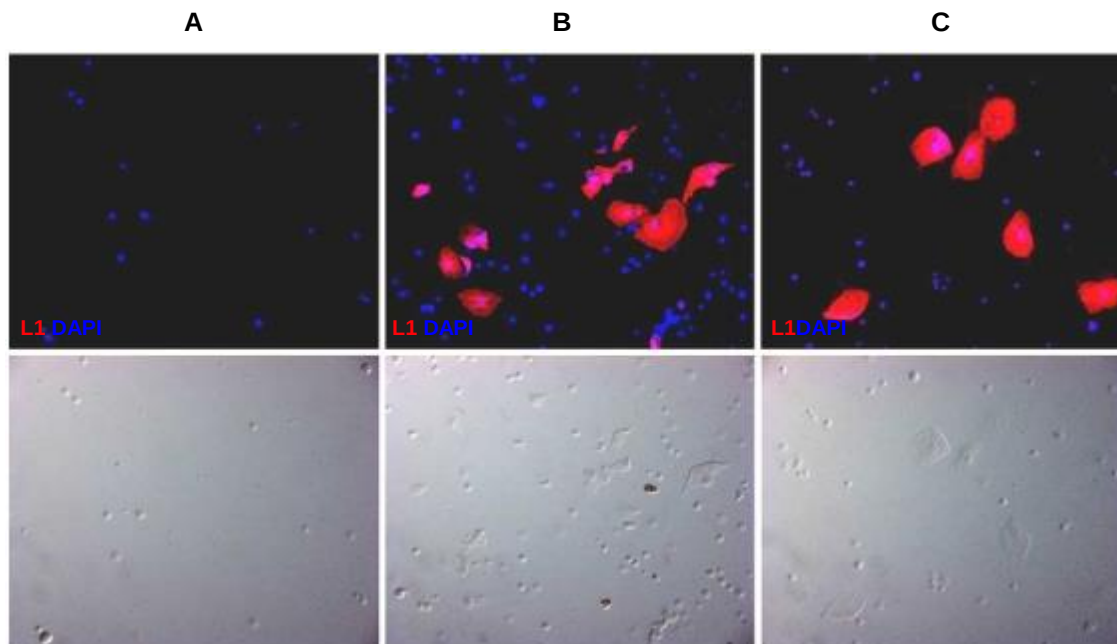
Az eddigi ismeretek szerint a parazitoid darázsfertőzés során a *Drosophila* lárvát a kutikulájának sérülése, valamint a lárvába helyezett darázspete együttesen váltják ki a lamellociták differenciálódását [Rizki és Rizki 1992, Russo és mtsai., 1996]. Kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a darázsszűrés során képződő mechanikai sérüléshez hasonló, laboratóriumi körülmények között kiváltott steril szűrés a darázs pete hiányában is előidézhetheti-e a lamellociták képződését. Összehasonlítottuk a kapillárisal, illetve darázssal szűrt lárvákban a lamellociták differenciálódásának kinetikáját és adhéziós képességüket.

Második fejlődési stádiumú vad típusú Oregon R lárvákat steril kapillárisal megszűrve (38. Ábra B), illetve *L. boulardi* darázssal megszűrve (38. Ábra A) azt találtuk, hogy a steril szűrés önmagában szintén kiváltja a lamellociták képződését (39. Ábra). Mivel a lamellociták a darázspetét több rétegben veszik körül, mindkét esetben megvizsgáltuk a lamellociták kitapadási képességét és azt tapasztaltuk, hogy a darázssal szűratott, illetve sterilen szűrt lárvákból származó lamellociták egyforma hatékonysággal tapadnak ki az üveg, vagy polisztrén felülethez és morfológiai sajátágaikban sem különböztek egymástól. A steril szűrés illetve a darázs általi peterakást követő 48, 72, 96 és 120 óra elteltével a lárvákban keringő hemociták és ezen belül a lamellociták számában nem találtunk szignifikáns különbséget. Ebből arra következtethetünk, hogy a kutikula mechanikai sérülése és feltehetően az ezzel járó bazális lamina károsodása már elegendő ingert szolgáltat a lamellociták differenciálódása és a sejtes immunválasz kiváltásához.



38. Ábra *Leptopilina boulardi* G486 parazitoid darázs

(A) *Leptopilina boulardi* G486 parazitoid darázs tojócsove és (B) a kapilláris, amelyet a steril szűréshez használtunk [Márkus és mtsai., 2005].



39. Ábra. Steril kapillárisal szűrt és darázsszal szűratott lárvákban differenciálódó lamellociták

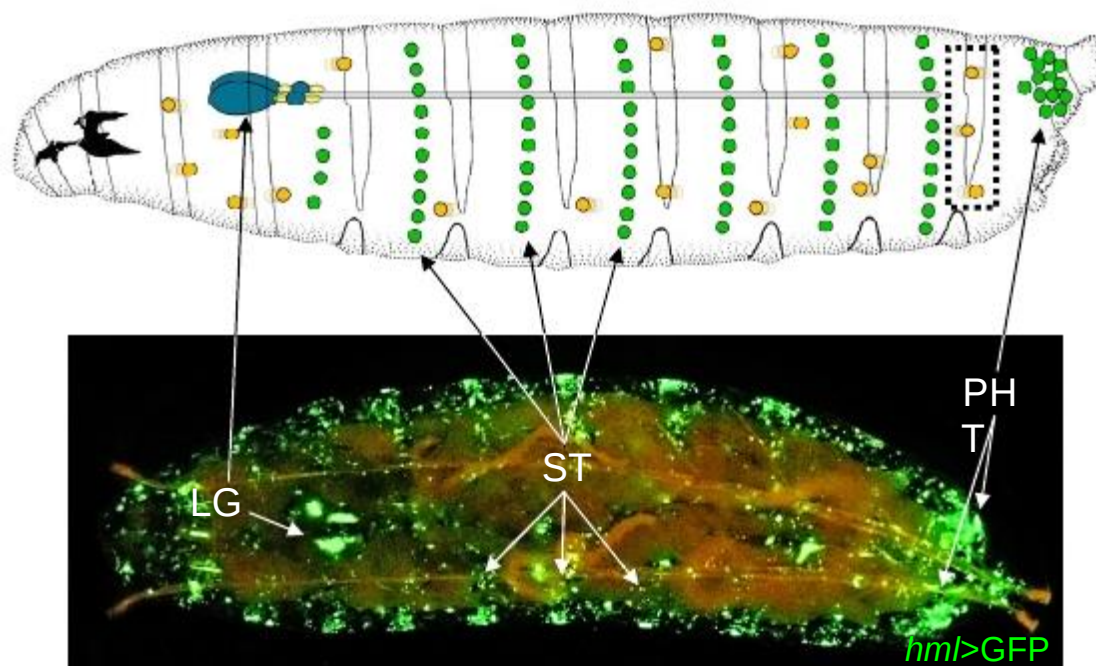
A keringő hemociták fenotípusa az (A) szűratlan, (B) steril kapillárisal szűrt és a (C) darázsszal szűratott *Drosophila* lárvákban 72 órával a szűrés után. A hemocitákat a lamellocitákkal reagáló anti-L1 és anti-egér Cy3 (aMCy3) ellenanyagokkal festettük, a sejtmagokat DAPI festéssel (kék) tettük láthatóvá (felső képek). Alsó sorban a Nomarski optikával készült felvételek [Márkus és mtsai., 2005].

A természetben a kutikula sérülését gyakran bakteriális fertőzés követi, ezért azt is megvizsgáltuk, hogyan változik a keringő hemociták és ezen belül a lamellociták száma, miután kapillárisal élő *E. coli* baktériumokat injektáltunk a második stádiumú lárvákba. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a baktériumokkal történt fertőzés után a lárvákban a keringő hemociták száma megemelkedett, azonban a lamellociták differenciálódása a sterilen szűrt kontrollokéhoz hasonlóan zajlott.

Eredményeink szerint a *Drosophila* lárva bazális membránjának sérülését okozó steril szűrés önmagában is képes kiváltani a lamellociták differenciálódását. A zsírtestet borító bazális membrán hiánya a *Drosophila tu^w* mutánsban előidézi a hemocitáknak a zsírtest körüli csoportosulását, majd a zsírtest melanizálódását [Rizki és Rizki 1974]. Az a megfigyelésünk, mely szerint a steril szűrés önmagában is kiváltja a lamellociták kialakulását arra utal, hogy a hemociták a bazális lamina sérülését érzékelve aktiválódnak.

3.3.2. A *Drosophila* vérsejtképző kompartmentumai

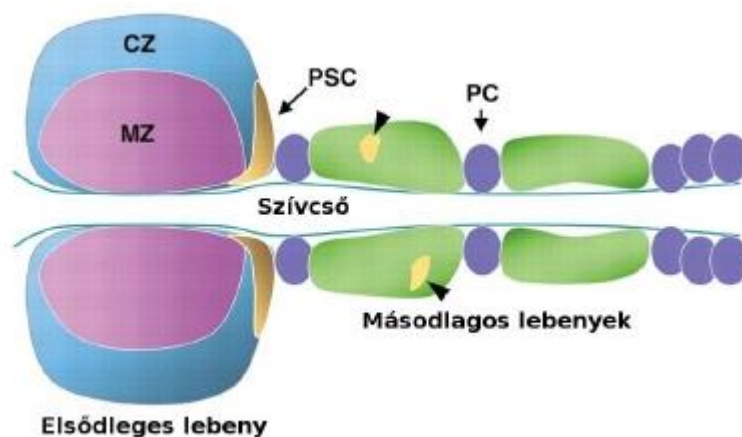
A *Drosophila* lárvában a hemociták a központi vérsejtképző szerben, a lymph gland-ben helyezkednek el (40. ábra LG kék, 41. Ábra), ezen kívül a hemolimfában szabadon áramlanak (40. Ábra sárga), vagy a testüreg falán az epiteliális szövetekhez tapadva szelvényenkénti sávok elrendezésében alkotják a szesszilis szövetet (40. Ábra ST zöld). Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a lárv utolsó szelvényében a szesszilis hemociták különösen feldúsulnak és nagy csomókba rendeződnek. Ezt a hemocita csomót poszterior hematopoetikus szövetnek (40. Ábra PH) neveztünk el.



40. Ábra. A *Drosophila* lárv hemocita kompartmentumai

A lárvá illusztrációján (felső kép) a központi vérsejtképző szerv, a lymph gland (LG, kék), a keringő hemociták (sárga) és a szesszilis hemociták (ST, zöld) láthatóak, melyek a poszterior részen csomóba rendeződnek (PH). Az élő lárvában a hemocitákat a központi nyirokszervben (LG), a szesszilis szövetben (ST) és a keringésben a hemocita specifikus *Hemolymph*>GFP (*Hml*>GFP) meghajtó elemmel [Goto és mtsai., 2001] a hemocitákban kifejeztetett GFP teszi láthatóvá (zöld) [Márkus R., Csordás G.].

A *Drosophila* lárvális vérképzés kutatásának „központi dogmája” szerint a *Drosophila* lárvában a hemociták kizárólag a központi nyirokszervben differenciálódnak: az éretlen hemociták az elülső lebeny medulláris zónájában, míg a differenciálódott plazmatociták, kristálysejtek és lamellociták a kortikális lebenyben helyezkednek el. A poszterior szignalizációs központ (PSC) feladata a medulláris zónában a hemociták naiv állapotának fenntartása (41. Ábra).

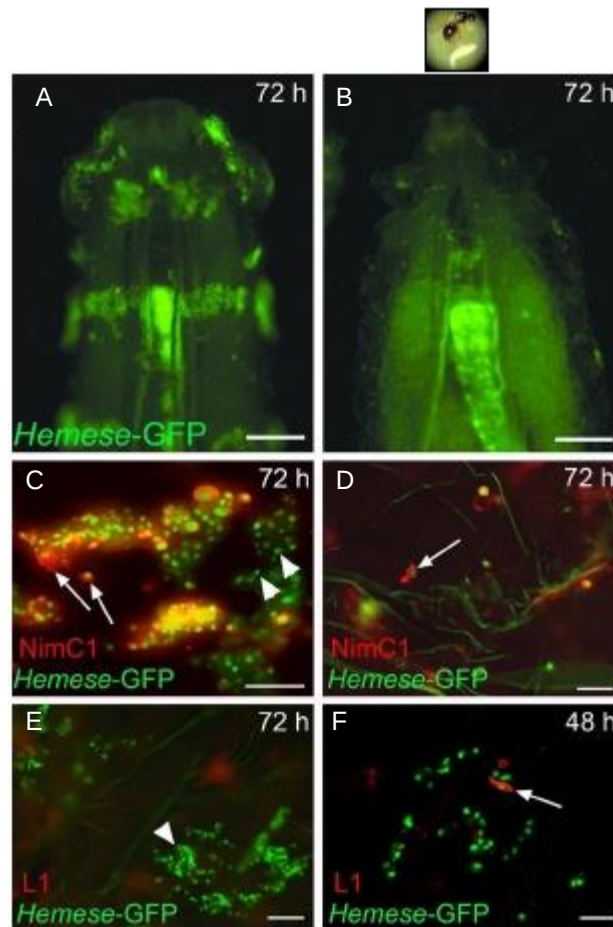


41. Ábra. A központi vérsejtképző szerv szerkezete

A központi vérsejtképző szerv a szívcső két oldalán található páros lebenyből áll. Az első lebeny medulláris zónájában (MZ) az értetlen prohemociták, míg a kortikális zónában (CZ) a terminálisan differenciálódott hemociták helyezkednek el. A poszterior szignalizációs központ (PSC) a hemociták differenciálódásának szabályozásában vesz részt. A központi vérsejtképző szerv lebenyei között perikardiális sejtek találhatók (PC) [Jung és mtsai., 2005. nyomán].

Darázsfertőzés hatására a *Drosophila* lárva keringésében megemelkedik a hemociták száma és megjelennek a nagyméretű tokképző hemociták a lamellociták. Irodalmi adatok szerint a lamellociták a darázsfertőzést követően széteső központi vérsejtképző szerv kortikális zónájából származnak [Krzemien és mtsai., 2007], mi azonban azt tapasztaltuk, hogy a lamellociták a darázsfertőzést követően már a központi vérsejtképző szerv szétesése előtt megjelennek a lárva keringésében. Ennek alapján feltételeztük, hogy a központi nyirokszerven kívül is kell, hogy legyen egy funkcionális hemocita képző kompartmentum, melyből immunindukciót követően a differenciálódó hemociták a keringésbe kerülnek, majd a parazita petére tapadnak.

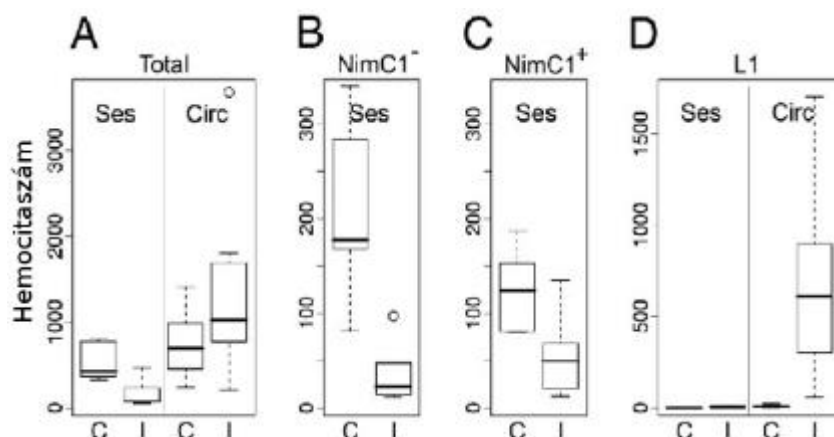
A darázsszűrást követően a keringésbe kerülő lamellociták eredetét több oldalról is megvizsgáltuk. Első megközelítésként a szesszilis és keringő hemociták mennyiségének és fenotípusának változását mértük a darázsszűrással kiváltott immunindukció során. Kísérleteinkhez a hemociták közel 85%-ában a sejtmagban zölden világító *Hemese>GFPnls* konstrukciót használtuk. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a darázssal nem indukált lárvákban a szesszilis hemociták sávokba rendeződve tapadnak a lárva testüregének falához (42. Ábra A) és a szesszilis hemociták egy része kifejezi a plazmatocitákra sejtekre jellemző NimC1 molekulát [Kurucz és mtsai., 2007b] (42. Ábra C), de a lamellocitákra jellemző Atila (L1) [Kurucz és mtsai., 2007a] molekula nem nyilvánul meg rajtuk (42. Ábra E). A darázsfertőzést követően a szesszilis kompartmentum sávozott elrendeződése megszűnik (42. Ábra B) és a lárva keringésében lamellociták jelennek meg (42. Ábra F).



42. Ábra. A szesszilis hemociták morfológiája és immunológiai fenotípusa a naiv, és a darázssal fertőzött lárvákban

(A) A naiv lárvákban a *Hemese>GFP^{nls}* sejtmagfestéssel megjelölt szesszilis hemociták szelvényenkénti sávokban tapadnak a testüreg falához (a lárv poszterior vége néz fölfelé). (B) A darázssal fertőzött lárvákban 72 óra után megszűnik a hemociták sávos elrendeződése. A szesszilis szövet festése indirekt immunfluoreszcenciával a plazmatocitákkal reagáló anti-NimC1 (P1) és anti-egér Alexa Fluor 568 (C, D), illetve a lamellocitákat kijelölő anti-L1 (Atilla) és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal (E, F) történt. A nyilak a NimC1-t, illetve L1-t kifejező sejteket, a nyílhegyek a festődést nem mutató sejteket jelölik. (Méret jelzés: A, B 100 μ m, C-F 20 μ m.) [Márkus és mtsai., 2009].

A 43. Ábrán az A panelen azt ábrázoltuk, hogy miközben darázsindukció hatására (I) a lárvák szesszilis szövetében (Ses) a hemociták száma csökkent, addig a keringésben (Cir) a darázsszúrás követően emelkedett sejtszámot mértünk. A szesszilis hemociták fenotípusának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy indukció hatására jelentősen csökkent a NimC1 negatív prohemociták száma (43. Ábra B), de a plazmatocita irányban elkötelezett NimC1 pozitív sejtekből is kevesebbet találtunk, mint a nem ferőzött lárvákban (C) (43. Ábra C). Megfigyeléseink szerint a darázsindukció hatására a keringésben tapasztalt hemocitaszám emelkedésért (43. Ábra A Circ) a differenciálódó, lamellocita irányban elköteleződő L1 pozitív sejtek felelősek (43. Ábra D Circ).

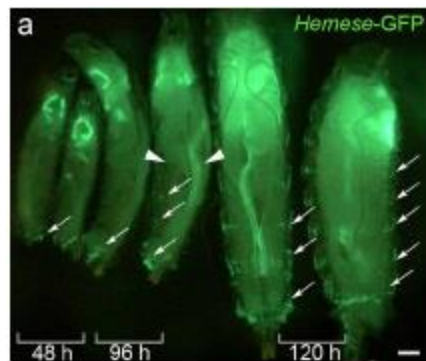


43. Ábra. A hemociták fenotípusának és számának alakulása darázsfertőzést követően

A hemociták száma a szesszilis szövetben és a keringésben a (C) naiv és (I) darázssal indukált *Hemese>GFPnls* lárvákban. (A) A hemociták száma a szesszilis szövetben (Ses) és a keringésben (Circ). Darázsfertőzés hatására lárvánként átlagosan 349 sejt tűnt el a szesszilis szövetből (a kontroll állatokban átlagosan 424 sejtet, az indukált lárvákban átlagosan 75 sejtet számláltunk), ugyanakkor a keringésben átlagosan 331-gyel nőtt a sejtszám (az indukált állatokban számlált 1025 és a kontroll állatokban számlált 694 különbsége). (B) A NimC1 negatív és (C) NimC1 pozitív hemociták száma. (D) Az L1 (Atilla) molekulát kifejező szesszilis és keringő hemociták száma [Márkus és mtsai., 2009].

Kísérleteink szerint a darázssindukció hatására a szesszilis szövetben bekövetkező hemocitaszám csökkenés számszerűen is megfelel a keringésben megjelenő hemocitaszám emelkedésnek, továbbá anti-foszfohiszton H3 festéssel azt tapasztaltuk, hogy a darázsfertőzés nem befolyásolja a szesszilis kompartmentumban a hemociták osztódásának a mértékét. Ezekből az eredményeinkből arra következtettünk, hogy a keringésben a darázsfertőzés hatására megjelenő lamellociták elsősorban a szesszilis szövetből származnak.

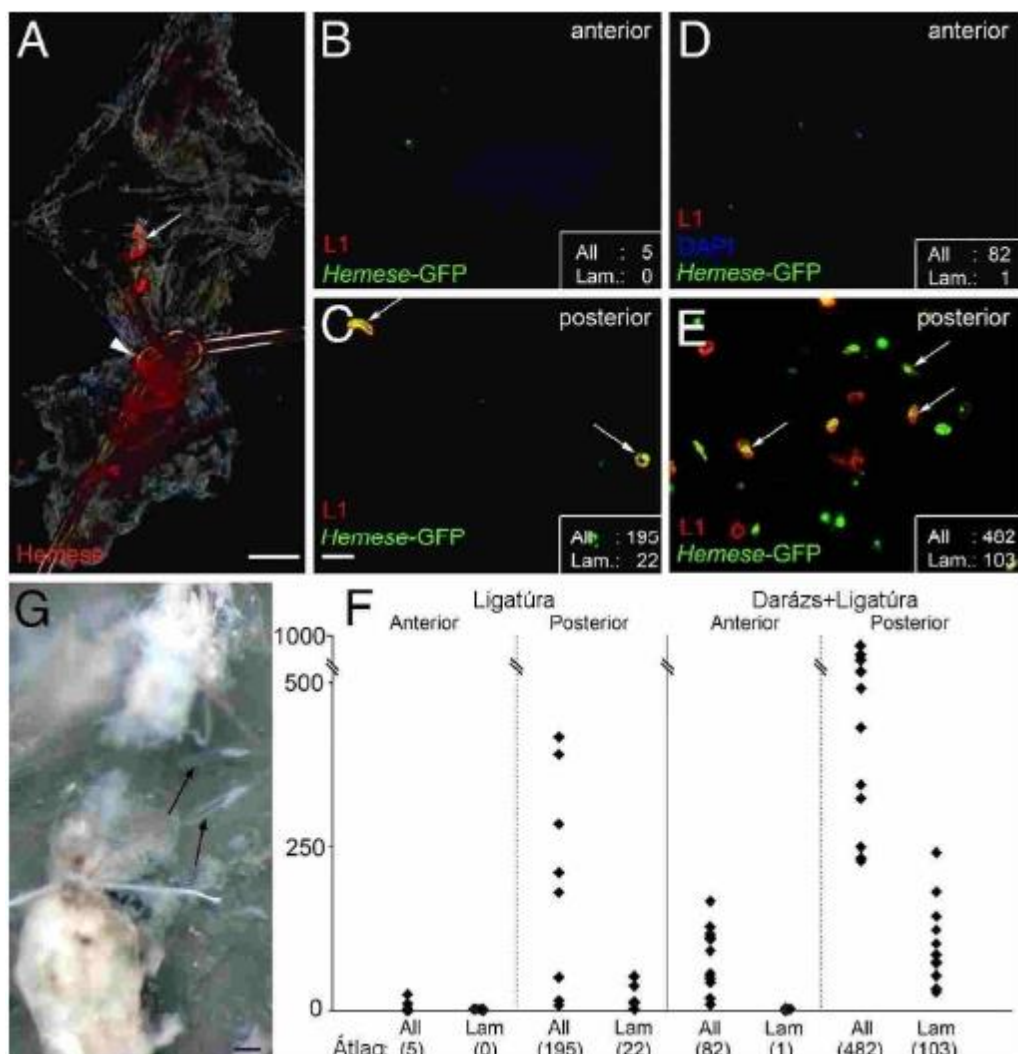
A lamellociták eredetének további vizsgálatához fizikailag, ligatúrával választottuk el a lárv elülső harmadában elhelyezkedő központi vérsejtképző szervet a lárv poszterior egyharmadára lokalizálódó szesszilis szövetből. Ezt a kísérletet a második stádiumos lárvákban végeztük, mivel az egyedfejlődés lárvális szakaszában a szesszilis szövet a lárv poszterior végétől előrefelé haladva fokozatosan alakul ki (44. Ábra) és a második stádiumos lárvákban még nem ér el a központi vérsejtképző szerv régiójába.



44. Ábra. A szesszilis szövet kialakulása a lárva egyedfejlődése során

A *Hemese>GFPnls* lárvákban látható szesszilis hemocitákat a nyilak jelölik az első (48h), második (96h) és harmadik (120h) fejlődési stádiumban. A nyílhegy a ligatúra majdani helyét mutatja. A *Hemese>GFPnls* lárvákban a hemocitákon kívül ektópikus GFP kifejeződés látható a nyálmirigyben és a gyomorban is. (Méret jelzés: 100 μ m.) [Márkus R].

Darázzsal immunindukált (45. Ábra D,E) és nem indukált (45. Ábra B,C) második stádiumú lárvákon ligatúrával elválasztottuk a központi vérsejtképző szervet a szesszilis szövetről (45. Ábra A). Negyvennyolc óra elteltével, amikor a lárvák központi vérsejtképző szerve még intakt állapotú, azaz nem kezdődött meg a darázsszúrás hatására bekövetkező szétesése, a ligatúránál kettévágtuk az állatot és a központi vérsejtképző szervet tartalmazó anterior és a szesszilis szövetet tartalmazó poszterior részből származó keringő hemocitákat izoláltuk, majd megfestettük az összes hemocitával reagáló anti-Hemese és a lamellocitákkal reagáló anti-L1 ellenanyagokkal (45. Ábra B-E). A nem indukált lárvák poszterior felében megjelenő lamellocita (45. Ábra C nyíl) újabb bizonyítékot szolgáltatott arra a korábbi megfigyelésünkre, miszerint bazális lamina sérülése, amit ebben az esetben a ligatúra okozott, önmagában is kiválthatja a lamellociták differenciálódását [Márkus és mtsai., 2005]. Ugyanakkor a darázssal indukált lárvák poszterior felében sokkal több lamellocita képződött (45. Ábra E), mint a szúratlanokéban. A darázssal indukált lárvák poszterior részében megfigyelhető nagyszámú lamellocitával (45. Ábra E) szemben, a lárvák központi vérsejtképző szervét tartalmazó anterior részben nem találtunk lamellocitákat (45. Ábra D). Ez azt jelenti, hogy a központi vérsejtképző szervet ebben az időpontban még nem hagyják el lamellociták, vagyis a keringésben először megjelenő lamellociták nem innen származnak. Számszerűsített kísérleti eredményeinket diagramon mutatjuk be (45. Ábra F): a darázssal indukált lárvák poszterior részében szignifikánsan több lamellocitát találtunk, mint a nem indukált állatok esetében. Azt is megfigyeltük, hogy lamellocitákat abban az esetben is a lárva poszterior részében találtunk, amikor a darázs a lárva anterior részébe helyezte a petéjét ahol a peték lamellociták hiányában nem is melanizálódtak (45. Ábra, G nyilak). Összesen harminc darázssal fertőzött lárvában vizsgáltuk meg a peték körüli tokképződést. Hat esetben találtunk petéket a ligatúrától anterior irányban, de ezek egyike körül sem képződött tok, míg a poszterior oldalon minden petét melanizált tok burkolt.

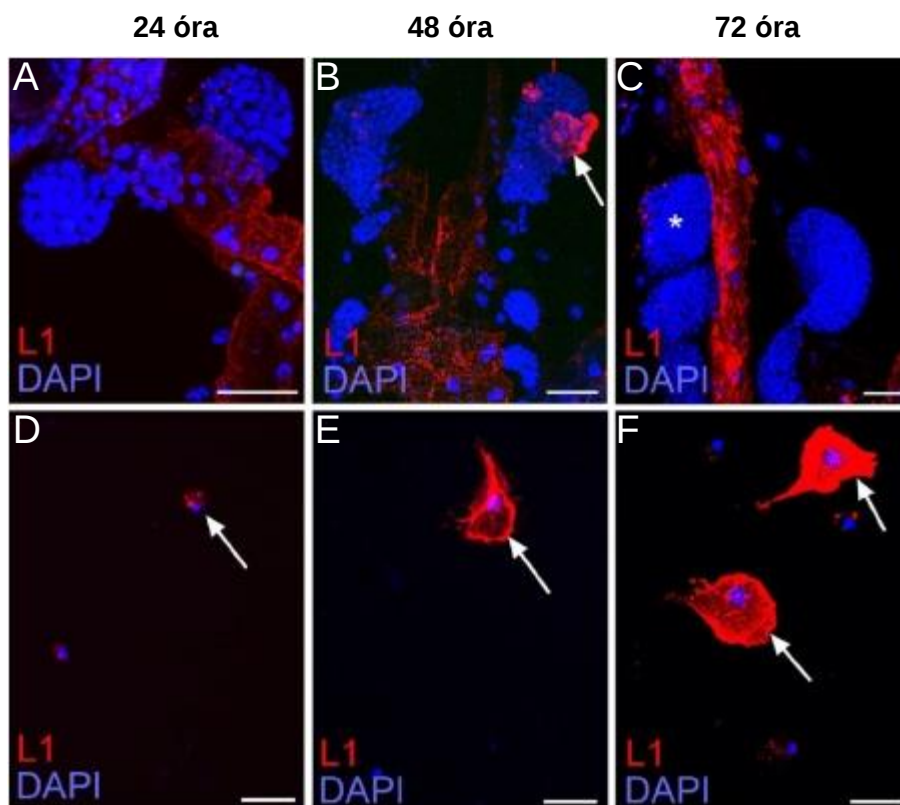


45. Ábra. Lamellociták differenciálódása a nem indukált és a darázssal indukált, ligatúrával ellátott *Hemese>GFPnls* lárvákban

(A) Az anti-Hemese és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal pirosra festett központi vérsejtképző szerv (nyíl) a ligatúrától (nyílhegy) anterior irányban helyezkedik el. A nem indukált (B, C) és a darázssal szúratott (D, E) lárvák a ligatúrától anterior (B, D) és a ligatúrától poszterior (C, E) részéből izolált hemociták (zöld sejtmag) festése lamellocita specifikus anti-L1 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal (piros). A sejtmagokat DAPI festéssel is láthatóvá tettük (kék). A nyilak (C,E) a GFP-t és L1 molekulát együttesen kifejező sejteket jelölik. (F) A diagram a kontroll és darázssal indukált állatok ligatúrával elválasztott anterior és poszterior részéből származó összes hemocita (All) és ezen belül a lamellociták (Lam) számát ábrázolja (Tíz kísérlet átlaga). (G) A lárvában a ligatúrától anterior irányban elhelyezett pete nem melanizálódik (nyilak). (Méret jelzés: A, G, 100 μ m, B, C, D, E, 20 μ m.) [Márkus és mtsai., 2009].

A továbbiakban három különböző megközelítéssel is megvizsgáltuk, hogy a szesszilis szövetben, illetve a központi vérsejtképző szervben darázsfertőzést követően mikor kezdődik a keringésbe kerülő lamellociták differenciálódása. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy központi vérsejtképző szerv a darázsszúratást követő 24 és 48 óra elteltével ép, morfológiai sajátosságai

nem változnak (46. Ábra A, B), 72 óra elteltével azonban az első lebenyek szétesnek, a hemociták a keringésbe kerülnek és csak a duzzadt második lebenyek láthatók (46. Ábra C). Az L1 (Atilla) molekulának a központi vérsejtképző szervben és a keringő hemocitákon történő kifejeződésének dinamikáját vizsgálva megállapítottuk, hogy a darázsszúrás követő 24 óra elteltével a lárvák nagy részének központi vérsejtképző szervében nem tapasztaltunk lamellocita differenciálódást (46. Ábra A), addig a keringésben megjelentek L1 (Atilla) pozitív vérsejtek [Honti és mtsai., 2010] (46. Ábra D). A darázsfertőzést követő 48 óra után a központi vérsejtképző szervben is megjelent néhány L1 (Atilla) pozitív hemocita (4. Ábra B nyíl) (10 lárvából 5-ben), azonban ebben az időpontban az összes megvizsgált lárva keringésében az L1 (Atilla) pozitív lamellociták száma megemelkedett (46. Ábra E).

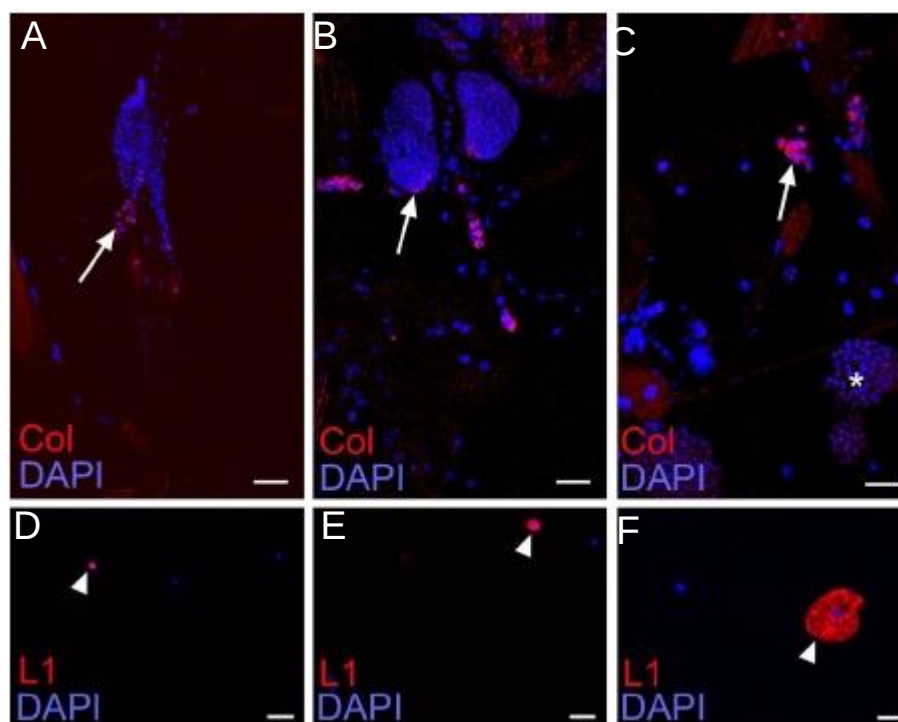


46. Ábra. Az L1 (Atilla) molekula kifejeződése a központi vérsejtképző szervben és a keringő hemocitákban a darázsszúrás követően

A lymph gland és a keringő hemociták fenotípusa a *Hemese>GFP* lárvákban a darázsfertőzést követő 24 óra (A, D), 48 óra (B, E) és 72 óra (C, F) elteltével anti-L1 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal történő festést követően (piros). A lymph gland-ek konfokális Z stack felvételei (A, B, C) és ugyanazon állatok keringő hemocitáinak felvételei (D, E, F). A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék). A nyilak az anti-L1 ellenanyaggal festett keringő lamellocitákat mutatják, a csillag egy megduzzadt másodlagos lebenyt jelöl. (Méret jelzés: 20 μ m) [Márkus és mtsai., 2009].

Mivel a központi nyirokszerv első lebenyéből is származnak lamellociták, az első lebenyt a Collier markerrel jelöltük (Crozier és mtsai., 2004) és az első lebenyben valamint a keringésben differenciálódó lamellocitákat az L1 markerrel követtük nyomon (47. Ábra A, B, C). A

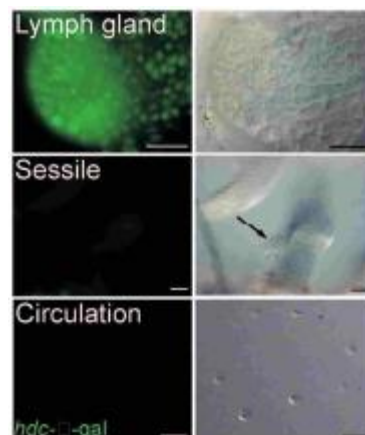
darázsfertőzést követő korai időpontokban, a megvizsgált 13 állat mindegyikében (47. Ábra, A), 48 óra elteltével 16 állatból 15-ben (47. Ábra B) változatlanul találtuk az első lebenyt, egy egyedben láttunk néhány L1 pozitív hemocitát. A darázsszűrés követő 72 óra elteltével azonban a lárvák kétharmadában a központi vérsejtképző szerv elülső lebenye felbomlott, csak a PSC Collier-t kifejező sejtjei és a csillaggal megjelölt megnagyobbodott másodlagos lebenyek voltak láthatók (47. Ábra C), míg a keringésben a darázsfertőzést követő minden vizsgált időpontban (24, 48 és 72 óra) L1 (Atilla)-t kifejező lamellocitákat találtunk (47. Ábra D, E, F, nyílhegyek).



47. Ábra. A központi vérsejtképző szerv és a keringő hemociták morfológiájának változása darázsszűrés követően

A központi vérsejtképző szerv (A, B, C) elülső lebenyének hátulsó részén található PSC-ben kifejeződő Collier fehérje (nyíl) festődése anti-Collier és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal (piros), valamint a keringésben lévő L1-et (Atilla) kifejező hemociták (nyílhegy) festése anti-L1 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal (piros) (D, E, F) a darázsszűrés követő 24. (A, D), 48. (B, E) és 72. (C, F) órában (Méret jelzés: 20 μ m) [Márkus és mtsai., 2009].

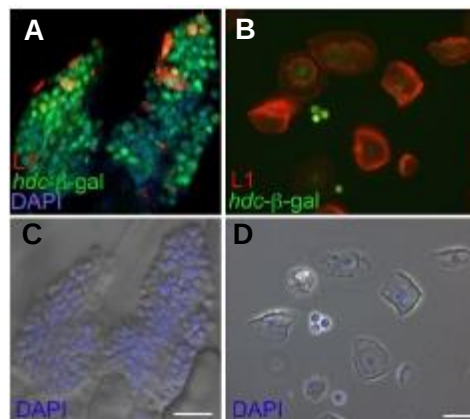
A lamellociták eredetének vizsgálata során harmadik megközelítésként egy olyan enhanszer csapdázó mutánst, a *hdc^{B5}* lárváit [Weaver és White 1995] használtunk, amelyben a kizárólag a központi vérsejtképző szerv eredetű hemociták fejezik ki a *hdc* expressziót jelző marker β -galaktozidáz gént, a szesszilis és keringő hemocitákban az enzim nincs jelen (48. Ábra).



48. Ábra A *headcase-LacZ* megnyilvánulása a *hdcB5* lárva központi vérsejtképző szervben, a szesszilis szövetben és a keringő hemocitákban

A *headcase-LacZ* kifejeződését nyúlban termeltetett anti- β -galaktozidáz és anti-nyúl Alexa Fluor 488 ellenanyagokkal tettük láthatóvá (zöld). (Méret jelzés: 10 μ m) [Márkus és mtsai., 2009].

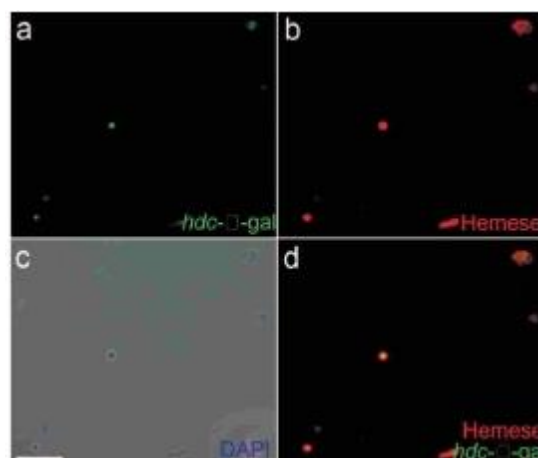
A darázsindukciót követő 24 és 48 óra elteltével a keringésben nem találtunk β -galaktozidázt kifejező hemocitákat, viszont 72 óra után, amikor a központi vérsejtképző szerv elülső lebenye már szétesett (49. Ábra, A, C), a keringésben lévő, L1 (Atilla) pozitív hemociták 8%-a és a plazmatociták 11%-a fejezte ki a β -galaktozidázt a sejtmagjában (49. Ábra, B, D).



49. Ábra. A *hdcB5* lárva és központi vérsejtképző szerve keringő hemocitái a darázs fertőzést követő 72 óra elteltével

(A, C) A *P[lacZ-un1]hdcB5* enhanszer csapdázó mutáns lárvák központi vérsejtképző szervének és (B, D) keringő hemocitáinak konfokális mikroszkópos képe. A *headcase-LacZ* megnyilvánulását anti- β -galaktozidáz és anti-nyúl Alexa Fluor 488 ellenanyaggal tettük láthatóvá (zöld), a lamellocitákat anti-L1 és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal festettük (piros). (C) A központi vérsejtképző szerv és a (D) keringő hemociták DAPI festése és fáziskontraszt képe egymásra illesztve. (Méret jelzés: 20 μ m) [Márkus és mtsai., 2009].

Ugyanezen sejtek anti-Hemese ellenanyaggal történő festődése igazolja azok hemocita identitását (50. Ábra).



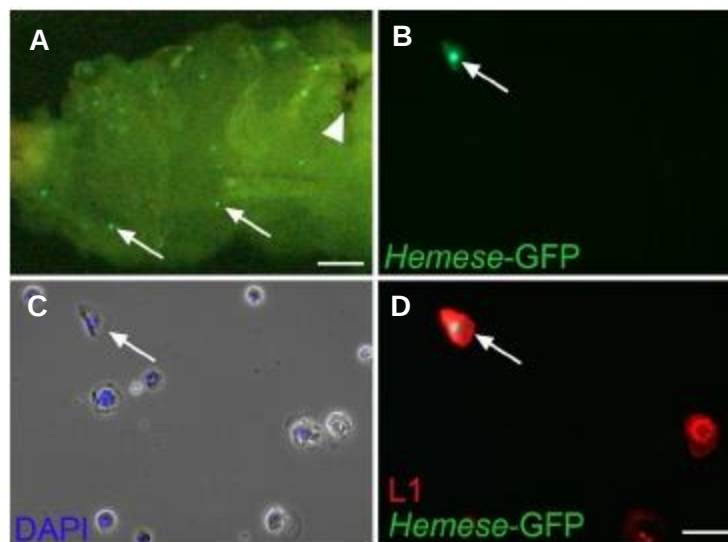
50. Ábra. A *hdcB5* lárv keringő hemocitái a darázsfertőzést követő 72 óra elteltével

(a) A *headcase-LacZ* kifejeződését anti-β-galaktosidáz és anti-nyúl Alexa Fluor 488 ellenanyaggal tettük láthatóvá (zöld), (b) a hemocitákat anti-Hemese és anti-egér Alexa Fluor 568 ellenanyagokkal festettük (piros). (c) A keringő hemociták DAPI festése és fáziskontraszt képe egymásra illesztve. (d) Az a és b kép egymásra illesztve. (Méret jelzés: 50 μm) [Márkus és mtsai., 2009].

Az enhanszer csapdázó *hdcB5* mutáns lárv hemocita kompartmentumainak vizsgálata során kapott eredményeink azt mutatják, hogy a darázsfertőzött lárvákban a keringésébe kerülő hemociták csekély hányada származik a központi vérsejtképző szervből és ezek a sejtek csak a fertőzés késői szakaszában járulnak hozzá a keringő hemocita populációhoz.

Az egymástól alapvetően különböző indirekt megközelítéssel végzett, a lamellociták eredetének feltárására irányuló valamennyi kísérletünk eredménye azt sugallta, hogy a lamellociták a szesszilis szövetből is kialakulhatnak, és előbb kerülnek be a keringésbe, mint a központi vérsejtképző szervből származó lamellociták.

A lamellociták szesszilis eredetének nyomon követésére egy direkt megközelítést is alkalmaztunk. A *Hemese>GFP^{nls}* lárv poszterior részén az epidermisz alatt lévő poszterior vérsejtképző szövetből GFP-t kifejező szesszilis hemocitákat izoláltunk és azokat fluoreszkáló hemocitákat nem tartalmazó Oregon R lárvákba transzplantáltunk. Ez a megközelítés lehetővé tette a GFP-t kifejező szesszilis eredetű sejtek direkt azonosítását az Oregon R lárvában (51. Ábra A nyíl). Az Oregon R lárvákba transzplantált zölden fluoreszkáló hemociták a lárv kutikuláján keresztül is jól láthatóak voltak (51. Ábra, A). A transzplantációt követő 72 óra elteltével a lárvákból hemocitákat gyűjtöttünk és a keringő hemociták L1 kifejeződését vizsgáltuk (51. Ábra, D). A vad típusú Oregon R lárvában a transzplantációt követő 72 óra elteltével a GFP-t (51. Ábra, B nyíl) és lamellocita specifikusan megnyilvánuló L1 (Atilla) molekulát együttesen kifejező sejteket is találtunk (51. Ábra, D), ami egyértelműen bizonyítja, hogy a *Hemese>GFP^{nls}*-t kifejező szesszilis sejtekből lamellociták is differenciálódnak az Oregon R recipiens lárvában; a transzplantált lárvában talált 53 zölden fluoreszkáló sejtől 15 az L1(Atilla) molekulát is kifejezte és ezek nagy része lamellocita morfológiájú, nagyméretű kiterült hemocita volt. A transzplantált sejtek eredetileg nem fejezték ki az L1 (Atilla) fehérjét, viszont a lárv szúrása elegendő ingert jelentett a lamellociták képződésének kiváltásához [Márkus és mtsai., 2005].



51. Ábra. Vad típusú Oregon R lárvába transzplantált *Hemese>GFPnls*-t kifejező szesszilis hemociták morfológiája

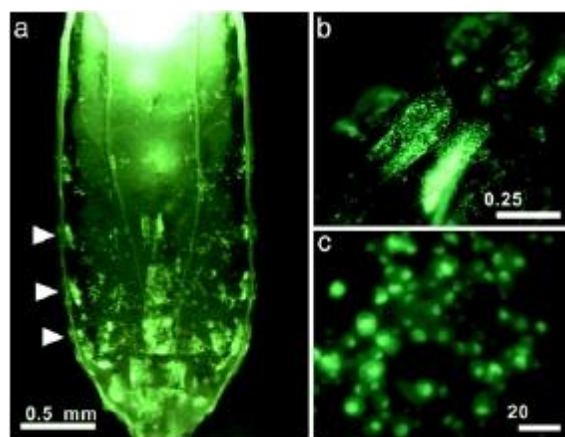
(A) Az Oregon R lárvába transzplantált *Hemese>GFPnls*-t kifejező szesszilis hemociták magjai zölden fluoreszkálnak a befogadó Oregon R lárvában (nyilak). A nyílhegy a transzplantációval előidézett sérülés melanizálódását jelöli. (B) A transzplantált lárv keringéséből gyűjtött hemociták egy része kifejezi a GFP-t (nyíl) és az (D) L1 (Atilla) molekulát (nyíl). (C) A hemociták sejtmagjainak DAPI festése (kék). (Méret jelzés: A 100 μ m, B, C, D 20 μ m) [Márkus és mtsai., 2009].

A *Drosophila* lárvá központi vérsejtképző szervét eddig a lamellociták kizárólagos forrásának tekintették [Lanot és mtsai., 2001, Sorrentino és mtsai., 2002, Evans és mtsai., 2003, Crozatier és mtsai., 2004, Jung és mtsai., 2005, Crozatier és Meister 2007, Krzemienet és mtsai., 2007]. Eredményeink szerint azonban a lárv testüregének epidermiszéhez tapadt szesszilis hemociták szintén vérsejtképző kompartmentumként funkcionálnak. Az immun indukciót követően a keringésben már akkor megjelennek lamellociták, amikor a központi vérsejtképző szerv még teljesen intakt állapotban van. A GFP-vel jelölt szubepidermális szesszilis hemociták transzplatációjával pedig direkt módon is sikerült igazolnunk, hogy a központi vérsejtképző szerven kívül, a lárvá kutikulájának falához tapadó szesszilis hemocitákból is differenciálódhatnak lamellociták, melyek a keringésbe kerülve időben megelőzik a központi vérsejtképző szervben differenciálódó lamellociták megjelenését.

3.3.3. A hemocita aktiválódás szabályozásának útjai

A *Drosophila* lárvákban a parazitoid darazsak petéi hemocita proliferációt és a lamellociták differenciálódását váltják ki. A lamellociták differenciálódását szabályozó aktivációs utak térképezésére az *UAS-GAL4* rendszer [Duffy 2002] alkalmazásával elsőként, hemocita specifikus aktiváló/gátló rendszer alapját képező hemocita specifikus meghajtó elemet hoztunk létre. Az elem segítségével jelátviteli útvonalakban szerepet játszó gének expresszióját módosítottuk, majd jellemeztük a hemociták fenotípusában bekövetkező változásokat.

A hemociták jelátviteli útvonalaiban szerepet játszó gének hemocitákban történő túltermeléséhez először egy hemocita specifikus meghajtó elemet hoztunk létre a lárvá összes hemocitájában megnyilvánuló *Hemese* gén (ld. 3.2.1. fejezet) upstream régiójának felhasználásával. Az upstream régiót az élesztő *GAL4* génnel fuzionáltattuk, majd *Drosophilába* juttatva olyan *Hemese>GAL4* transzgenikus vonalat hoztunk létre, mely a hemociták fenotípusának könnyebb meghatározása érdekében a sejtmagban kifejeződő GFP-t kódoló *P[UASGFP.nls]8 GFP* riporter gént is hordozza (*Hemese>GFPnls*), így a keringő és a szesszilis hemociták az élő lárvá kutikuláján keresztül is vizsgálhatók (52. Ábra). A lárvá epidermisze alatt a szegmentek mentén kitapadt szesszilis hemociták, valamint a lárvá posterior végén látható posterior hematopoetikus szövetben csoportosuló hemociták morfológiailag a keringő hemocitákhoz hasonlítanak. A *Hemese>GAL4* meghajtó elem a *Hemese* gén endogén kifejeződési mintázatától eltérően a központi vérsejtképző szervben gyengén nyilvánul meg és a keringő hemocitáknak kb. 80%-ában aktív, ami azzal magyarázható, hogy a *Hemese>GAL4* konstrukció valószínűleg nem tartalmazza a *Hemese* gén teljes szabályozó régióját. A *Hemese>GAL4*-el meghajtott transzgén a hemocitákon kívül ektópikusan kifejeződik még a nyálmirigyben és a középbél egyes szakaszaiban is. Ehhez hasonló jelenséget egyéb *GAL4* konstrukciók esetében is megfigyeltek [Duffy 2002, Gerlitz és mtsai., 2002], amelyet a *Hemese* esetében valószínűleg a vektorban található *hsp70* gén maradék promóter aktivitása idézi elő.



52. Ábra. A GFP fehérje kifejeződése a *Hemese>GFPnls* élő lárvá hemocitáiban

- (a) Erős GFP kifejeződés látható a *Hemese>GFPnls* lárvá poszterior részén szegmentálisan elhelyezkedő szesszilis hemocitákban (nyílhegyek).
 (b) Poszterior hemocita csomó és
 (c) Szesszilis hemociták [Zettervall és mtsai., 2004].

Munkánk során a *Drosophila* hemocitáinak aktiválásában résztvevő jelátviteli útvonalakat, valamint a *Drosophila* lárva hemocitáinak proliferációját és a lamellociták differenciálódását szabályozó géneket kívántunk azonosítani. Ehhez ötvenhét UAS transzgént hordozó törzset választottunk ki, amelyeket a rekombináns GFP-t expresszáló *Hemese>GAL4* vonallal kereszteztük és az utódokban a hemocita számot és a lamellocita differenciálódást vizsgáltuk. A 3. Táblázatban bemutatott konstrukciók voltak azok, amelyek kísérleteink szerint a szülői kontrollokhoz képest hemocita fenotípus változást okoztak.

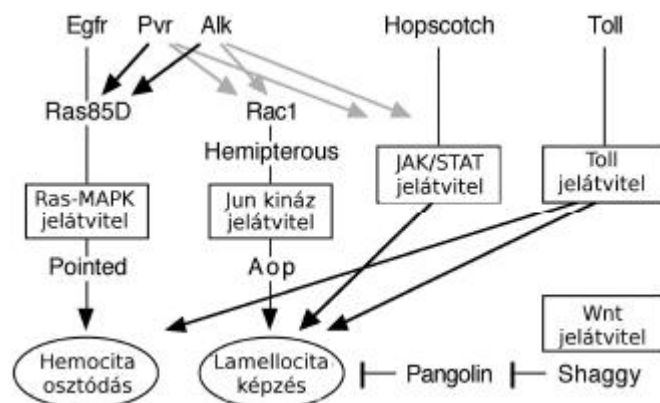
3. Táblázat.

Hemocita fenotípust okozó konstrukciók

Gén	Konstrukció	Típus	Prolif.	Lam.	CRC.	Megjegyzés
<i>Alk</i>	<i>P[UAS-Alk]</i>	WT	+	+	0	
	<i>P[UAS-Alk.ACT]</i>	CA	+	0	0	
<i>aop</i>	<i>P[UAS-aop.ACT]</i>	CA	+	+	+	Melanotikus göbök
<i>Egfr</i>	<i>P[UAS-Egfr.B]32-26-1</i>	WT	+	0	0	
<i>hep</i>	<i>P[UAS-hep.CA]</i>	CA	0	+	0	Melanotikus göbök
<i>hop</i>	<i>P[UAS-hop.Tum]</i>	CA	0	+	0	Melanotikus göbök
<i>pan</i>	<i>P[UAS-pan.dTCF.ΔN]4</i>	DN	+	+	0	Melanotikus göbök
<i>pnt</i>	<i>P[UAS-pnt.P1]</i>	WT	+	0	0	Melanotikus göbök
<i>Pvr</i>	<i>P[UAS-Pvr.ε]</i>	CA	+	+	0	Melanotikus göbök
	<i>P[UAS-Pvr.DN]</i>	DN	-	0	0	
<i>Rac1</i>	<i>P[UAS-Rac1.L]</i>	WT	+	+	0	Melanotikus göbök
	<i>P[UAS-Rac1.N17]1</i>	Mut	0	*	-	Sokmagvú sejtek
	<i>P[UAS-Rac1.V12]</i>	Mut				Halálos
<i>Ras85D</i>	<i>P[UAS-Ras85D.V12]TL1</i>	WT	+	0	0	Melanotikus göbök
<i>sgg</i>	<i>P[UAS-sgg.S9A]MB14</i>	WT	0	+	0	Melanotikus göbök
<i>Toll</i>	<i>P[UAS-Tl.10b:11]</i>	CA	+	+	0	Melanotikus göbök

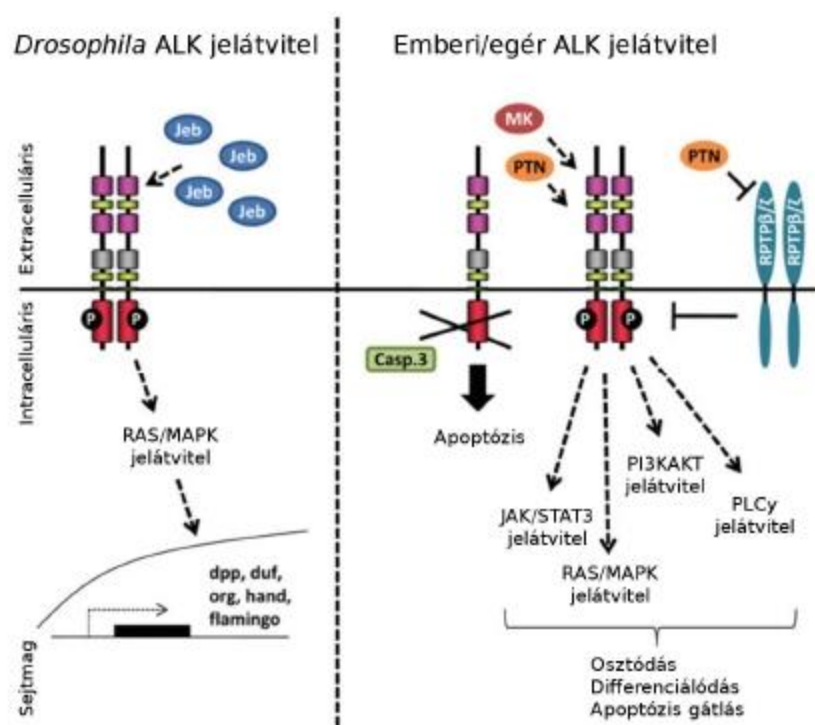
Prol. proliferáció; Lam. lamellociták; Crys., kristálysejtek; WT, vad típus; CA, állandóan aktív; DN, domináns-negatív; Mut, más mutáns; +, növekedés; 0, nincs változás; -, csökkenés; (+), alacsony penetranciájú növekedés*; Sok magvú sejtek, amelyek nem fejeznek ki lamellocita specifikus marker molekulákat. *aop*, anterior open; *alk*, anaplastic limfóma kináz; *alk-CA*, állandóan aktív anaplastic limfóma kináz; *Egfr*, Epidermalális növekedési faktor receptor; *hep*, *hemipterous*; *hop*, *hopscoch*; *pnt*, *pointed*; *Pvr*PGF és VGF-Receptor Related; *Rac1*, kis GTP-áz; *Ras*, Ras oncogén; *sgg*, shaggy; *Tl.10b*, *Toll*_{10b} [Zettervall és mtsai., 2004].

Vizsgálataink megerősítették azt a korábbi megfigyelést, mely szerint a Toll és a JAK/STAT útvonal szerepet játszik a lamellociták differenciálódásában [Hanratty és Dearolf 1993]. Elsőként igazoltuk, hogy két tirozin kináz receptor, az *Alk* és a *Pvr*, továbbá a wingless szignalizáció két negatív regulátora, a Shaggy és a Pangolin, továbbá a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) szignalizációs útvonalban szerepet játszó további hét gén is szerepet játszik ebben a folyamatban (53. Ábra).



53. Ábra A *Drosophila* lárva hemocitáinak proliferációját és differenciálódását a következő gének és jelátviteli útvonalak befolyásolják [Zettervall és mtsai., 2004.]

A *Drosophila* Alk [Lorén és mtsai. 2001] az emberi anaplastic lymphoma kinase (Alk) homológja, melyet a human NPM-ALK 2;5 kromoszóma transzlokáció kapcsán azonosítottak, és amely összefüggést mutat a non-Hodgkin's limfómákban megfigyelhető malignus transzformációkhoz vezető hemocita proliferáció és differenciálódás változásaival [Morris és mtsai., 1994; Kuefer és mtsai., 1997].



54. Ábra. A *Drosophila* és a humán/egér Alk molekulák által közvetített jelátviteli útvonal [Palmer és mtsai., 2009. nyomán].

Eredményeink szerint az Alk *Drosophila* hemocitákban történő ektópikus expressziója hasonló következményekkel jár, azaz a hemociták drámai fenotípus-változásán kívül tumorok képződése is megfigyelhető. A *Drosophila* és a humán/egér Alk molekulák által közvetített jelátviteli útvonalat az 54. Ábrán mutatjuk be. Bár az Alk fehérje jelenlétét a hemocitákon ellenanyag-festéssel ki tudtuk mutatni, az *alk* mutáció embrió letális hatása miatt az *alk* funkcióját normál hemocitákban nem tudtuk megvizsgálni. Kísérleteink során a Pvr, a human platelet-derived growth factor (PDGF) vascular endothelial growth factor (VEGF) receptorok *Drosophila* homológjának, hemocitákban történő túltermeltetése a hemociták proliferációjának fokozódását váltotta ki. Ez a megfigyelés összhangban áll Munier és munkatársai eredményeivel, akik nemcsak kimutatták a Pvr fehérje jelenlétét a hemocitákon, hanem ligandját, a Pvf2-t, túltermeltetve a cirkuláló hemociták számának emelkedését tapasztalták [Munier és mtsai., 2002]. A Pvr és Alk hemocitákban történő túltermeltetése nemcsak a hemociták számának emelkedését okozta, hanem a hemociták lamellocitákká történő differenciálódását is kiváltotta. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy ezek a tirozin kináz receptorok más jelátviteli útvonalakat is aktiválhatnak. Elképzelhető hogy a Pvr és Alk kinázok ugyanazokat a molekulákat foszforilálják, mint a *Drosophila* JAK homolog Hopschoch, hiszen a JAK/STAT útvonal *hopscotch^{Tum}* [Hanratty és Dearolf 1993] túltermeltetésével történő aktivációja élénk lamellocita differenciálódást vált ki. Egy másik lehetőség, hogy a Pvr és Alk a Jun specifikus MAPK útvonalat aktiválja, hiszen a *Drosophila* Jun kináz kináz Hemipterus aktivált formájának túltermeltetése erős lamellocita fenotípust indukál, míg a Jun kináz útvonalat aktiváló vad típusú Rac1 csak kisebb mértékű lamellocita differenciálódást okoz.

A *Drosophila* Anterior open (Aop), melyet gyakran Yan-nak is neveznek egy ETS faktor, mely transzkripció represszorként működve gátolja a differenciálódási folyamatokat, ezáltal verseng az aktiváló szereppel bíró Pointed molekulával. Az Aop-t a fő citoplazmatikus jelátviteli útvonal, a Sevenless/Ras/MAPK modulálja, melynek bonyolult kaszkád reakciói végül a Pointed aktiválódásához és az Aop inaktiválódásához vezet. A kísérleteinkben használt aop.ACT mutánsban az összes lehetséges MAPK foszforilációs hely mutációt szenvedett, ezért a Pointed konstitutív represszorként működve anti-proliferatív hatást várunk. Ezzel szemben e mutáns esetében vizsgálataink során jelentős lamellocita differenciálódást és hemocita proliferációt tapasztaltunk. Mivel az Aop a Ras/MAPK útvonalon kívül a Jun kináz jelátviteli útvonal is szabályozza, lehetséges, hogy különböző MAPK-k szabályozzák azt a nagyon érzékeny egyensúlyt, amely végül a két EST faktor eltérő foszforációján keresztül a hemociták proliferációjához vagy lamellociták differenciálódásához vezet [Palmer és mtsai., 2009].

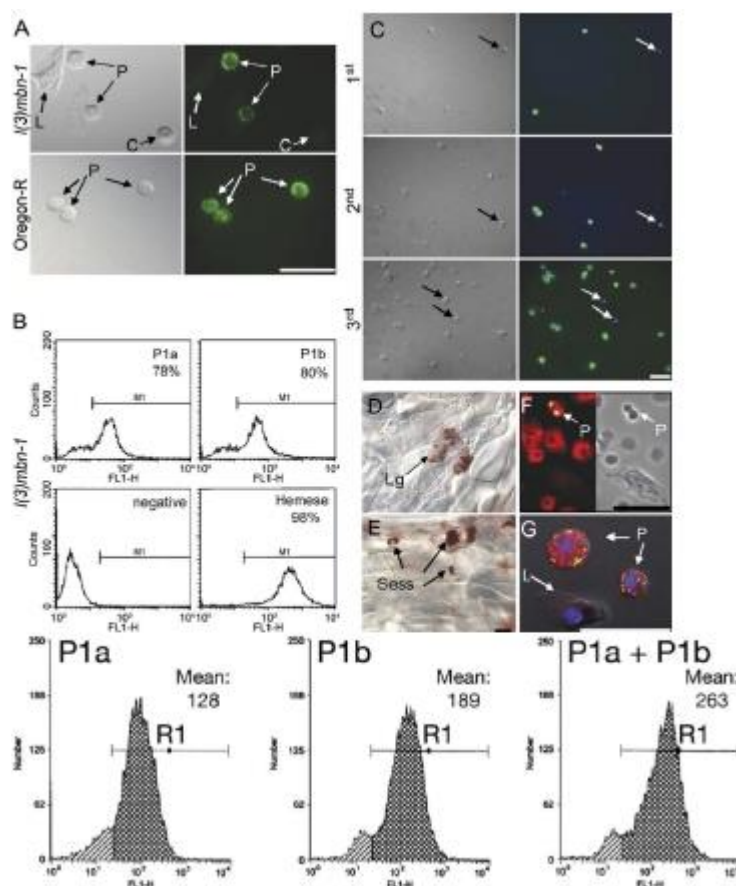
Kísérleteink során lamellocita differenciálódást tapasztaltuk továbbá a human Ternary complex faktor (TCF) transzkripció faktor *Drosophila* homológja, a Pangolin domináns negatív formájának vizsgálata, valamint a β -catenin homológ Armadillo negatív regulátora, a Shaggy esetében. Bár a Shaggy konstrukció vizsgálata esetében kisebb és nagyobb szórással bíró lamellocita szám növekedést tapasztaltunk, ezek az eredmények arra utalnak, hogy a wingless jelátviteli útvonal a lamellociták differenciálódásának negatív regulátora.

Kísérleteink eredményeiből egyértelműen arra következtethetünk, hogy a *Drosophila* lárvában a hemociták számát és a lamellociták differenciálódását egymástól független folyamatok szabályozzák. Bár a lamellociták differenciálódását elsősorban a receptor tirozin kinázok által képviselt Ras/MAPK jelátviteli útvonal irányítja, ez a folyamat olyan összetett módon zajlik, hogy egyéb, elsősorban a citokinek termelődéséért felelős jelátviteli útvonalak is befolyásolhatják.

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

3.4.1. A *nimC1* gén azonosítása és szerepe a sejt-közvetítette immunválaszban

A *Drosophila* lárva hemocitáinak túlnyomó többsége a mikroorganizmusok bekebelezésére képes plazmatocita. A keringő (55. Ábra A, B, C, H) és a szövetekhez tapadt szesszilis plazmatocitákon (55. Ábra E), valamint a központi vérsejtképző szerv elülső lebenyében (55. Ábra D) az anti-P1a és anti-P1b monoklonális ellenanyagink segítségével azonosítottuk egy transzmembrán fehérjét (55. Ábra A), a P1-et. A két ellenanyag a P1 fehérjén két különböző epitópot ismer fel (55. Ábra H). A P1 molekula a lárvális egyedfejlődés különböző szakaszaiban a keringő hemociták egy részén nyilvánul meg (55. Ábra C), melyek mitotikusan aktívak (55. Ábra F) és bekebelezik a környezetükben lévő baktériumokat (55. Ábra G). A P1 negatív lamellociták a baktériumok bekebelezésében nem vesznek részt (55. Ábra G nyíl L) és mitotikusan inaktívak. Kísérleteink során a késői harmadik stádiumú lárvákban P1 molekulát kifejező sejteket nem csak a központi vérsejtképző szerv elülső lebenyén találtunk (55. Ábra D), hanem a szesszilis szigeteken is (55. Ábra E).



55. Ábra. A P1 molekula szöveti lokalizációja

(A) A P1 molekula immunfestése az anti-P1a és anti-P1b ellenanyagok keverékével (anti-P1), valamint anti-egér FITC-tal az *l(3)mbn-1* hemocita túltermelő mutáns és vad típusú Oregon R lárvákból származó keringő hemocitákon. A nyílak a plazmatocitákat (P), a kristálysejteket (C) és a lamellocitákat (L) jelölik.

(B) Az *l(3)mbn-1* keringő hemocitáinak immunfestése és FACS analízise P1a (a hemociták 78%-a festődik), valamint P1b (a hemociták 80% festődik), ellenanyagokkal, továbbá indifferens IgG1 ellenanyaggal (negatív kontroll) és az anti-Hemese ellenanyaggal (a hemociták 98%-a festődik. A második ellenanyag anti-egér FITC..

(C) Első, második és harmadik stádiumú Oregon R lárvák keringő hemocitáinak immunfestése (ld. A) és DAPI sejtmagfestése acetonnal történt fixálás után. A nyílak a P1-negatív sejteket jelölik.

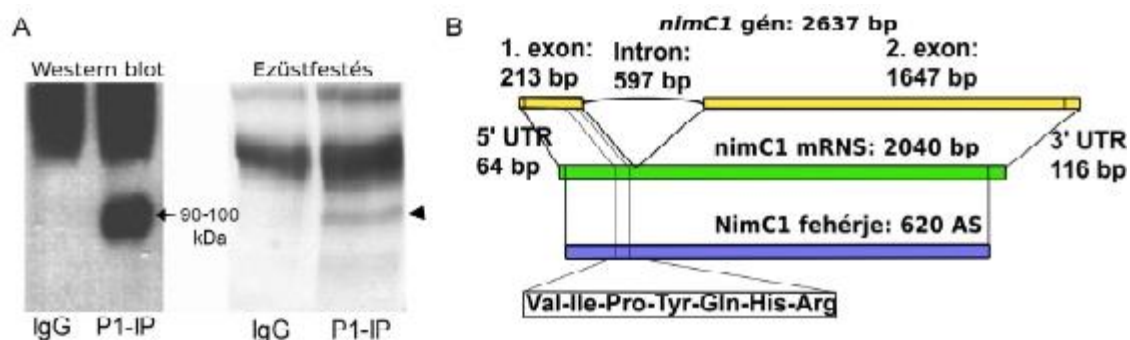
(D–E) Késői harmadik stádiumú Oregon R lárvák központi vérsejtképző szervének (D) és szesszilis hemocitáinak (E) immunfestése anti-P1 és anti-egér-HRPO-aminoetilkarbazol (AEC) felhasználásával.

(F) Az *l(3)mbn-1* lárvákból származó P1 molekulát kifejező hemociták (piros) mitotikus aktivitását (nyíl) anti-foszfohiszton és anti-egér FITC festéssel (zöld) mutattuk ki.

(G) Az *l(3)mbn-1* lárvák hemocitáit FITC-tal jelölt *S. aureus* baktériummal inkubáltuk, tárgylemezre tapasztás és fixálás után anti-P1 és anti-egér Streptavidin-Cy3-mal festettük (piros). A sejtmagokat DAPI-val tettük láthatóvá (kék). A képen a konfokális mikroszkóppal készített fluoreszcens és fáziskontraszt kép egybeolvasztva látható. (Méret jelzés: 20 μ m)

(H) Az élő hemociták festődése a P1a, P1b, illetve a P1 ellenanyagokkal (ld. B). A FACS analízis során mért mean fluoreszcencia intenzitás értéke a P1 esetében közel kétszeresére emelkedett, amely azt mutatja, hogy az anti-P1a és anti-P1b ellenanyagok két különböző epitópot ismernek fel a P1 molekulán [Kurucz és mtsai., 2007b].

A P1 molekulát kódoló gén azonosításához a P1 fehérjét Sepharose gyöngyökhöz kötött anti-P1 ellenanyaggal immunprecipitáltuk (56. Ábra A), majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézist követően a molekulatömegnek megfelelő gél darabot izoláltuk (56. Ábra A nyílhegy) és tartalmát tömegspektrometriai vizsgálatnak vetettük alá. Az analízis eredményeként kapott VIPYQHR aminosav szekvenciájú peptid a *Drosophila* egy eddig ismeretlen funkciójú génjét (CG8942) azonosította, melyet *nimródnak* (*nimC1*) neveztünk el. Erről a génről egy 620 aminosav hosszúságú, 65 kDa molekulatömegű fehérje képződik, amely N-terminális szignál peptidet, 548 aminosav hosszú sejten kívüli domént melyen 46 potenciális glikozilációs hely valószínűsíthető, egy transzmembrán régiót és egy 23 aminosav terjedelmű sejten belüli domént (56. Ábra B) tartalmaz. A Western blot analízissel meghatározott molekulatömeg a feltételezhető poszt-transzlációs módosítás, a glikoziláció miatt lehet magasabb, mint az aminosav összetételből számított érték (56. Ábra A).

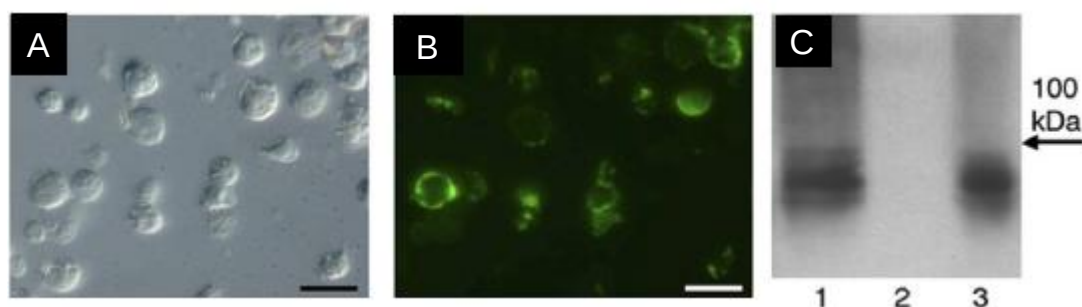


56. Ábra. A P1 molekula immunprecipitálása és a kódoló gén azonosítása

(A) Az *l(3)mbn-1* lárvák hemocitáiból készített kivonat immunprecipitált minta Western blot analízise és ezüst festése.

(B) A MALDI-TOF tömegspektrometriai analízissel meghatározott peptidszekvencia által meghatározott *nimC1* gén és transzkript [Kurucz és mtsai., 2007b].

Annak igazolására, hogy a P1 fehérje valóban a *nimC1* gén terméke, a P1 kifejeződést nem mutató, *Drosophila* embrionális makrofág eredetű Schneider 2 (S2) sejtvonal sejtjeit a kijavított (ld. Anyag és Módszer) *nimC1* cDNS felhasználásával készült *pMT-nimC1/V5-HisA* vektorral transzfektáltuk és a P1 fehérje kifejeződését anti-P1 ellenanyag immunfestéssel és Western blot analízissel vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a *nimC1* génről átíródott NimC1 fehérjét az anti-P1 ellenanyagok mind az élő sejtek plazmamembránjában (57. Ábra, A, B), mind a sejtekből készített kivonatban (57. Ábra, C) felismerték. Ez azt jelenti, hogy az anti-P1 ellenanyagokkal azonosított fehérje valóban a *nimC1* génről íródik át. Az, hogy a NimC1 molekulát kifejező S2 sejtek aggregátumokat képeztek arra enged következtetni, hogy a NimC1 molekula a sejt-sejt kölcsönhatások kialakulásában, a sejtadhézióban is szerepet játszhat.



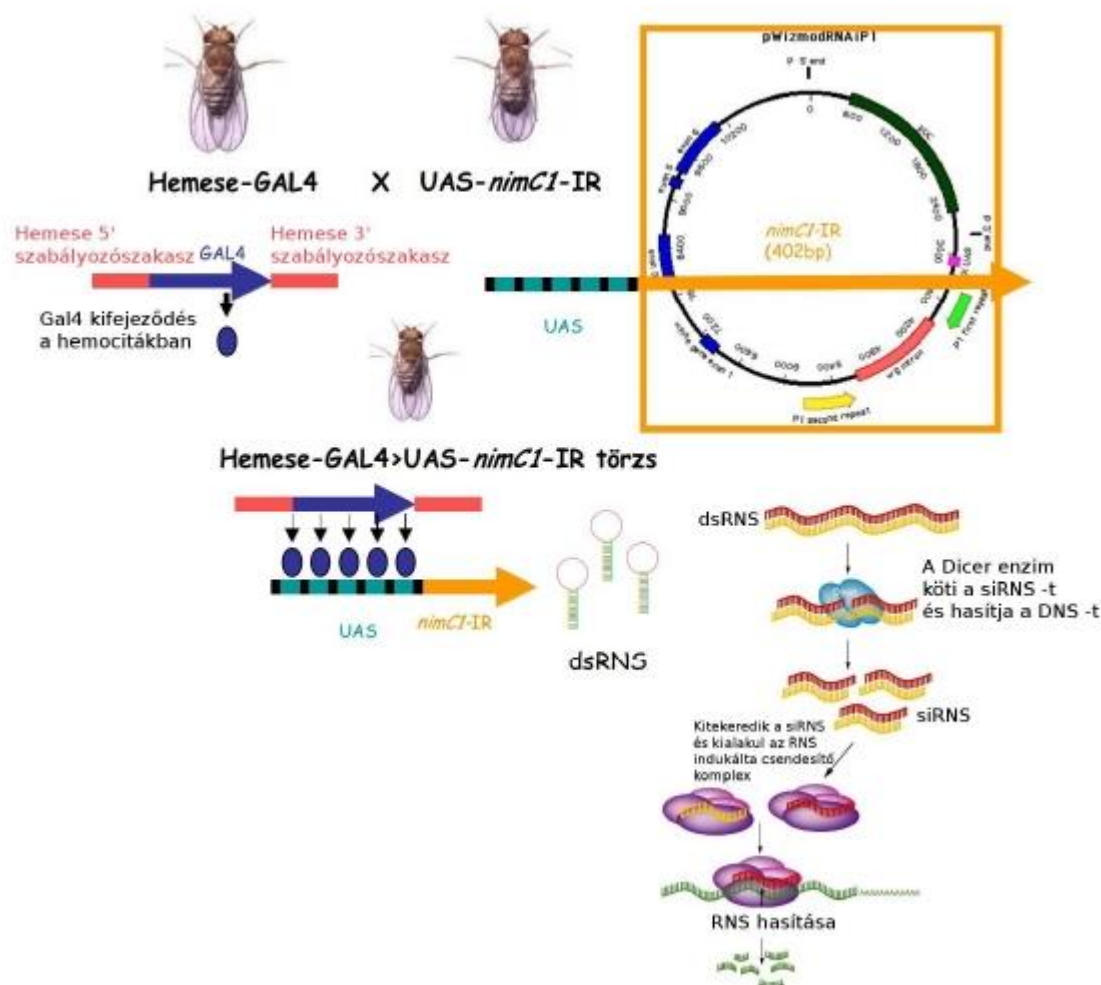
57. Ábra. A NimC1 fehérje kifejeztetése a *Drosophila* Schneider 2 (S2) sejtvonalban

(A) A *pMT-nimC1/V5-HisA* vektorral transzfektált S2 sejtek Nomarski-optikával készült felvétele és (B) a NimC1 fehérje indirekt immunfluoreszcencia festése anti-P1 és anti-egér FITC ellenanyagokkal. (Méret jelzés: 20 μ m) (C) A NimC1 fehérje kimutatása a *pMT-nimC1/V5-HisA* vektorral transzfektált S2 sejtekből Western blot analízissel, anti-P1 és anti-egér HRPO ellenanyagokkal. Az 1. és 3. minta két, egymástól független transzfekcióból származó S2 sejt kivonata, a 2. minta az üres vektorral transzfektált S2 sejtek kivonata [Kurucz és mtsai., 2007b].

A *nimC1* gén termékének RNS interferenciával történő csendesítésével (58. Ábra) három egymástól független transzformáns vizsgálata során is azt tapasztaltuk, hogy a *Hemese>nimC1-IR* konstrukciót tartalmazó lárvák fagocita sejtjein nagymértékben csökkent az P1 molekula kifejeződése (59. Ábra A, B), ami ugyancsak azt igazolja, hogy a P1 molekulát a *nimC1* gén kódolja.

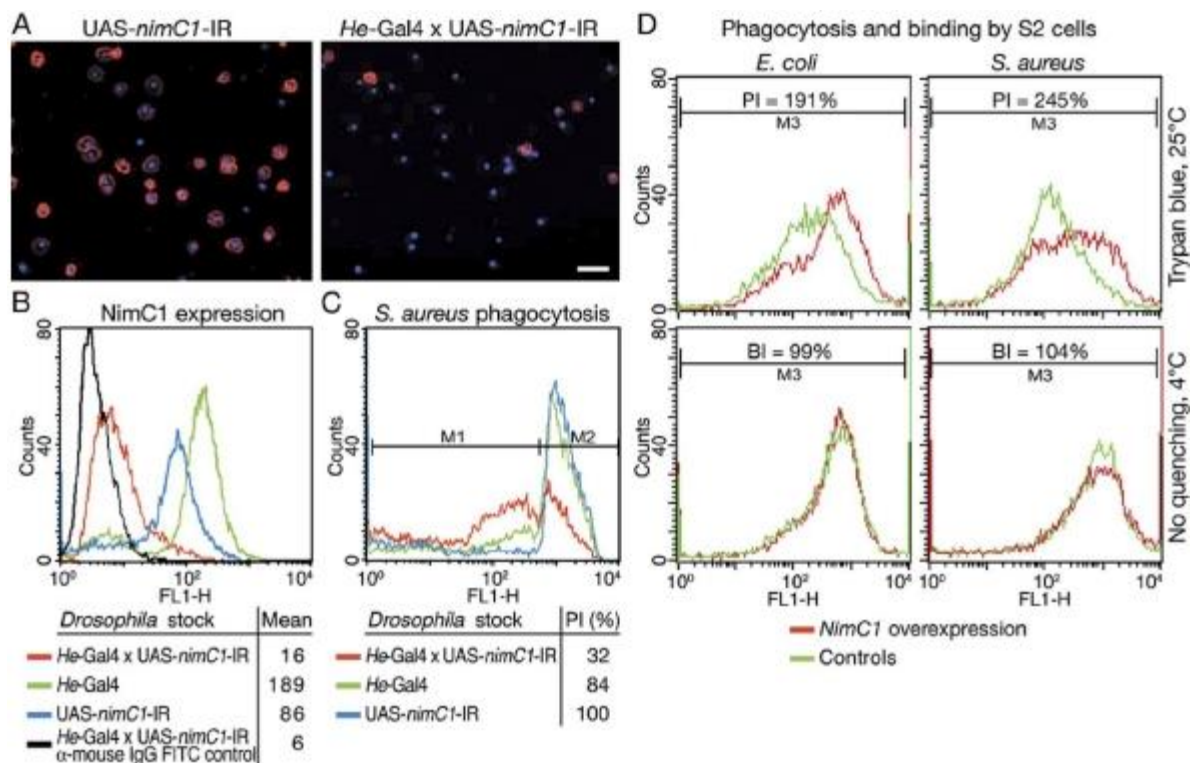
A NimC1 fehérje RNS interferenciával történő csendesítése során a hemociták *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) és *Escherichia coli* (*E. coli*) bekebelező képességét is megvizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy a NimC1 kifejeződésének gátlása jelentősen csökkentette a sejtek *S. aureus* bekebelező képességét, a fagocitózis index a kontroll állatokban mért érték egyharmadára esett (59. Ábra C) míg az *E. coli* fagocitózist szignifikánsan nem befolyásolta.

A NimC1 fehérjét S2 sejtekben kifejeztetve azt tapasztaltuk, hogy a NimC1 az S2 sejtek plazmamembránjában történő megnyilvánulásával (57. Ábra B) párhuzamosan az S2 sejtek *E. coli* és *S. aureus* fagocitáló képességét jelentősen fokozza (59. Ábra D). A bemutatott funkcióvesztés és funkciónyerés kísérletek eredményeiből arra következtettünk, hogy a NimC1 a baktériumok fagocitálásában jelentős szereppel bíró sejt felszíni molekula.



58. Ábra. A *NimC1* fehérje csendesítése RNS interferenciával

A *NimC1* csendesítéséhez a kettősszálú RNS-t (dsRNS) termelő transzgenikus törzset úgy állítottuk elő, hogy a 403 bp *nimC1* cDNS fragmentet mindkét orientációban, egy 1177 bp-os indifferent DNS-sel, a *wingless* gén intronjával elválasztva, beillesztettük egy módosított pUAST vektorba, majd azt P elem közvetítette transzformációval juttattuk be a vad típusú *Drosophila* *w¹¹¹⁸* ivarvonalába. A transzformánsokat a vektorban lévő white szemszín marker alapján szelektáltuk, majd a *Hemese>GAL4* transzgenikus vonallal kereszteztük. A *Hemese-GAL4>UAS-nimC1-IR* utódokban a *wingless* gén intronjának kivágódásával *nimC1* szekvencia specifikus kettősszálú, majd egyesszálú RNS molekulák képződnek melyek a RISC komplexel kapcsolódva szekvencia specifikusan ismerik fel és bontják le a *nimC1* génről átíródott mRNA molekulákat [Kurucz É]



59. Ábra. A NimC1 szerepe a baktériumok bekebelezésében

(A) Kettősszállú RNS interferenciával csendesített NimC1 molekula kifejeződésének fluoreszcens mikroszkópos és áramlási citometriai analízise *He*-GAL4xUAS-*nimC1*-IR (*He*>*nimC1*-IR) állatok hemocitáinak anti-P1 és biotinált anti-egér/Streptavidin-Cy3 vagy (B) anti-egér FITC festését követően. (Méret jelzés: 20 µm). A kettősszállú RNS interferencia konstrukciót tartalmazó *He*>*nimC1*-IR állatokban megfigyelhető néhány P1-et (NimC1) kifejező hemocita (A), ami azzal magyarázható, hogy a *Hemese*>*GAL4* meghajtó elem [Zettervall és mtsai., 2004], így az RNS interferencia is a hemociták kb. 80%-ban működik. Az áramlási citometriai analízis esetén (B) mért fluoreszcencia értékek különbsége mennyiségileg is meghatározza a szülői és RNS interferenciával csendesített *He*>*nimC1*-IR állatok hemocitáin kifejeződő NimC1 molekulát.

(C) FITC-tal jelölt *S. aureus* baktériumok fagocitózisának áramlási citometriai analízise a szülői törzsek (kék, zöld) és a kettősszállú RNS-sel kezelt, csökkent NimC1 molekulát kifejező hemocitákon (piros). A fagocitózis indexet (PI ld. [Kocks és mtsai., 2005]) úgy határoztuk meg, hogy a fagocitáló hemocitákat, azaz a kapuzott populációt (M2) megszoroztuk annak mean intenzitásával és a UAS-*nimC1*-IR kontroll értékét 100%-nak vettük.

(D) Kontroll S2 sejtek (zöld) és NimC1-t kifejező S2 sejtek (piros) FITC-tal jelölt *E. coli* és *S. aureus* fagocitózisa (felső hisztogramok), valamint FITC-tal jelölt *E. coli* és *S. aureus* kötése (alsó hisztogramok). A kontroll S2 sejteket és a NimC1-t kifejező sejteket egyazon transziens kifejezést eredményező vektorral transzfektáltuk, de ezek indukció hiányában nem fejezték ki a NimC1-et. A (PI) fagocitózis indexet és a (BI) kötési indexet ugyanúgy számítottuk ki, mint (C) a teljes sejtpopuláció (M3) figyelembe vételével, hiszen a baktériumok, ha nem is kerültek bekebelezésre, kötődtek a plazmatocitákhoz [Kurucz és mtsai., 2007b].

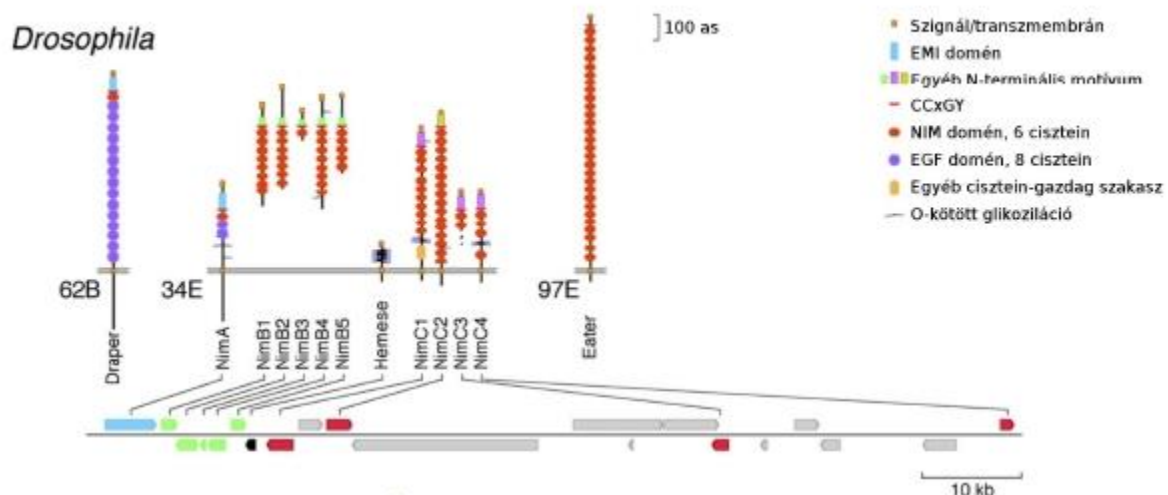
A NimC1 fehérje a kódoló génszekvencia alapján egy transzmembrán fehérje, melynek sejten kívüli régiójában tíz Epidermalis Növekedési Faktor (EGF)-hoz hasonló ismétlődő motívumot [Campbell és Bork 1993; Wouters és mtsai., 2005] tartalmaz, melyek mindegyike hat cisztein aminosavat hordoz, ezt egy cisztein gazdag régió, majd a transzmembrán domén és egy rövid sejten belüli domén (60. Ábra) követi. A CxPxCxxxCxNGxCxxPxxCxGxGY konszenzus szekvenciát tartalmazó EGF-hez hasonló ismétlődő motívumot (repeat) NIM repeat-nek neveztük

el. A *nimC1* gén a *Drosophila melanogaster* 2. kromoszómájának 34E régiójában helyezkedik el, közvetlenül a hemocita specifikus *Hemese* gén [Kurucz és mtsai., 2003] mellett, attól 5' irányban.

3.4.2. A *nimród* géncsalád azonosítása

A *nimC1* gén közelében további kilenc olyan gént azonosítottunk, amelyek NIM repeat-et tartalmazó fehérjét, valamint közvetlenül az első NIM repeat előtt egy konzervált CCxGY motívumot kódolnak. Hasonló szekvenciákat találtunk a *Drosophila melanogaster* fagocita sejteken megnyilvánuló Draper és Eater fehérjékben. A Draper az apoptotikus sejtek felismerésében és bekebelezésében vesz részt [Manaka és mtsai., 2004], az Eater fehérje [Kocks és mtsai., 2005] pedig a közelmúltban közölt eredményeink szerint a Gram pozitív baktériumok fagocitálásán kívül a hemociták szeszilis szövethez történő kitapadásában játszik fontos szerepet [Bretscher és mtsai., 2015].

A tíz *nimród* gén három típusba sorolható fehérjét kódol, melyek mindegyike szignál peptidet is tartalmaz (60. Ábra).



60. Ábra. A Nimród fehérje és géncsalád *Drosophila melanogaster*ben

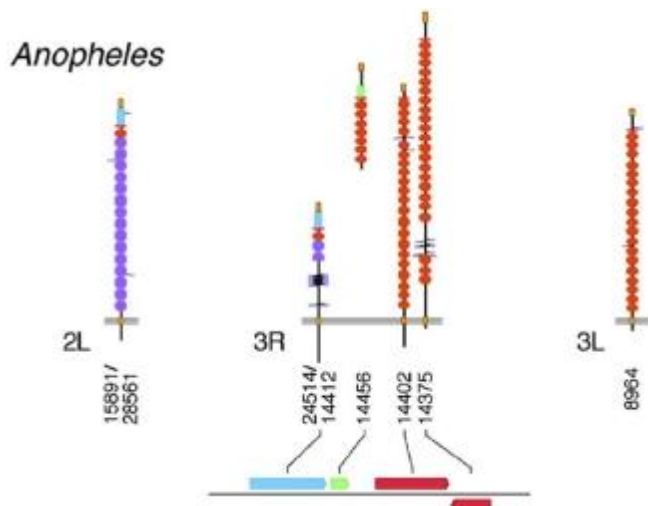
A *nimród* gének, a *nimA* (kék), *nimB1-5* (zöld) és a *nimC1-4* (piros) a *Hemese* gén (fekete) közelében csoportosulnak a *Drosophila melanogaster* 2. kromoszómájának 34E régiójában. A Nimród fehérjék, valamint az Eater és a Draper szerkezete [Kurucz és mtsai., 2007b].

A NimA fehérje egyetlen NIM repeat-et és kettő, 8 cisztein tartalmú EGF-hez hasonló domént tartalmaz. Sejten kívüli régiójában található még, egy EMI domén, amely a fehérjék közötti kapcsolatok kialakításában szerepet játszó motívum [Callebaut és mtsai., 2003]. A NimA transzmembrán doménjét egy viszonylag nagyméretű sejt belüli régió követi. A *nimB* gének által kódolt NimB1-5 fehérjék egytől nyolc NIM doménnel és az amino-terminális végükön egy kevésbé konzervált szekvenciával rendelkeznek. A NimB típusú fehérjéknek nincs transzmembrán régiójuk, viszont szignál peptiddel rendelkeznek, így elképzelhető, hogy az opszoninokhoz hasonlóan szolubilis formában, a hemolimfában keringve funkcionálnak. A

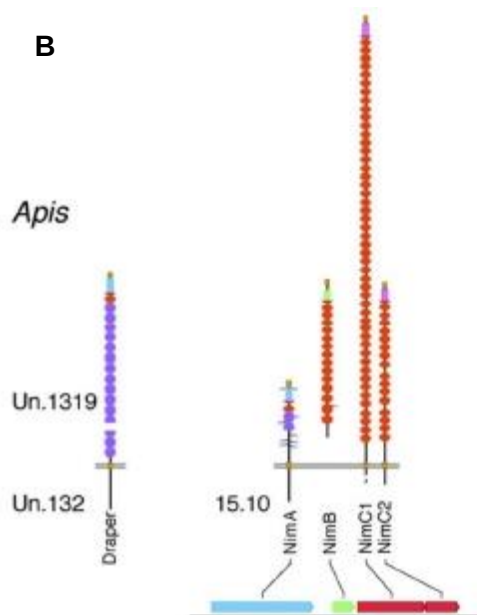
nimC1-4 gének, egy kivételtől eltekintve, transzmembrán fehérjéket kódolnak, melyek 2-16 NIM doménnel rendelkeznek.

A *nimród* géncsaládhoz hasonlóan a *nimród* homológ gének családba szerveződését találtuk egyéb rovarokban is, így pl. az *Anopheles gambiae*-ban [Holt és mtsai., 2002] (61. Ábra A) és az *Apis mellifera*-ban [The Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006] (61. Ábra B).

A

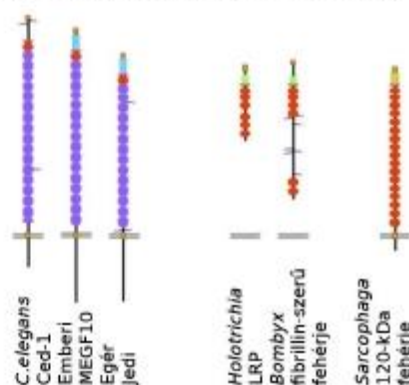


B



C

Egyéb fajokban található rokon fehérjék



61. Ábra. A Nimród homológok és rokon fehérjék összehasonlítása

(A) Az *Anopheles gambiae*-ben a második kromoszóma bal karján (2L) található a Draper homológot kódoló gén, a harmadik kromoszóma jobb karján (3R) egy *nimA* (kék), egy *nimB* (zöld) és két *nimC* (piros) gén alkotja a géncsaládot és a harmadik kromoszóma bal karján (3L) is egy *nimC*-típusú gén található. (B) *Apis mellifera*-ban egyetlen Draper típusú fehérjét kódoló gén található, a *nimród* gén családot itt egy *nimA* (kék), egy *nimB* (zöld) és két *nimC* gén (piros) képviseli (C) [Kurucz és mtsai., 2007b].

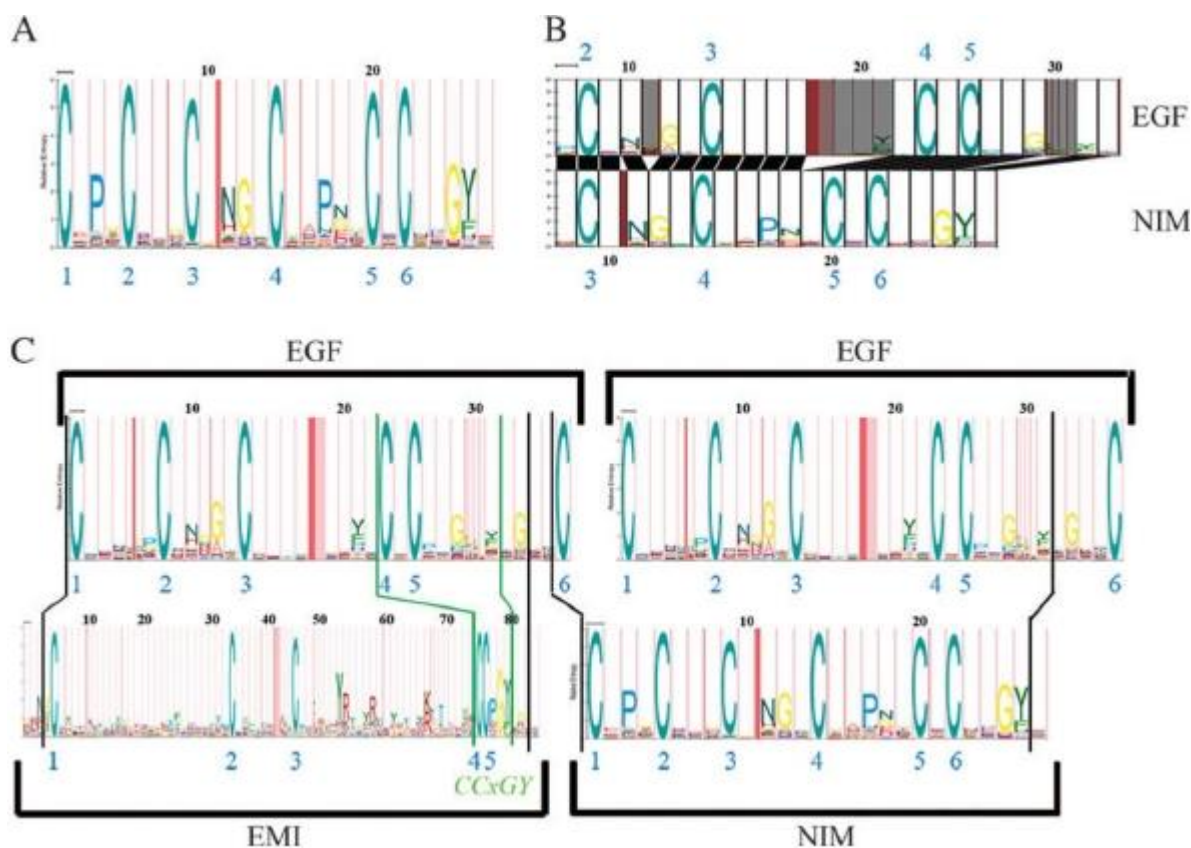
Ezekben a fajokban, a *nimród* géncsalád jóval kevesebb tagból áll. Az *Anopheles gambiae* és az *Apis mellifera* esetén is egyetlen *nimA*, egyetlen *nimB* és két *nimC1* gén alkotja a géncsaládot. *Hemese* gént ezek a géncsaládok nem tartalmaznak, *draper* homológokat viszont igen. Az *Anopheles gambiae* genomja a *nimród* géncsaládon kívül még egy *nimC* szerű gént kódol, amely feltehetően az *eater* homológja.

Az adatbázisokban történő szekvencia-keresések azt mutatják, hogy a CCxGY motívum, valamint egy vagy több NIM domén emlős szervezetekben is fellelhető, többek között az emberben is. Ezekről a fehérjékről kevés adat áll rendelkezésre, azonban az eddig megismert funkciók a mikroorganizmusok kötésével és a fagocitózissal kapcsolatosak.

A két legrészletesebben tanulmányozott, CCxGY motívumot és NIM domént tartalmazó fehérje az Eater és a Draper a baktériumok és az apoptotikus sejtek kötésével járul hozzá a fagocitózis folyamatához [Manaka és mtsai., 2004; Kocks és mtsai., 2005; Hashimoto és mtsai., 2009]. A *Caenorhabditis elegans* NimA-szerű CED-1 fehérjéje (61. Ábra C) szintén az apoptotikus sejtek felismerését végző receptor molekula [Mangahas és mtsai., 2005]. Hasonló funkcióval bírnak az emlősök genomjában található *ced-1* szerű gének által kódolt receptorok [Callebaut és mtsai., 2003], az emberben a MEGF10 és az egérben a Jedi (61. Ábra C). A *nimB* gének rokonai a *Bombyx mori* és a *Holotrichia diomphalia* fajokban is találhatóak [Matsunaga és Fujiwara 2002; Ju és mtsai., 2006].

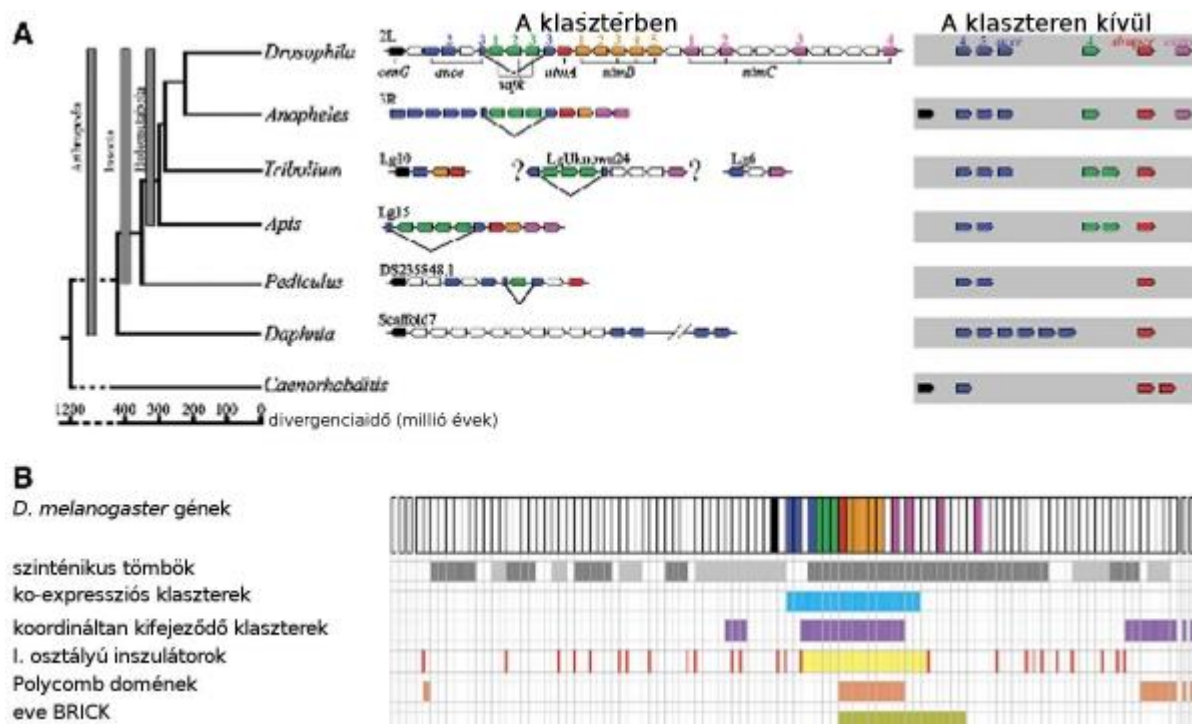
3.4.3. A NIM domén és a *nimród* géncsalád evolúciója

A Nimród fehérje- és géncsalád kialakulását a fehérje domének szintjén is megvizsgáltuk. 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. Ezért a parszimónia elve alapján, ami azt jelenti, hogy amennyiben egy jelenség egyszerű és bonyolult hipotézissel is magyarázható, célszerű az egyszerűbbet választani, azt feltételezzük, hogy az egyetlen NIM doménnel rendelkező Draper fehérje az ősi, és belőle alakultak ki a rovarokra jellemző több NIM domént tartalmazó Nimród fehérjecsalád tagjai. A Draper és a NimA fehérjék az N-terminális végükön a szignál peptidet követően egy EMI domént hordoznak, ezt követi a Nimród fehérjékre jellemző CCxGY motívum, majd a NIM domén. Több *Drosophila* faj Draper és NimA fehérjéiből Hidden Markov modellt (HMM) alkotva (62. Ábra A) szembetűnően hasonló eredményt kaptunk, mint két, egymás mellé helyezett EGF domén esetében (62. Ábra C). Az első EGF domén első három ciszteinje megfeleltethető az EMI domén három ciszteinjének, a negyedik és az ötödik ciszteinből származtatható a CCxGY motívum, míg a hatodik cisztein aminosav a második EGF domén első öt ciszteinjével alakítja ki a NIM domén hat ciszteinjét. A HMM ábrákon látható, hogy az erősen konzervált ciszteinnek között található gyengébben konzervált, elsősorban glicin, tirozin és aszparagin aminosavak segítenek az egyes NIM doménekben található ciszteinnek az EGF domén ciszteinjeinek megfeleltetésében (62. Ábra B). Ebből azt feltételeztük, hogy az EMI domén és a NIM domén két EGF doménből jött létre, inszerciók és deléciók eredményeként, megőrizve az EGF doménekre jellemző konzervált cisztein aminosavakat. E modell alapján a NIM domén és az EMI domén is módosult, új funkciót szerzett EGF doménnek tekinthető, amelyek egy több EGF domént tartalmazó fehérjében alakultak ki. A Nimród fehérjecsalád alapítója így minden bizonnyal egy Draper-típusú fehérje volt, amelyből a NIM domén duplikációival és az EGF domének delécióival alakultak ki a NimC, majd a transzmembrán domén deléciójával a NimB fehérjék. Szekvencia analízisünk alapján a NIM domén és az EMI domén valószínűleg két, szorosan egymás mellett található EGF doménből jöhetett létre (62. Ábra C).



62. Ábra A NIM domén felépítése és kialakulása [Somogyi és mtsai., 2008].

A *nimród* géncsalád a *Drosophila* immunválaszban fontos szerepet játszik, hiszen tagjai olyan fontos immunfolyamatokban résztvevő fehérjéket kódolnak, mint a baktériumok, vagy apoptotikus sejtek bekebelezése. A *nimród* gének 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. Ez arra enged következtetni, hogy a *Nimród* klaszterbe tartozó gének, a Centaurin gamma (*cenG*), Angiotensin converting enzyme (*ance*), a Vajk (*vajk*), valamint a Nimrod A (*nimA*), Nimrod B (*nimB*), és a Nimrod C (*nimC*), az evolúció során valamilyen szelekciós nyomás következtében egymással kapcsolatosan öröklődtek (63. Ábra) [Somogyi és mtsai., 2010]. A *vajk* géncsalád tagjairól a közelmúltban megjelent közleményünkben mutattuk be, hogy ezek a gének a szervezet első, mechanikai védelmi vonalát biztosító kutikuláris elemek kialakulásában töltenek be fontos szerepet [Cinege és mtsai., 2017].



63. Ábra. A Nimród klaszter genomi szerveződése [Somogyi és mtsai., 2010. nyomán]

(A) A különböző fajokban a *cenG* (fekete), *ance* (kék), *vajk* (zöld), a *draper* típusú *nimA* (piros), a *nimB* típusú (narancssárga), a *nimC* típusú (rózsaszín) és egyéb gének (fehér). (B) A gének sorrendje a kromoszómán a szinkódokkal, 12 *Drosophila* fajban konzervált szinténikus régiók [Bhutkar és mtsai., 2008], azok együttes kifejeződése [Spellman és Rubin 2002], a klaszterek szervezett megnyilvánulása a *Drosophila* fajokban [Mezey és mtsai., 2008], Class I inszulátor helyek [Negre és mtsai., 2010], polikomb fehérjéket kötő domének [Tolhuis és mtsai., 2006], Eve transzkripció faktor kötőhelyek [de Wit és mtsai., 2008].

3.4.4. A nimród gén- és fehérje család biológiai funkciójának vizsgálata

A *Drosophila melanogaster* fagocita sejtjein megnyilvánuló NIM domén tartalmú fehérjék a fagocitózis receptorok új családját alkotják. A *Drosophila* genomja a Nimród fehérjék mellett további NIM domént tartalmazó receptorokat is kódol, ezek a Draper, az Eater és a Six-microns-under (SIMU). A SIMU az apoptotikus sejtek eltávolítását végzi [Kurant és mtsai., 2008], a Draper az apoptotikus sejteken kívül [Manaka és mtsai., 2004], a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) baktérium sejt falában a lipoteichoic savat felismerő receptorként is funkcionál [Hashimoto és mtsai., 2009]. Az Eater fagocitózis receptor közvetlenül köti a natív Gram-pozitív *S. aureus* és *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) baktériumokat, viszont a Gram-negatív *E. coli*, *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) és *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) baktériumokat csak akkor képes megkötni, ha azok sejtmembránját a kationos cecropin A antimikrobiális peptid előzetesen megbontotta [Chung és mtsai., 2011].

3.4.4.1. A NimC1 fehérje baktériumkötésének vizsgálata

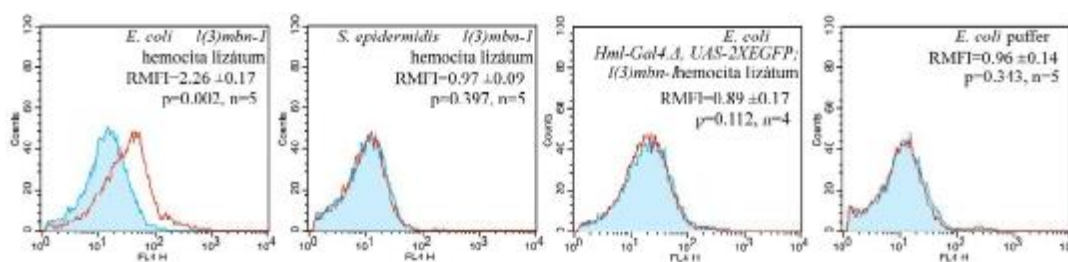
A 3.4.1. fejezetben bemutatott funkcióvesztéses és funkciónyeréses vizsgálataink eredményei szerint a NimC1 molekula a baktériumok fagocitálásában játszik szerepet, ezért a továbbiakban a Nimród fehérjék baktériumkötését vizsgáltuk, és ehhez egy új, indirekt immunfluoreszcencián és áramlási citometrián alapuló vizsgálati módszert dolgoztunk ki (64. Ábra) [Zsámboki és mtsai., 2013].



64. Ábra. A *Drosophila* fehérjék baktérium kötésének vizsgálatára kidolgozott mérési módszer elve

A vizsgálni kívánt baktériumokat hóvel elöltük, majd FITC-tal jelöltük. A *Drosophila* fehérjét kísérleteinkben az *l(3)mbn-1* mutáns lárvából származó hemociták lizátuma, illetve a rekombináns Nimród fehérjéket termelő Sf9 lepkesejt lizátuma tartalmazta, amit egy éjszakán keresztül a FITC-tal jelölt baktériummal, majd a hemocitákban megnyilvánuló NimC1 fehérjét felismerő anti-P1, vagy a rekombináns fehérjék FLAG epitópját felismerő anti-FLAG és anti-egér Alexa Fluor 633 ellenanyagokkal inkubáltunk. A FITC-tal jelölt baktériumokat áramlási citometriával, zöld fluoreszcenciájuk alapján azonosítottuk, majd a *Drosophila* fehérje baktériumokhoz történő kötődését anti-NimC1 (anti-P1) és az anti-egér Alexa 633 távoli vörös fluoreszcenciájának mérésével határoztuk meg. Az indirekt immunfluoreszcencia festések negatív kontrolljaként az anti-P1 ellenanyagokkal azonos izotípusú (IgG1) anti-L1 ellenanyagot használtuk [Zsámboki J.].

A NimC1 fehérje *E. coli* és *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) kötésének vizsgálata során azt találtuk, hogy a hemocita lizátummal kezelt és anti-P1 valamint anti-egér Alexa Fluor 633 ellenanyagokkal festett *E. coli* baktériumok fluoreszcencia intenzitása (65. Ábra A) az izotípus kontrollhoz képest (65. Ábra A) több mint kétszeresére emelkedett. Ebből arra következtettünk, hogy a hemocita lizátumban található NimC1 fehérje kötődik a Gram-negatív *E. coli*-hoz. A *S. epidermidis* esetében azt tapasztaltuk, hogy a baktériumsejtek távoli vörös fluoreszcenciája nem különbözik szignifikánsan az izotípus kontrolltól, azaz a NimC1 nem kötődik a Gram-pozitív *S. epidermidis*-hez (65. Ábra B). Biológiai negatív kontrollként a *Hml-Gal4.Δ,2XUAS-EGFP;l(3)mbn-1* törzs hemocitáit használtuk, erről a törzsről kimutattuk, hogy egy spontán háttér mutáció következtében az anti-P1 ellenanyagokkal a NimC1 fehérje nem mutatható ki [Honti és mtsai., 2013]. E törzs hemocitáival végzett baktériumkötési kísérletben azt találtuk, hogy az anti-P1 ellenanyagokkal festett minta fluoreszcencia intenzitása az izotípus kontrollhoz hasonló mértékű (65. Ábra B).



65. Ábra A NimC1 fehérje *E. coli* és *S. epidermidis* baktérium kötésének vizsgálata

Az *l(3)mbn-1* hemocita lizátummal inkubált *E. coli*, illetve *S. epidermidis* anti-P1 (piros) és izotípus kontroll anti-L1 (kék) elsődleges, valamint anti-egér Alexa Fluor 633 másodlagos ellenanyagokkal történő festést követő áramlási citometriás analízise. A baktériumkötés jellemzésére az anti-P1 ellenanyaggal festett baktériumokon mért fluoreszcencia intenzitás számtani középértékének (MFI_{NimC1}), valamint az anti-L1 ellenanyaggal festett baktériumokon mért fluoreszcencia intenzitás számtani középértékének (MFI_{Atilla}) a hányadosát választottuk ($MFI_{NimC1} / MFI_{Atilla}$), amit relatív fluoreszcencia intenzitásnak (RMFI) neveztünk el. A kapott MFI értékeket statisztikailag elemeztük és azt a kölcsönhatást fogadtuk el baktériumkötésnek, ahol a Student t-teszt eredménye $< 0,05$, vagyis az anti-P1 ellenanyaggal festett minta MFI értéke szignifikánsan különbözik az anti-L1 MFI értékétől. A harmadik hisztogram *Hml-Gal4.Δ, 2XUAS-EGFP; l(3)mbn-1* törzs hemocitáinak *E. coli* baktériumkötését, a negyedik a puffer kontrollt ábrázolja [Zsámboki és mtsai., 2013 nyomán].

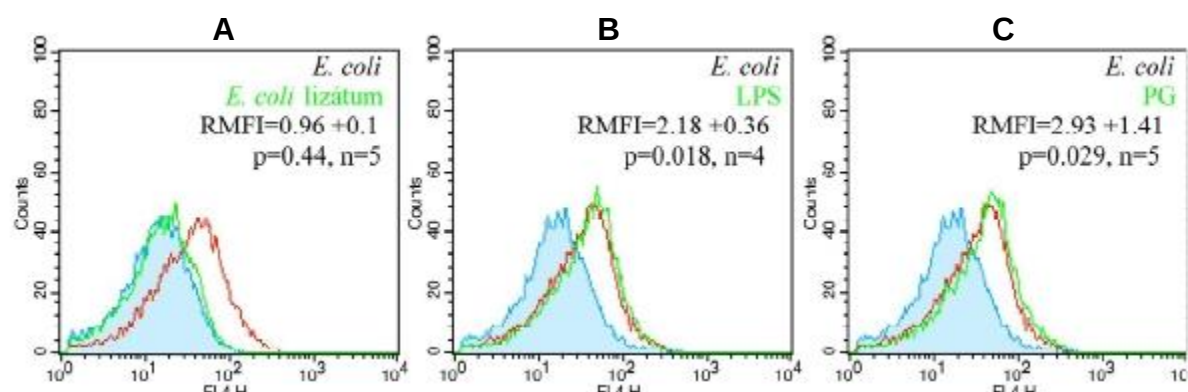
A továbbiakban megvizsgáltuk a NimC1 kötődését a Gram-negatív *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), *Xanthomonas campestris* (*X. campestris*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), valamint a Gram-pozitív *Bacillus cereus* var. *mycoides* (*B. cereus*), *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) és *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) baktériumokhoz és azt találtuk, hogy a NimC1 fehérje kötődik az általunk vizsgált összes Gram-negatív baktériumhoz, míg a vizsgált Gram-pozitív baktériumok közül, a *B. cereus*-t köti (4. Táblázat). A baktériumok Gram festődésük alapján történő osztályozása nem jelenti azt, hogy az egyes csoportok sejtfa azonos összetételű, hiszen pl. a *B. cereus* és *B. subtilis* baktériumokat a Gram festődésük alapján a Gram-pozitívok közé sorolták, viszont a peptidoglikánjukban diaminopimelinsavat tartalmazó peptidek találhatóak, így ebből a szempontból jobban hasonlítanak a Gram-negatív, mint az L-lizin tartalmú tetrapeptideket tartalmazó Gram-pozitív baktériumokra [Reith és Mayer 2011].

4. Táblázat. A NimC1 fehérje Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumkötése

	RMFI	p	n
Gram-negatív baktériumok			
<i>Escherichia coli</i>	2,260 ± 0,17	0,020	5
<i>Serratia marcescens</i>	2,403 ± 0,436	0,0002	4
<i>Xanthomonas campestris</i>	2,053 ± 0,603	0,010	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,867 ± 0,206	0,003	4
Gram-pozitív baktériumok			
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	1,463 ± 0,161	0,028	4
<i>Micrococcus luteus</i>	1,005 ± 0,104	0,493	4
<i>Bacillus subtilis</i>	1,195 ± 0,096;	0,130	4

A NimC1 fehérjéhez szignifikánsan kötődő baktériumokat piros színnel jelöltük (n: esetszám, student t teszt $p < 0.05$) [Zsámboki és mtsai., 2013 nyomán].

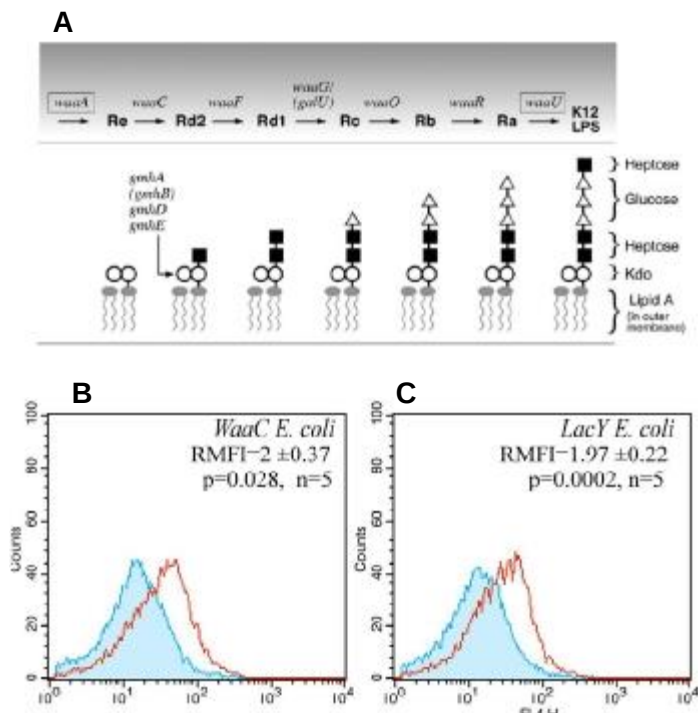
Miután beláttuk, hogy a NimC1 mind Gram-negatív, mind Gram-pozitív baktériumokhoz kötődik, meghatároztuk a baktériumokon felismert struktúrák alapvető biokémiai jellemzőit. Az *E. coli* baktériumokból készített kivonattal előkezeltük a NimC1 fehérjét tartalmazó hemociták kivonatát, majd ezt követően inkubáltuk FITC-tal jelzett *E. coli*-val. Az *E. coli* kivonattal történő előkezelés hatására drámaian csökkent a NimC1 baktériumkötő képessége (66. Ábra A zöld), tehát az *E. coli* kivonat valamely komponense verseng a NimC1 fehérjével a FITC-tal jelzett *E. coli* baktériumon lévő ligand molekuláért. Először a két legkézenfekvőbb baktérium sejtfal komponenst, a lipopoliszaharidot (LPS) és a peptidoglikánt vizsgáltuk meg, mint NimC1 ligand jelölteket, azonban sem az ultra tiszta LPS (66. Ábra B zöld), sem az ultra tiszta PG (66. Ábra C zöld) előkezelés nem csökkentette a NimC1 baktériumkötő képességét.



66. Ábra A NimC1 baktériumkötésének vizsgálata *E. coli* lizátum, LPS-dal vagy PG-nal történő előkezelést követően

(A) *E. coli* lizátummal, (B) LPS-dal (200 µg/ml) és (C) PG-nal (153 µg/ml) előkezelt hemocita lizátumokkal inkubált *E. coli* baktériumsejtek távoli vörös festődésének áramlási citometriai analízise a kompetitorok jelenlétében (zöld) valamint hiányában anti-P1 és anti-egér Alexa fluor 633 (piros), vagy az izotípus kontroll anti-L1 és anti-egér Alexa fluor 633 (kék) ellenanyagokkal történő festést követően [Zsámboki és mtsai., 2013 nyomán].

Csonkolt LPS molekulát bioszintetizáló funkcióvesztéses LPS mutáns *WaaC E. coli* (67. Ábra A, B) és a teljes hosszúságú LPS-t termelő *LacY E. coli* vizsgálata esetén (67. Ábra C) azt tapasztaltuk, hogy a NimC1 mindkét baktériumot kötötte, ami szintén arra utal, hogy a NimC1 molekulának nem az LPS a ligandja.

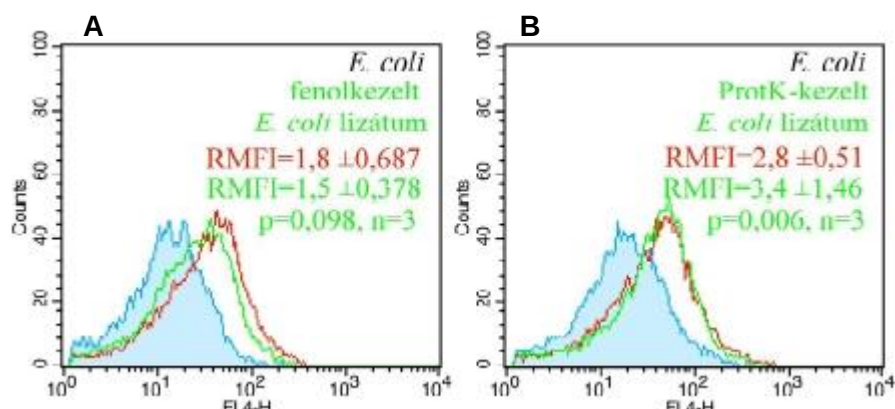


67. Ábra. A NimC1 kötődése csonkolt és normál LPS molekulát kifejező baktériumokhoz

(A) Az LPS molekula bioszintézisét katalizáló glikoziltranszferáz enzimek funkcióvesztéses mutánsaiban csonkolt LPS molekula képződik [Chen és Coleman 1993; Heinrichs és mtsai., 1998; Qimron és mtsai., 2006].

(B) A csonkolt LPS-ot termelő *WaaC E. coli* mutáns és a teljes LPS-ot bioszintetizáló *LacY E. coli* mutáns baktériumok festése anti-P1 (piros), vagy anti-L1 (kék) és anti-egér Alexa Fluor 633 ellenanyaggal a hemociták lizátumával történő kezelés után. Az inszerciós mutagenézissel előállított *WaaC* törzsben a *WaaC* gént egy kanamicin rezisztencia gént tartalmazó kazettával helyettesítették, míg az ennek kontroljaként használt (C) teljes hosszúságú LPS-ot termelő *LacY E. coli* törzs a kanamicin rezisztencia gént a laktóz-permeáz enzimet kódoló *LacY* génjében hordozza. [Zsámboki és mtsai., 2013 nyomán].

A NimC1 ligandjának további vizsgálata során a NimC1 kötőhelyekért versengő komponenst tartalmazó *E. coli* lizátumot fenollal precipitáltuk (68. Ábra A), illetve proteináz K emésztésnek (68. Ábra B), vetettük alá. Az ily módon fehérjementesített *E. coli* lizátumok már nem kompetáltak a NimC1 kötőhelyekért a baktériumokon, amiből arra következtettünk, hogy a NimC1 receptor egy fehérje természetű ligandot ismer fel. *Drosophilában* eddig még nem azonosítottak bakteriális fehérjét felismerő fagocitózis receptort. Bár a Draper fagocitózis receptor egyik ligandja a Pretaporter molekula fehérje természetű, ez a molekula nem baktériumokon, hanem az apoptotikus sejteken nyilvánul meg [Kuraishi és mtsai., 2009]. Gerincesekben viszont több olyan mintázat-felismerő receptort is ismerünk melyek a mikroorganizmusokon fehérje ligandokat ismernek fel. Ilyen a humán Toll-like receptorok (TLR) közül a TLR-2, melynek ligandja két, az *E. coli* sejtfalába integrálódó lipoprotein, a Lip 19 és a Lip12 [Lee és mtsai., 2002], vagy a TLR-5, melynek ligandja a bakteriális Flagellin [Gewirtz és mtsai., 2001]. A TLR-4 receptor egyik ligandja szintén fehérje, az *E. coli*-n kifejeződő FimH molekula, amely egy mannóz specifikus adhesin [Mossmann és mtsai., 2008]. A TLR-11 és TLR-12 receptorok ligandjai szintén fehérjét, a *Toxoplasma gondii* Profilin molekuláját ismerik fel [Koblansky és mtsai., 2013; Yarovinsky és mtsai., 2005].

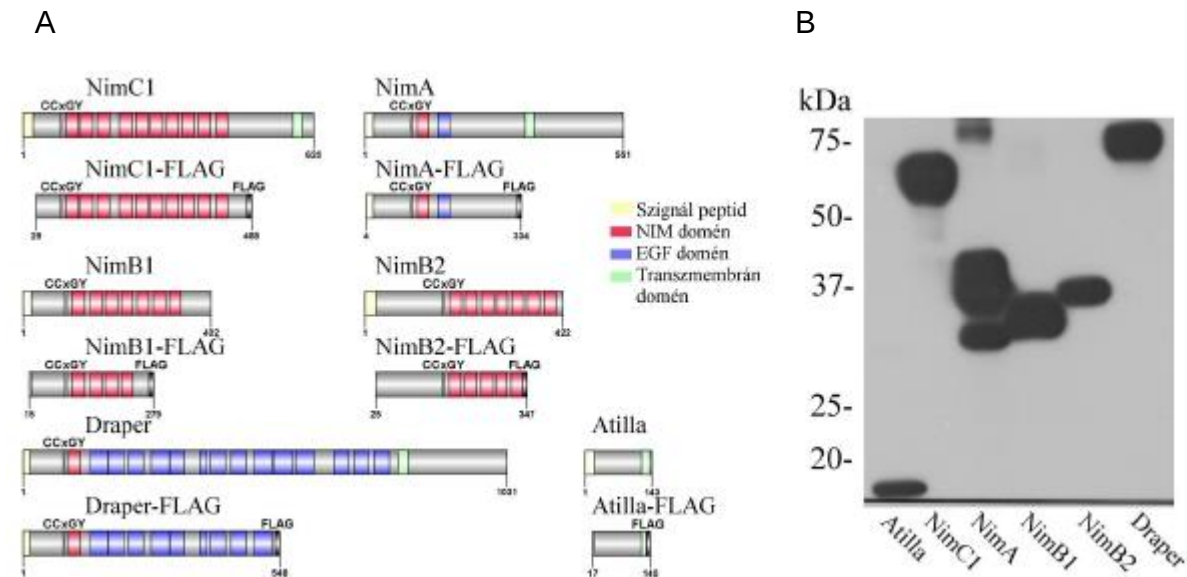


68. Ábra. A NimC1 baktériumkötésének vizsgálata fehérjementesített *E. coli* lizátummal történő előkezelés után

(A) Fenollal kezelt, vagy (B) proteináz K-emésztett *E. coli* lizátummal előinkubált (zöld), illetve kezeletlen *E. coli* lizátummal előinkubált (piros) hemocita lizátumokban inkubált *E. coli* baktériumok távoli vörös fluoreszcenciájának áramlási citometriás analízise anti-NimC1(zöld, piros), vagy anti-L1 IgG1 izotípus kontroll (kék) és anti-egér Alexa Fluor 633 festést követően [Zsámboki J].

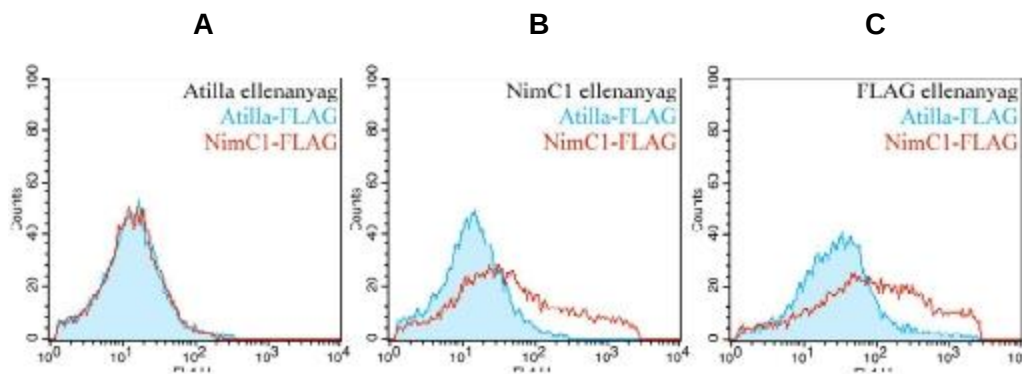
3.4.4.2. A rekombináns Nimród fehérjék baktériumkötésének vizsgálata

Mivel a Nimród fehérjék közül egyedül a NimC1 fehérjét felismerő ellenanyaggal rendelkezünk, a további Nimród családba tartozó fehérjék baktériumkötésének vizsgálatához új megközelítést alkalmaztunk. A NimA, NimB1, NimB2 és a NimC1, fehérjék FLAG epitóppal ellátott extracelluláris doménjeit rekombináns fehérjeként termeltettük meg a baculovírus alapú Bac-to-Bac eukarióta expressziós rendszerben. A baktériumkötési kísérletekhez negatív kontrollként a lamellocitákon megnyilvánuló Atila fehérje FLAG epitóppal ellátott extracelluláris doménjét, pozitív kontrollként pedig az apoptotikus sejtek és a *S. aureus* baktériumot kötő Draper fehérje [Shiratsuchi és mtsai., 2012] FLAG epitóppal kiegészített extracelluláris doménjét állítottuk elő (69. Ábra A). A baculovírus alapú eukarióta expressziós rendszerben megtermeltetett rekombináns Nimród fehérjék Western blot analízise során azt tapasztaltuk, hogy a rekombináns fehérjék molekulatömege az aminosavszekvencia alapján számított molekulatömeget egy kissé meghaladja (69. Ábra B), ami azzal magyarázható, hogy ezek a fehérjék az Sf9 lepke-sejtvonalban valószínűleg poszt-transzlációs módosításon eshettek át; aminosav szekvenciájukban glikozilációs helyek jelenlétére utaló motívumokat találtunk.



69. Ábra. A Nimród fehérjék és a rekombináns Nimród fehérjék doménszerkezete valamint molekulatömege (A) A NimC1, NimA, NimB1, NimB2, Draper, és Atilla fehérjék és a FLAG epitóppal ellátott rekombináns Nimród fehérjék doménszerkezete; szignál peptid (sárga), NIM domén (piros), EGF domén (kék), transzmembrán domén (zöld) FLAG epitóp (fekete). (B) A rekombináns Nimród fehérjék Western blot analízise: Atilla 15 kDa (13,6 kDa), NimC1 52-60 kDa (50,4 kDa), NimA 32-42 kDa, (36,3 kDa), NimB1 30-39 kDa, (30,1 kDa), NimB2 34-37 kDa, (35,3 kDa), Draper 60-80 kDa, (59,5 kDa) (A zárójelben feltüntetett értékek az aminosav szekvencia alapján számított molekulatömegek.) [Zsámboki és mtsai., 2013].

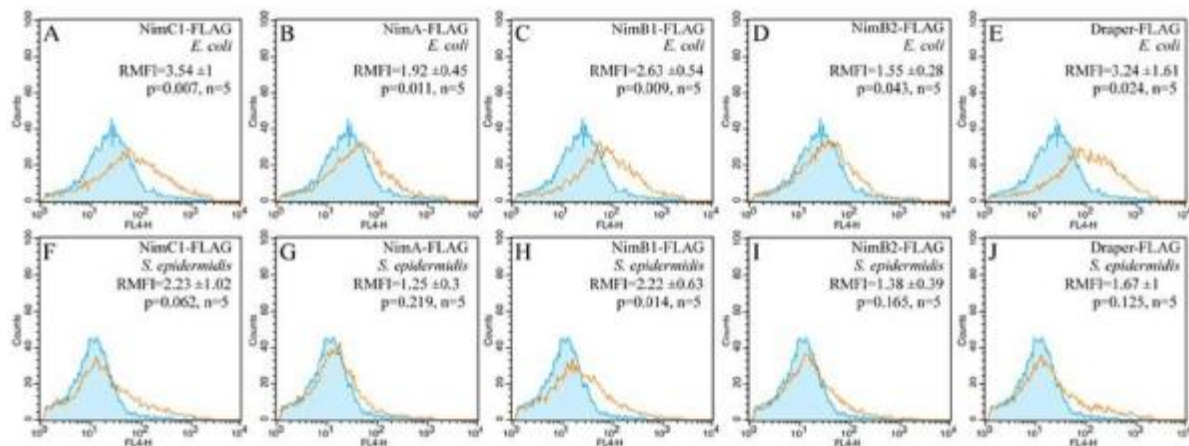
A rekombináns NimC1 fehérje *E. coli* baktérium kötését a rekombináns NimC1 fehérjét termelő Sf9 sejtek lizátumával vizsgáltuk (70. Ábra A, B, C piros hisztogram), kontrollként az Atilla fehérjét kifejező Sf9 sejtek lizátumát használtuk (70. Ábra A, B, C kék hisztogram). Az *E. coli* baktériumhoz kötődött FLAG epitóppal ellátott rekombináns fehérjéket anti-P1 vagy anti-FLAG és anti-egér Alexa 633 ellenanyagokkal festettük és azt tapasztaltuk, hogy a rekombináns NimC1 fehérjével történő inkubálás után az *E. coli* baktérium távoli vörös fluoreszcenciája mind az anti-P1 (70. Ábra B piros), mind az anti-FLAG ellenanyaggal (70. Ábra C piros) történő festést követően magasabb a rekombináns Atilla fehérjével kezelt baktériumok távoli vörös fluoreszcenciájánál (70. Ábra B, C kék). Ebből arra következtettünk, hogy a hemocitákon megnyilvánuló NimC1-hez hasonlóan a rekombináns NimC1 fehérje is köti az *E. coli* baktériumot, amely mind a NimC1 fehérjét felismerő ellenanyaggal (70. Ábra B piros) mind a FLAG epitópot felismerő ellenanyaggal (70. Ábra C piros) kimutatható.



70. Ábra Rekombináns NimC1-FLAG és rekombináns Atila-FLAG fehérje baktériumkötésének összehasonlítása anti-Atilla, anti-NimC1 és anti-FLAG ellenanyagokkal történő festést követően

Az *E. coli* baktériumot rekombináns NimC1-FLAG fehérjét kifejező (piros), illetve rekombináns Atila-FLAG fehérjét kifejező (kék) Sf9 sejtek lizátumával kezeltünk, majd (A) anti-Atilla (anti-L1), (B) anti-NimC1 (anti-P1), vagy (C) anti-FLAG ellenanyaggal és anti-egér Alexa Fluor 633 ellenanyaggal festettük. A baktériumok távoli vörös fluoreszcenciáját áramlási citometriával mértük [Zsámboki J.].

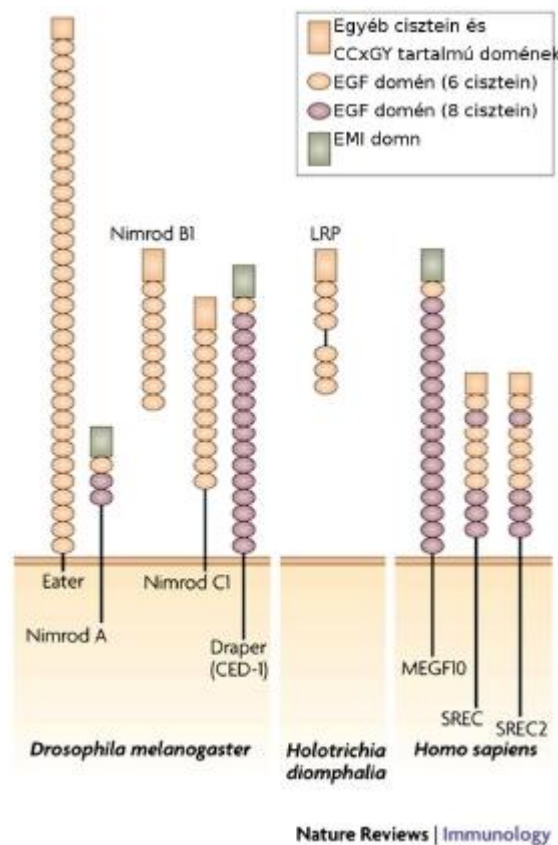
A továbbiakban a NimC1-FLAG, NimA-FLAG, NimB1-FLAG és NimB2-FLAG rekombináns fehérjék baktériumkötését vizsgáltuk, pozitív kontrollként az ismert fagocitózis receptort a Drapert, negatív kontrollként pedig a lamellocitákon megnyilvánuló Atila molekulát termeltük meg rekombináns fehérjeként. Eredményeink szerint a Gram-pozitív *E. coli* baktériumot a rekombináns NimC1-FLAG, NimA-FLAG, NimB1-FLAG és NimB2-FLAG mindegyike (71. Ábra A-E), míg a Gram-negatív *S. epidermidis* baktériumot csak a rekombináns NimB1-FLAG kötötte (71. Ábra H) szignifikáns mértékben ($p < 0,05$). Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a Nimród fehérjék baktériumkötésének hatékonysága nem áll összefüggésben azok NIM doménjeik számával, hiszen a tíz NIM domént tartalmazó rekombináns NimC1-FLAG (71. Ábra A) fehérje és az egyetlen NIM doménnel rendelkező rekombináns Draper-FLAG hasonló RMFI értékkel köti az *E. coli* baktériumot (71. Ábra E), valamint a négy NIM domént hordozó NimB1-FLAG jóval magasabb RMFI értékkel köti az *E. coli* baktériumot, mint az öt NIM doménnal rendelkező NimB2-FLAG.



71. Ábra. NimC1-FLAG, NimB1-FLAG, NimB2-FLAG, NimA-FLAG, és a Draper-FLAG rekombináns fehérjék *E. coli* és *S. epidermidis* kötése

A NimC1-FLAG (A, F), NimA-FLAG (B, G), NimB1-FLAG (C, H), NimB2-FLAG (D, I) és a Draper-FLAG (E, J) rekombináns fehérjéket kifejező Sf9 sejt lizátumokkal kezelt (piros), illetve a kontrollként használt Atilla-FLAG rekombináns fehérjéket kifejező Sf9 sejt lizátumokkal kezelt (kék) FITC-*E. coli* (A-E), valamint FITC-*S. epidermidis* (F-J) baktériumok távoli vörös fluoreszcenciájának áramlási citometriai analízise az anti-P1 és anti-egér Alexa Fluor 633 ellenanyagokkal történt festést követően [Zsámboki és mtsai., 2013].

Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a Nimród fehérjecsalád tagjai a baktériumok elleni immunválaszban fagocitózis receptorként működnek és beilleszthetők az EGF-hez hasonló NIM domént tartalmazó fagocitózis receptorok, (72. Ábra) [Stuart és mtsai., 2008], valamint a *Drosophila melanogaster* fagocitózisában szerepet játszó (5. Táblázat) molekulák sorába [Stuart és Ezekowitz 2008]. A transzmembrán doménnel rendelkező NimA és NimC fehérjék valószínűleg a mikrobák felismerésében és fagocita sejthez rögzítésében, míg a transzmembrán régióval nem rendelkező NimB fehérjék a hemolimfában keringő opszoninként működhetnek, a mikroorganizmusok felszínéhez kötődve segíthetik azok bekebelezését [Zsámboki és mtsai., 2013].



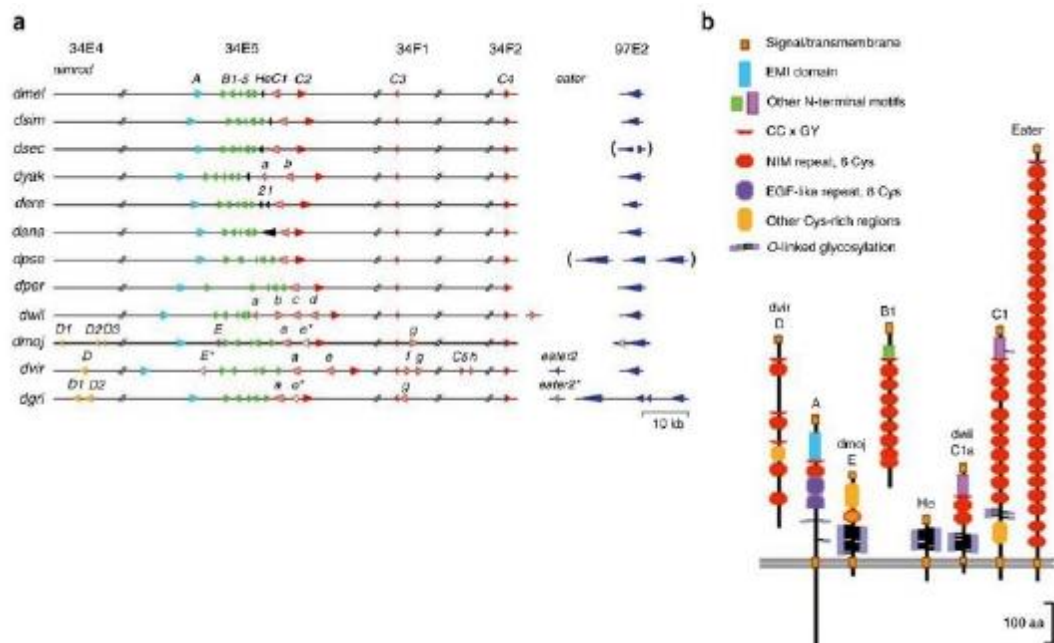
72. Ábra. EGF-hez hasonló NIM domént tartalmazó fagocitózis receptorok és opszononok [Stuart és mtsai., 2008. nyomán]

5. Táblázat. A *Drosophila melanogaster* fagocitózisában szerepet játszó receptorok és opszoninok
[Stuart és mtsai., 2008. nyomán]

<i>Drosophila</i> receptorok	Ligand	Rokon emlős molekulák
TEP -ek		
TEPVI (MCR)	<i>Candida albicans</i>	Komplementrendszer elemei
TEPIII	<i>Staphylococcus aureus</i>	
TEPII	<i>Escherichia coli</i>	
Scavenger receptorok		
Croquemort	Apoptotikus sejtek és <i>S. aureus</i>	CD36
Peste	<i>S. aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	SR-BI
SR-CI	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> és dsRNS	ND
NIM domént tartalmazó receptorok		
Eater	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>	MEGF10, MEGF11, CD91, SREC
Draper	Apoptotikus sejtek, axon pruning	Stabilin1, Stabilin2
NimrodC1	<i>E. coli</i> és <i>S. aureus</i>	
Egyéb receptorok		
PGRP-LC	<i>E. coli</i>	Emlős PGRP -k
PGRP-SA (oldott)	<i>S. aureus</i>	

A napjainkig feltérképezett tizenkét *Drosophila* faj genomszekvenciájának ismeretében lehetővé vált annak vizsgálata, hogy a természetes szelekció milyen hatással volt az egyes géncsaládok mintázatának alakulására és a veleszületett immunrendszer különböző komponenseinek szekvencia divergenciájára. A NIM domént tartalmazó fagocitózis receptorok, az Eater és a NimC1 estében nyilvánvalóvá vált, hogy ezek a receptorok a különböző fajokban egymástól függetlenül terjedtek el (73. Ábra a).

A *nimród* géncsalád genomi régióján belül foglal helyet a *Hemese* gén [Kurucz és mtsai., 2003] is, amely az Eater-hez és NimC1-hez hasonlóan a hemociták sejtmembránjában megnyilvánuló fehérjét kódol. A *Hemese* fehérje nem tartalmaz NIM domént, rövid sejten kívüli doménje O-glikozilált, szerinben és treoninban gazdag. Bár a *melanogaster* csoporton kívül a *Hemese* gén homológjai nem azonosíthatók, a *Drosophila williston*ban egy NimC1 paralóg, a NimC1a a *Hemese*hez hasonlóan szerinben és treoninban gazdag régiót és erősen redukált számú NIM domént tartalmaz (73. Ábra b). Valószínűsíthető tehát, hogy a *Hemese* gén egy olyan redukálódott *nimC1* paralóg, mely idővel az összes NIM doménjét elveszítette [Sackton és mtsai., 2007].

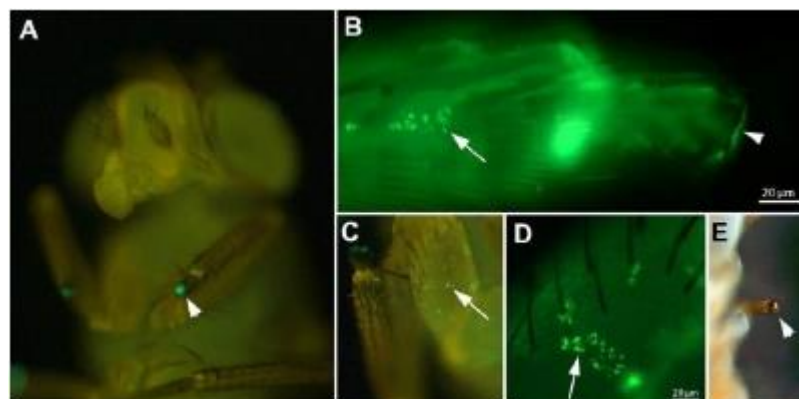


73. Ábra. A *nimrod* és *eater* gének vázlatos térképe 12 *Drosophila* fajban [Sackton és mtsai., 2007]
 (a) A *nimrod* és *eater* gének genomi szerveződése. A *nimA* (világoskék), *nimB* (zöld), *nimC* (piros), *nimD* (narancs), *nimE* (lila), *Hemese* (fekete), *eater* (sötétkék). A pszeudogének üres nyilakkal vannak ábrázolva és csillaggal jelöltek. A *Hemese* paralógok számmal, a *nimC1* paralógok alsó indexű számmal vannak jelölve. *dmel*, *D. melanogaster*; *dsim*, *D. simulans*; *dsec*, *D. sechellia*; *dyak*, *D. yakuba*; *dere*, *D. erecta*; *dana*, *D. ananassae*; *dpse*, *D. pseudoobscura*; *dper*, *D. persimilis*; *dwil*, *D. willistoni*; *dmoj*, *D. mojaveensis*; *dvir*, *D. virilis*; *dgri*, *D. grimshawi*.
 (b) A Nimród és Eater fehérjék főbb típusainak domén összetétele *D. melanogaster*-ben, kivéve a NimC1a, NimD és NimE.

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

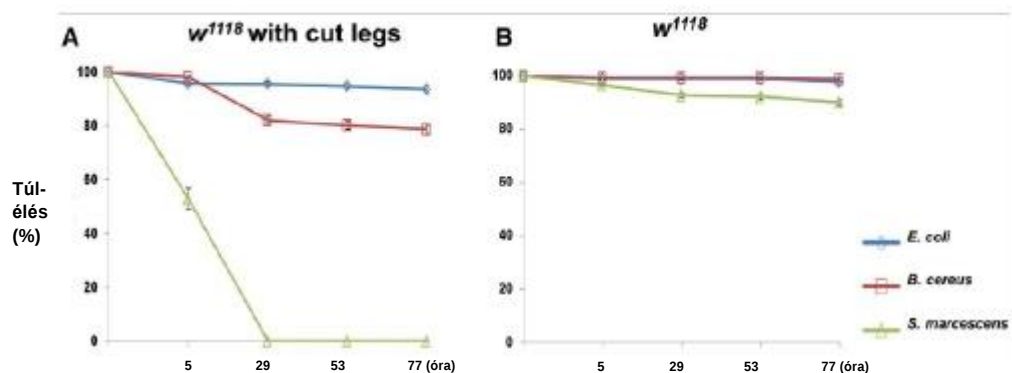
3.5.1. Egy új szeptikus sérülési módszer kidolgozása *Drosophilában*

A *Drosophila* a természetes élőhelyén patogén mikroorganizmusokkal fertőződhet, amelyek a tápcsatornán, vagy sérülésén juthatnak be a testüregbe. Laboratóriumunkban olyan szeptikus sérülési módszert kívántunk kidolgozni, amely az irodalomban eddig leírt drasztikus tűszúrásnál jobban modellezi a természetben is előforduló sérülést. A felnőtt állatok első pár lábain a tarzális ízeket eltávolítottuk, majd az állatokat zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) termelő *E. coli* baktérium pázsitra helyeztük. A testüregbe jutó baktériumokat négy óra eltelté után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és fluoreszcens baktériumokat találtunk mind a melanizált seb felszínén (74. Ábra A, B, E nyílhegy), mind a testüregben (8. Ábra. B, C, D nyílak), azaz a mesterségesen előidézett sérülésén keresztül a baktériumok fertőzhetnek.



74. Ábra. *E. coli*-GFP baktériumok a laboratóriumi körülmények között okozott sérülésen keresztül bejutnak a *Drosophila* testüregébe. A GFP-t termelő *E. coli* baktériumok kimutathatóak a sérülés helyén képződött alvadékban (A, B nyílhegyek) valamint a testüregben (B, C, D nyilak). A sérülés helyén képződött alvadék melanizálódása (E nyílhegy) [Kari és mtsai., 2013].

Eután azt vizsgáltuk meg, hogy az általunk előidézett sérülés milyen hatással van az ecetmuslicák életképességére. A steril körülmények között tartott egyedek a életképességét a sérülés nem befolyásolta. Sérült állatokat *E.coli*., *B. cereus*, és *S. marcescens* baktérium pázsitot tartalmazó fiolákra helyezve, meghatároztuk a sérült egyedek túlélési rátáját (75. Ábra).

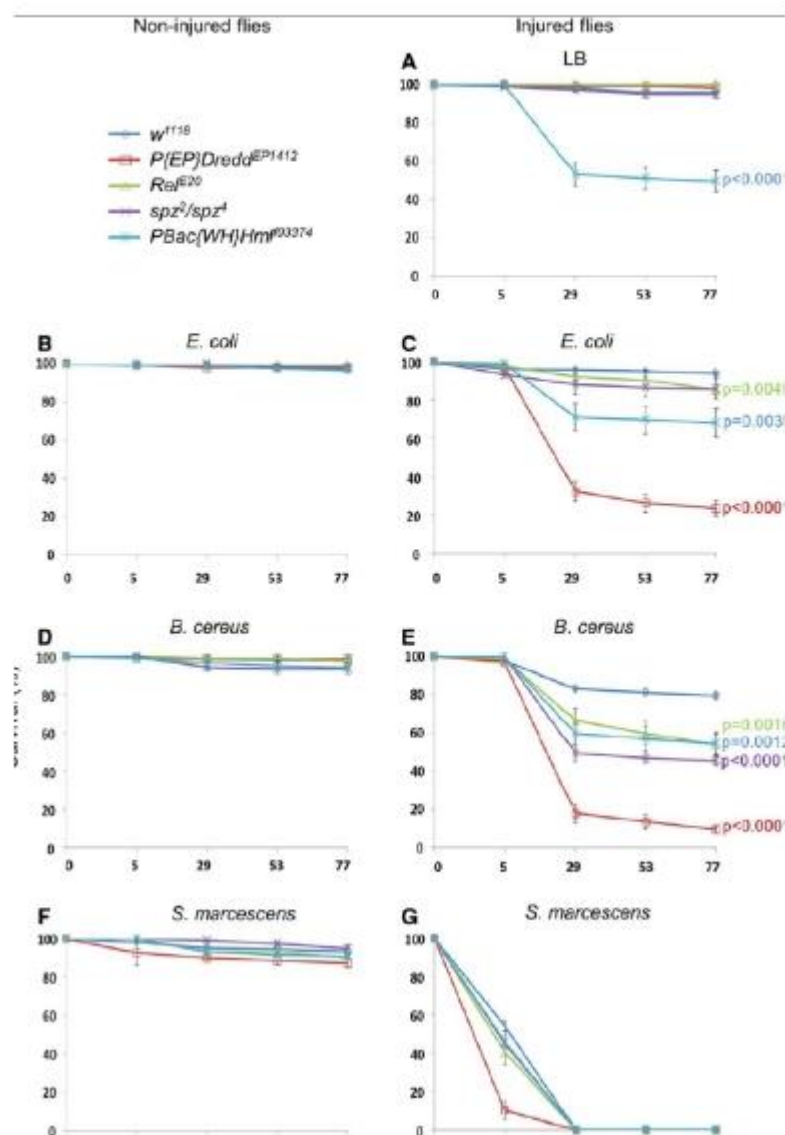


75. Ábra. Sérült és sértetlen állatok életképességének vizsgálata baktériumpázsiton. A sérült (A) és sértetlen (B) vad típusú *w1118* állatokat 5 órán át *E. coli* (kék), *B. cereus* (barna) illetve *S. marcescens* (zöld) baktérium pázsiton tartottuk, majd standard *Drosophila* táptalajra helyezve figyeltük az állatok túlélését. A kísérleteket háromszor ismételtük meg, a diagram a három kísérlet adatait foglalja össze. Minden csoport kísérletenként legalább száz egyedet tartalmazott. A hibavonalak a standard hibát jelölik [Kari és mtsai., 2013].

Eredményeink szerint a sérült állatok túlélését az *E. coli* (75. Ábra. A), és *B. cereus* (9. Ábra. A) kevésbé befolyásolta, az állatok túlnyomó többsége (93,9%-a, és 80,1%-a) a fertőzést követő 77 óra eltelte után életben volt. A *D. melanogaster*-re erősen patogén *S. marcescens* baktérium már 29 órán belül az állatok pusztulását okozta (75. Ábra. A), amiből arra következtettünk, hogy a sérült állatok mindegyike megfertőződött a *S. marcescens* baktériummal és a w¹¹¹⁸ egyedek pusztulását a baktériumokkal történő fertőzés okozta. A sértetlen w¹¹¹⁸ állatok túlélését az *E. coli* (75. Ábra. B) és a *B. cereus* (75. Ábra. B) baktériumkezelés nem befolyásolta, míg a *S. marcescens* (75. Ábra. B) kezelést követő 77 óra elteltével az állatok 10%-a pusztult el. Ezekből az eredményeinkből arra következtettünk, hogy a sérülésen keresztül bejutó baktériumok fertőzést és különböző mértékű letalitást okoznak.

A mesterségesen előidézett sérülésén alapuló modellt a szeptikus sérülés által kiváltott immunválaszban szerepet játszó gének azonosítására kívántuk felhasználni, alkalmazhatóságát először az immunválaszban már ismert szereppel bíró gének mutáns alléljait hordozó ecetmuslicákon teszteltük. A *spätzle* (*spz2/spz4*) a Toll jelátviteli útvonalban a Toll receptot ligandja, a *Relish* (*RelE20*) és a *Dredd* (*DreddE1412*) az *Imd* jelátviteli útvonalban játszik szerepet, mindhárom gén az antimikrobiális peptidek termelődését szabályozza, a *Hml*₀₃₃₇₄₂ viszont a hemociták által termelt Hemoclectin fehérjét kódolja, amelynek koagulációs faktorként fontos szerepe van az ecetmuslica lárva véralvadásában. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú w¹¹¹⁸ *Drosophilához* hasonlóan a sértetlen mutáns állatok életképességét az *E. coli*, *B. cereus* és *S. marcescens* baktériumkezelés nem befolyásolta szingifikánsan (76. Ábra B,D,F).

ezért



76. Ábra. Ismert immungénekben mutáns *Drosophila* törzsek vizsgálata a septicus sérülési teszttel
Sértetlen és sérült *Drosophila* mutánsok túlélési görbéi *E. coli* (B,C), *B. cereus* (D,E) és *S. marcescens* (F,G) baktériumkezelést követően. A kísérleteket háromszor ismételtük meg, a diagramok a három kísérlet adatait foglalják össze. Minden kísérleti csoport legalább száz egyed tartalmazott. A statisztikai analízist a fertőzést követően 77 órával rögzített adatok felhasználásával végeztük. A $p < 0.05$ alatti értékeket szignifikánsnak tekintettük. A hibavonalak a standard hibát jelölik [Kari és mtsai., 2013].

A sérült állatokban steril körülmények között kizárólag a hemolimfa koagulációban érintett *Hml_{f03374}* mutáns állatok esetében figyeltük meg a túlélés szignifikáns csökkenését (76. Ábra. A világoskék), ami nem meglepő, hiszen ebben a „vérzékeny” mutánsban a sebzáródás a hemolimfa koagulációjának zavara miatt nem történik meg és a hemolimfa vesztese okozza az állatok életképességének csökkenését.

Az *E. coli* fertőzést követően a *Dredd_{EP1412}* (76. Ábra. C barna) és a *Hml_{f03374}* (76. Ábra. C világoskék) mutánsok életképességének szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, míg a *B. cereus* fertőzést követően a *Dredd_{EP1412}* (76. Ábra. E barna), a *spz2/spz4* (76. Ábra. E lila), a *Hml_{f03374}* (76. Ábra. E világoskék) valamint a *Rel_{E20}* (76. Ábra. E zöld) mutánsok egyedeinek életképessége csökkent szignifikánsan.

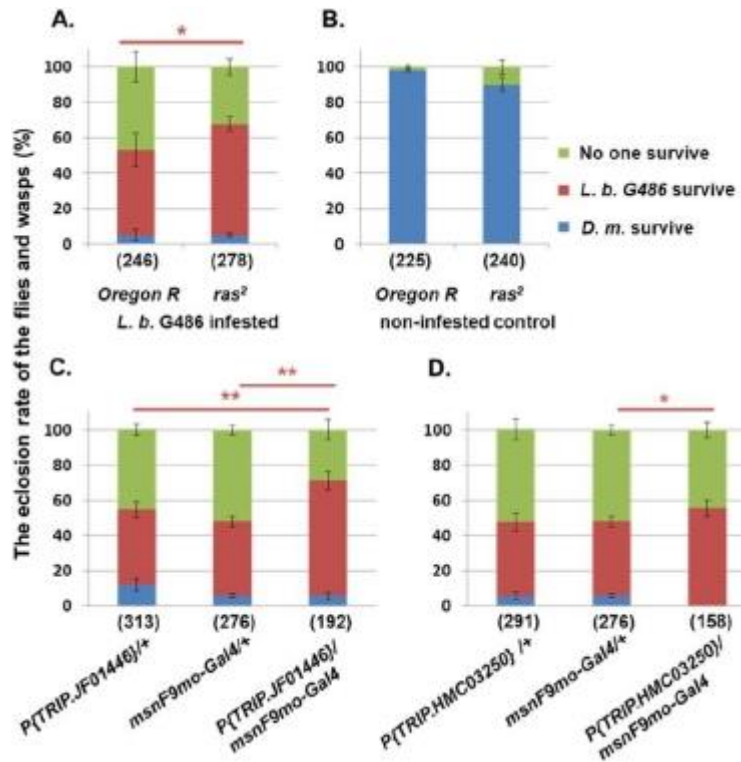
Fenti eredményeink azt mutatják, hogy a kifejlesztett szeptikus sérülési teszt alkalmas *Drosophila* sérülésének gyógyulásában és a fertőzések legyőzésében szerepet játszó új gének azonosítására, ezért egy irányított screen keretében olyan gének mutáns alléljait hordozó egyedek életképességét vizsgáltuk szeptikus sérülést követően, amelyeknek irodalmi adatok, illetve szekvencia homológiák alapján szerepük lehet a sebgyógyulásban illetve fertőzések leküzdésében. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy *scramblase 1* (*scrambl1_{EY07744}*), a *multicopper oxidase 3*, (*MCO_{3C359}*), valamint a *rasberry* (*ras2*) gének mutáns alléljait hordozó állatok életképessége szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkent *B. cereus* fertőzést követően. A *scramblase 1* génnek a foszfolipid transzlokációban van szerepe. Sérülés következtében olyan negatív töltéssel rendelkező foszfolipidek, mint a foszfatidil-szerin, amelyek jellemzően a plazmamembrán belső lipid rétegében helyezkednek el, a külső rétegbe transzlokálódnak és ezáltal aktiválják a sebgyógyulásban szerepet játszó jelátviteli útvonalakat [Theopold és mtsai., 2002]. A *multicopper oxidase 3* a polifenolok oxidációját katalizálja, a sebgyógyulásban és a melanizációban lehet szerepe [Theopold és mtsai., 2002]. A *rasberry* a *Drosophila* inosin-5'-monofoszfát dehidrogenáza (IMP), a *de novo* GMP szintézis kulcsenzime, mely emberben az szerepet játszik az immunválasz szabályozásában [Sollinger és mtsai., 1992].

3.5.2. A *rasberry* gén szerepe a *Drosophila* immunválaszban

A szeptikus sérülési modell felhasználásával azonosított, *rasberry* génről korábban kimutatták, hogy a gén *Drosophilában* az S2 sejtek fagocitózisában játszik szerepet [Stroschein-Stevenson és mtsai., 2005] és túltermelése esetén a hemociták feldúsulnak a szívcső mentén [Stofanko és mtsai., 2008], ezért a *rasberry ras2* allélját további vizsgálatoknak vetettük alá. Először a *ras2* fagocitózisban betöltött szerepét vizsgáltuk, de a lárvákból származó vresejtek fagocitózis indexe nem különbözött szignifikánsan a vad típusú kontroll állatokban mért értékektől.

Ezek után a tokképzési reakciót vizsgáltuk meg a *ras2* mutáns állatokban. *L. bouhardi* G486 parazitoid darázssal történő fertőzést követően összehasonlítottuk a *Drosophila* lárvákból kikelő ecetmuslicák vagy darazsak számát a *ras2* mutáns és a kontroll Oregon R esetében. Azt tapasztaltuk, hogy a fertőzött *ras2* mutánsok bábbőréből szignifikánsan több darázs kelt ki, mint a fertőzött Oregon-R lárvákból (77. Ábra. A barna). A darázssal szúrt Oregon R esetében viszont szignifikánsan több volt azoknak a báboknak a száma, amelyből sem ecetmuslica sem darázs nem kelt ki (76. Ábra. A zöld).

Darázsfertőzés nélkül a *ras2* mutáns és a vad típusú Oregon R bábokból kikelő ecetmuslicák számában nem volt szignifikáns különbség (76. Ábra. B kék). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *rasberry* gén szerepet játszik a parazitoid darázs elleni védekezésben.



76. Ábra. Az ecetmuslicák és darazsak kikelési aránya a vad típusú Oregon R bábokból, a *ras2* mutáns bábokból, valamint *ras* specifikus kettősszálú RNS interferenciával géncsendesített állatok bábjaiból parazitoid darázsfertőzést követően.

(A) *L. boucardi* G486 parazitoid darázzal fertőzött és (B) nem fertőzött Oregon R és *ras2* mutáns bábokból kikelő ecetmuslicák, illetve darazsak %-os aránya. Az oszlopok alatt a kísérletek során vizsgált ecetmuslica bábok számát tüntettük fel, amelyből meghatároztuk a kikelő ecetmuslicák (kék) vagy darazsak (barna) illetve az elpusztult egyedek (zöld) arányát. (Standard error * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

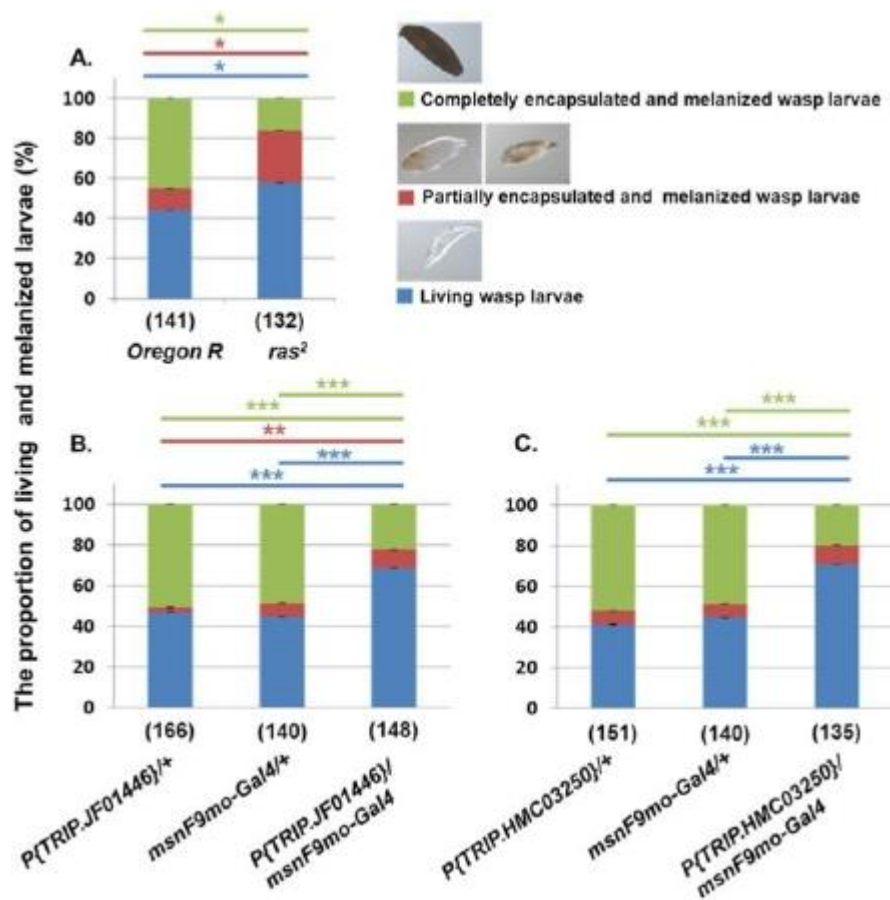
(C,D) Két különböző, a *ras* géntermékre specifikus kettősszálú RNS interferencia konstrukcióval csendesített és darázzal fertőzött állatok bábjaiból kikelő ecetmuslicák, illetve darazsak %-os aránya [Kari és mtsai., 2016].

Mivel a *ras2* mutánsban a sérült GTP szintézis mind a sejtek, mind a szervezet szintjén alapvető folyamatokat befolyásolhat, annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a parazitoid darázzal szemben kialakuló gyengébb immunválaszt a hemociták szintjén történt változások, vagy a szervezet általánosan csökkent GDP/GTP szintje okozza, a hemocitákban RNS interferenciával csökkentettük a *rasberry* génterméket. Kísérleteinkben a lamellocitákban és a lamellocita előalakokban aktív *msnF9mo-Gal4* [Tokusumi és mtsai., 2009a, Tokusumi és mtsai., 2009b] (18. Ábra), valamint a hemociták megközelítőleg 80%-ban kifejeződő *Hemese>Gal4* [Zetterwall és mtsai., 2004] (19. Ábra) meghajtóelemeket és két RNSi vonalat, a *y1 v1*; *P{TRIP.JF01446}* *attP2*, valamint a *y1 sc* v1*; *P{TRIP.HMC03250}* használtuk. A *rasberry* géntermékre specifikus kettősszálú RNS interferencia konstrukciókat hordozó állatokat vérsejt-specifikus meghajtó elemeket hordozó állatokhoz kereszteztük és az utódok *L. boucardi* darázsfertőzését

követően meghatároztuk a *Drosophila* bábokból kikelő ecetmuslicák és darazsak arányát (76. Ábra C,D).

Mivel mind a *ras2* mutáns esetében, mind a *ras* géntermék RNS interferenciával történő csendesítését követően nagyobb arányban keltek ki darazsak a bábbőrből, arra a következtetésünk, hogy ezekben az állatokban csökkent a parazitoid darazsfertőzésre adott immunválasz hatékonysága. A *Drosophila* lárvába oltott a parazitoid darazsak petéi körül hemocitáiból több rétegű tok képződik, amely a testüregben elhatárolja, majd a melanizációs reakció során képződő szabad gyökök segítségével elpusztítja a betolakodót. Kísérleteink során a *L. boulardi* darazsfertőzést követő 48 és 72 óra elteltével a *ras2* és az Oregon R kontroll lárvákban a tokképzés különböző stádiumaiban lévő darazslárvákat találtunk. Előfordultak részlegesen melanizálódott darázs peték, teljesen melanizálódott darázs peték és élő darázs lárvák (77. Ábra).

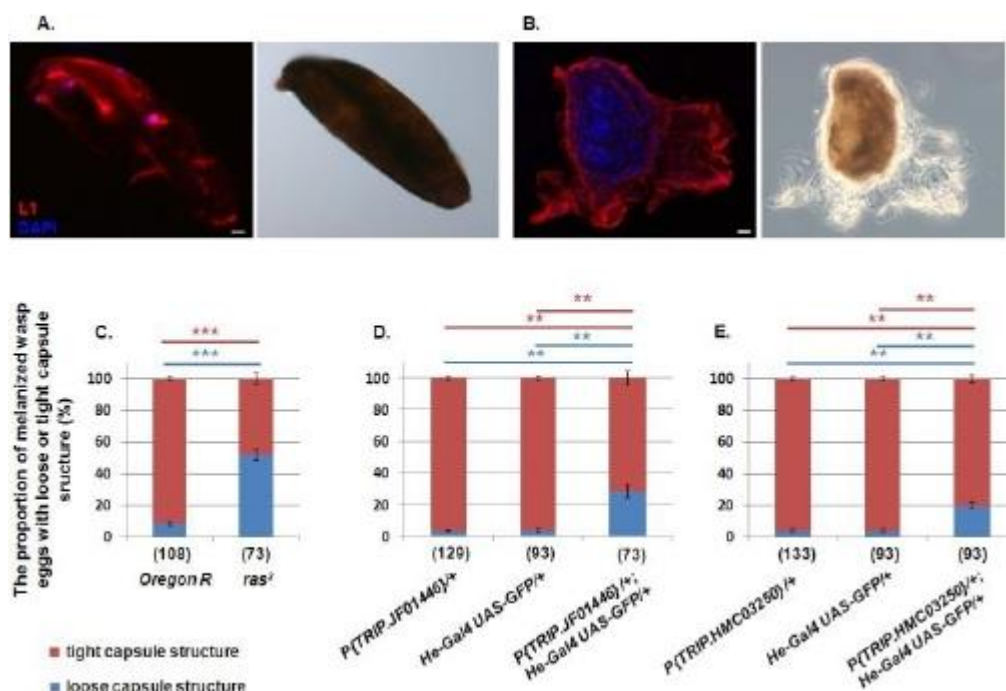
A kiboncolt darázspetével fertőzött Oregon R illetve *ras2* lárvákban általában 1 vagy 2 élő lárvát vagy melanizált darázs petét találtunk, de a darázs peték számában nem találtunk szignifikáns különbséget, azaz a vad típusban és a mutánsban hasonló volt a fertőzöttség mértéke, ezért az élő lárvák illetve melanizált peték arányából következtetni lehetett a sejt-közvetítette immunválsz, azaz a tokképzés hatékonyságára. A *ras2* mutáns állatokban az immunindukciót követően már 48 óra elteltével is szignifikánsan magasabb volt az élő darázs lárvák (77. Ábra A) és a részlegesen melanizált peték (77. Ábra A) száma, valamint szignifikánsan kevesebb volt a teljesen melanizált darázspeték száma (77. Ábra A), mint az Oregon-R kontroll állatokban. A 72 órás mintákban hasonló eredményeket kaptunk [Kari és mtsai., 2016]. Mind a *ras2* mutáns, mind az RNS interferenciával géncsendesített állatokban több élő lárvát figyeltünk meg, mint a kontrollban, amiből arra következtettünk, hogy a hemociták kevésbé hatékonyan ismerik fel a parazitoid darázspetéket, vagy nem képesek megfelelően kitapadni azok felszínére. A részlegesen melanizált darázs peték magasabb száma arra utal, hogy a tokképzés és a melanizáció folyamata is lelassult.



77. Ábra. A *ras*² és az Oregon-R kontroll valamint *ras* specifikus kettősszálú RNS interferenciával géncsendesített állatok tokképzése a parazitoid darázsfertőzést követően

Kísérleteink során két egymástól független, a *ras* géntermékre specifikus RNS interferencia törzset használtunk, amelyeket az *msnF9mo-Gal4* driverrel hajtottunk meg. A tokképzés hatékonyságát a darázssal történő immunindukció után 48 órával vizsgáltuk. Az oszlopok felett a vizsgált ecetmuslica lárvák számát tüntettük fel. (Standard error * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) [Kari és mtsai., 2016].

A darázsfertőzést követően az ecetmuslica lárvákat boncolva olyan darázspetéket találtunk, amelyeket a lamellociták szorosabban (78. Ábra. A) vagy lazább rétegben (78. Ábra. B) vették körül és azt tapasztaltuk, hogy a laza szerkezetű tokok aránya a *ras*² mutáns lárvákban szignifikánsan magasabb volt, mint az Oregon R lárvákban (78. Ábra. C).



78. Ábra. A lamellociták darázspetéhez történő tapadása.

A *L. bouhardi* darázssal immunindukált (A) Oregon R és (B) *ras2* lárvákból származó petékhez tapadó lamellociták indirekt immunfluoreszcencia festése anti-Atilla (L1) és CF568-cal jelölt anti-egér ellenanyaggal festettük. (C). A *L. bouhardi* darázssal immunindukált lárvákból a hemocitákat izoláltunk a darázsszúrás követően 72 óra elteltével majd anti-Atilla (L1) és CF568-cal jelölt anti-egér ellenanyaggal festettük. Az oszlopok felett a részlegesen és teljesen melanizált darázspeték számának összegét tüntettük fel. Méretjel: 20 μ m. (Standard error * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001) [Kari és mtsai., 2016].

A *rasberry* génterméket az *He>Gal4* (78. Ábra. D, E) vagy *msnF9mo>Gal4* [Kari és mtsai., 2016] driverrel csendesítve az RNSi vonalakban, azt tapasztaltuk, hogy az utódokban a darázspeték körül kialakuló laza szerkezetű tokok aránya megemelkedett a szülői törzsekben talált értékhez képest. A laza szerkezetű tokok aránya a darázsszúrás követő 48 óra után is magasabb volt mind a *ras2* mutánsban, mind a *ras* géntermék RNS interferenciával történő csendesítését követően a kontrollokhoz viszonyítva [Kari és mtsai., 2016]. Ezek az eredményeink azt mutatják, hogy a laza szerkezetű tok kialakulását a lamellocitáknak a tokhoz történő gyenge tapadása okozza. A *Drosophila* parazitoid darázspeték közül kialakított tokképző reakciójának molekuláris mechanizmusa részleteiben még nem ismert, de ebben a folyamatban olyan adhéziós és sejt-sejt kapcsolatokat kialakító molekulák vesznek részt, mint az integrinek vagy a Neuroglian [Irving és mtsai., 2005; Williams, 2009]. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy darázsfertőzést követően mind a *ras2* mutánsban, mind a *rasberry* géntermék kettősszállú RNS-sel történő vérésejt specifikus csendesítését követően több a laza szerkezetű tok képződik, mint a kontroll állatokban. A *Drosophila* lárv a parazitoid darázspetéken kívül a tumorosan transzformálódott hemociták körül is tokot képez. A *ras2* mutánshoz hasonló fenotípust figyeltek meg a tumor képződésben szerepet játszó JAK/STAT jelátviteli útvonalban résztvevő GTP-kötő fehérje, a heterotrimerikus G protein α alegysége, a Ga73B szintjének *HopT42* háttérén történő csökkentése során is [Bausek és Zeidler, 2014]. Ez esetben a *HopT42*-ban megfigyelt pre-tumorokhoz képest, az alacsony Ga73B szint következtében csak lazán kapcsolódó sejt aggregátumok keletkeztek és nem alakultak ki a *HopT42*adultokban megfigyelt tömör szerkezetű melanizált tumorok [Bausek és Zeidler, 2014].

4. Új eredmények összefoglalása

Elsőként azonosítottunk *Drosophila* hemocitáin és hemocita alpopulációin specifikusan megnyilvánuló olyan molekuláris markereket, melyek lehetővé teszik a *Drosophila* sejt-közvetítette immunválaszának 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 molkültömegű 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* gén által kódolt β PS integrin, mely a sejtadhézióban játszik meghatározó szerepet.

Immunológiai és proteomikai eszközökkel azonosítottuk a darázssindukció 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* 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 fehérjecs család tagjai a baktériumok kötődésével járulnak hozzá a *Drosophila* sejt-közvetítette 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-közvetítette immunválaszában.

5. Az eredmények gyakorlati hasznosulásának lehetőségei

A veleszületett immunitás szabályozásában résztvevő gének várhatóan potenciális terápiascélpontokként, 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, Zsámboki 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, Lemaître 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 (H2), [Kurucz és mtsai., 2003].
Plazmatocita specifikus anti-NimC1 (P1a, P1b), [Kurucz és mtsai., 2007].
Lamellocita specifikus anti-Atilla (L1a, b, c), anti-L2, anti-mioszferoid (L4), anti-L6, [Kurucz és mtsai., 2007b].
A kristályejt specifikus monoklonális ellenanyagot anti-C1 Prof Tina Trenczek Giessen University, Germany.
Az IgG izotípus kontrollként használt (T2/48) ellenanyag [Ando és mtsai., 1984] mely a humán leukocitákon kifejeződő CD45 molekulát ismeri fel.

Másodlagos ellenanyagok és reagensek:

Anti-GFP antibody (Mol. Probes, 1:2000)
Anti-egér-FITC Ig (DAKO, 1:100)
Anti-egér Alexa Fluor 488 (Mol. Probes, 1:1000)
Anti-egér Alexa Fluor 568 (Mol. Probes, 1:1000)
Anti-egér AlexaFluor 633(Mol. Probes,1:1000)
Biotinnal konjugált anti-egér Ig (Dako, 1:500)
Anti-egér HRPO (Amersham, 1:5000)
Streptavidin-HRPO (Dako, 1:3000)
Streptavidin-Cy3 (Dako, 1:3000)
Streptavidin-Cy3 (Amersham, 1:500)

Drosophila törzsek

Oregon R: vad típus.

white¹¹¹⁸: vad típus.

A **Headcase-LacZ** [Weaver és White 1995] törzs enhanszer csapdázással készült. Ezekben a lárvákban az adult primordiális szövetekben, és a központi nyirokcservben a bakteriális β-galaktoszidáz fejeződik ki, ez a kifejeződési mintázat a *headcase* gén kifejeződési mintázatát követi.

l(3)mbn-1 (lethal (3) malignant blood neoplasm) [Konrad és mtsai. 1994]. Az *l(3)mbn-1* tumor szuppresszor gén EMS indukálta recesszív letális mutációja. Az *l(3)mbn-1* egy hemocitákat túltermelő törzs, a lárvában a hemociták minden típusa, és fejlődési alakja jelen van. A homozigóták a 3. lárvális stádiumban, vagy a bábozódáskor pusztulnak el. A homozigóta *l(3)mbn-1* lárvák hemocita száma a vad típusú Oregon R lárvák hemocita számának 150-szerese [Gateff és mtsai. 1977]. Az *l(3)mbn-1* homozigóta lárvákban melanizált tumorok fejlődnek. A kísérletekhez 3. stádiumú lárvák hemocitáit használtuk.

Hemese>Gal4 (w[*]; P{w[+mC]=He-GAL4.Z}85) [Zettervall és mtsai. 2004]. A lárvák hemocitáin megnyilvánuló *Hemese* gén [Kurucz és mtsai. 2003] promóterének 1 kb hosszúságú szakaszát tartalmazza, mely a konstrukcióban a GAL4 észlelő transzkripció faktor génjének expresszióját aktiválja. Ez a konstrukció hemocita specifikus Gal4 expressziót eredményez és a lárvákban a hemociták több mint 85% -a kifejezi a GFP-t.

He>GFPnls (p{UAS-GFP.nls}GFP) a ***Hemese>Gal4*** rekombináns törzs a riporter *P{UASGFP}*.

*nls*8 konstrukciót is tartalmazza a harmadik kromoszómán, ami a hemocitákban sejtmagi GFP expressziót eredményez.

1560-R2 RNSi/CyO,Kr-GFP a *CyO,Kr-GFP* balanszer kromoszóma felett hordozza a *mioszferoid* RNS interferencia konstrukciót, aminek kifejeződését az UAS szekvencia szabályozza.

Y81 cecropin A1 promóterrel meghajtott Lac-Z transzgenikus törzs [Roos és mtsai. 1998]

dom1 P elem indukálta hemocita hiányos *Drosophila* mutáns, melynek harmadik lárv stádiumában melanizálódik a lymph gland-je.

cher1 funkcióvesztéses mutáns, melyben a Filamin-240 izoforma hiányzik, a nőstények sterilizását a gyűrűcsatornák szerveződési hibája okozza. [Sokol és mtsai. 1999, Li és mtsai. 1999].

P[hs-FLN1-20];cher1 menekítő törzs [Sokol és Cooley 2003], amelyben a hsp 70 promóter hajtja meg a teljes hosszúságú cheerio cDNA-t a *cher1* homozigóta mutáns háttéren.

hml<GFP (*hml-GAL4, UAS-GFP*).

Headcase>LacZ [Weaver és White 1995],

Hml>Gal4,4, UAS-2XEGFP; l(3)mbn-1 [Goto és mtsai., 2003].

Parazitoid darázs törzs:

Leptopilina boulardi G486

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 gyűjtemény [Baba T és mtsai. 2006] az *E. coli*, *E. coli*-GFP, BL21 Genetic Resources at Yale CGSC, The Coli Genetic Stock Center-ből.

Monoklonális ellenanyagok előállítása

Az *l(3)mbn-1* hemocita túltermelő mutánsból izolált 2×10^6 hemocitával nőstény BALB/c egereket immunizáltunk három alkalommal, három hetes időközökkel. Az utolsó immunizálás után három nap elteltével az egerek lépesejtjeiből 5% borjúszerűot és 10 mM glutamint tartalmazó RPMI-1640 szövettenyésztő médiumban szuszpenziót készítettünk. A lépesejteket Sp2/0 egér myelomasejtekkel fúzionáltattuk polietilén-glikol (PEG-1540) jelenlétében. A hibridóma sejteket HAT médiumon szelektáltuk és tenyésztettük [Köhler és Milstein 1976]. Kísérleteinkben a többszörösen klónozott hibridóma sejtek felülűszoját, illetve a felülűszoikból ProteinG Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) oszlopon tisztított ellenanyagokat használtuk.

Schneider 2 (S2) sejtvonala [Schneider 1972]: Az S2 sejtvonala kései *Drosophila* embrióból származik. A sejtvonalat többféle sejt keveréke alkotja, makrofág és epithél szerű sejtekből áll, melyek szemi-adherens kultúrát képeznek.

Hemociták izolálása *Drosophila* lárvából

A lárvákat *Drosophila* Ringer oldattal történő mosást követően jéghideg $30 \mu\text{l}$ 0,1 mg/ml, 1-fenil 2-tiourea (PTU) *Drosophila* Ringer oldatban, 12 lyukú mikroszkópos tárgylemezen (Hendley Ltd., Essex, GB) bontottuk.

Immunhisztokémia

A *Drosophila* hemocitákat 12 minta felvitelére alkalmas mikroszkópos tárgylemezre (Hendley Ltd., Essex, GB) tapasztottuk 45 percig, majd 15 percig 2%-os paraformaldehiddel, vagy 6 percig acetonnal fixáltuk. A mintákat PBS-ben 3×5 percig mostuk, 0,1% bovine serum albumin (BSA) PBS oldattal 20 percig telítettük, majd a hibridóma felülűszoval 1 óráig szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltuk. Ezután a mintákat 3×5 percig mostuk, 1 óráig keresztl nedves kamrában biotinnal konjugált anti-egér ellenanyaggal (1:500 hígítás 0.1% BSA-PBS-ben) inkubáltuk. Az újabb 3×5 perces PBS-ben történő mosást követően 1 órán át inkubáltunk Streptavidin-HRPO-val (1:300). A mintákat 3×5 percig PBS-ben, majd 10 percig 1 M Na-acetát pufferben (pH 4,6) mostuk, majd amino-etil-karbazol (AEC) kromogén oldattal (1,5 ml Na-acetát puffer, 75 ml 1%-os AEC törzsolat, 1 ml H_2O_2 szubsztrát oldat) festettük. A mintákra beágyazó médiumot [$3,6 \text{ ml}$ 1M Tris (pH 8,6), 9 ml glicerint, $26,4 \text{ ml}$ dH₂O] cseppentettünk, majd a tárgylemezeket mikroszkópos fedőlemezzel fedtük.

Indirekt immunfluoreszcencia

A módszer megegyezik az immunhisztokémiánál leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a biotinált anti-egér ellenanyaggal történt inkubálás után, a 3 x 5 perces PBS mosást követően Streptavidin-Cy3-t adtunk a mintákhoz. Ezt 45 perc inkubáció követte szobahőmérsékleten, nedves kamrában. A sejtmagvakat DAPI -val (Lifetechnologies, 1:300 hígítás) tettük láthatóvá. A mintákat beágyazó médiummal és mikroszkópos fedőlemezzel fedtük. A mintákat Zeiss Axioskope mikroszkóppal vizsgáltuk.

Élő hemociták indirekt immunfluoreszcencia festése

Szövettenyésztő lemez (Corning Life Sciences) mélyületeibe harmadik stádiumú lárvákból izolált 2×10^5 hemocitát helyeztünk, 20 μ l, 10% borjúszerűmot tartalmazó Schneider's rovar szövettenyésztő (Life Science Technologies) tápfolyadékban. Az elsődleges ellenanyagból mintánként 50 μ l-t mértünk majd 45 percen át inkubáltuk jégén. A sejteket háromszor mostuk jéghideg Schneider's táptalajban, majd hozzáadtuk a másodlagos ellenanyagot, FITC-tal jelölt anti-egér immunglobulint (Sigma1:100), vagy Alexa Fluor 633 - jelölt anti-egér immunglobulint (Invitrogen1:1000), vagy Alexa Fluor 488 jelölt anti-egér immunglobulint (Invitrogen1:1000), majd 45 percen át jégén inkubáltuk. A sejteket háromszor mostuk jéghideg Schneider's táptalajban, majd a fluoreszcencia intenzitásukat FACSCalibur áramlási citométerrel határoztuk meg. A mintákat Zeiss Axioskope mikroszkóppal és 2MOTepifluorescent and an Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Parazitoid darázzsal történő immunindukció

A *Drosophila* nőtényeket petéztettük, majd 72 óra elteltével 50 lárvát 8 *Leptopilina bouladri* G486 nőtény darázzsal 2 órán át inkubáltuk 25°C-on, majd a darazsakat eltávolítottuk. A lárvákat standard *Drosophila* táptalajon tartottuk 25°C-on. A fertőzött lárvákat a darázsszűrás helyén látható melanizált heg, vagy a lárvákban található melanizált darázs peték illetve tokok alapján azonosítottuk. Kontrollként darázzsal nem immunindukált, a fertőzött lárvákkal egykorú egyedeket használtunk.

Drosophila lárvá steril sebzése

A második stádiumú *Drosophila* lárvákat steril fülkében, *Drosophila* Ringer oldattal történő mosást követően 10 percig 75%-os alkoholba helyeztük. Ezt követően a lárvákat steril mikroszkópos tárgylemezre helyeztük. Az alkohol párolgása következtében a lárvák a tárgylemezhez tapadtak. A darázs tojócsővéhez hasonló méretű steril mikrokapillárisal a lárvák poszterior végét megszártuk, majd a lárvákat sterilizált, szűrőpapírral bélelt, nedves kamrába helyeztük. Két órával a szűrást követően a lárvákat standard *Drosophila* táptalajra helyeztük.

Ligatúra

A darázsfertőzést követő 16 óra elteltével a *Drosophila* lárvák anterior és poszterior részét a test középső részére helyezett műanyagszál segítségével létrehozott ligatúrával elválasztottuk, majd a lárvákat két napig, 25°C-on, nedves kamrában tartottuk. Ezután az anterior illetve a poszterior részt külön boncoltuk.

Kutikula preparátumok készítése

A különböző korú, illetve különböző kezelésnek alávetett lárvákat gumi alapú boncoló korongon, minutia rovarűtő és csipeszek segítségével boncoltuk. A lárvák kutikuláját hosszanti irányban bontottuk, a szívcső, a központi vérképző szerv, és az agy kivételével valamennyi belső szervet eltávolítottunk, majd fixáló oldattal (2% paraformaldehid, 0,05% Triton-X 100 PBS-ben) rögzítettük. Az így előkészített preparátumokat 2 x 10 perces, PBS-ben történő mosást követően indirekt immunfluoreszcencia festésnek vetettük alá.

Hemocita transzplantáció

A *Cg>GAL4 x Hemese>GAL4, UAS>GFPnls* szülőktől származó F1, sejtmagi GFP markerrel jelölt donor lárvákat *Drosophila* Ringer oldatban boncoltuk. A hemocita transzplantációhoz szükséges GFP-vel jelölt hemocitákat, transzplantációként két donor lárvából izoláltuk. A lárvákat mikroszkópos tárgylemezre bontottuk, a kifolyó hemolimfát mikrokapillárisba felszívtuk, majd azonnal a recipiens harmadik stádiumú vad típusú Oregon R lárvába injektáltuk. Az injektált lárvákat nedves kamrában két órára szűrőpapírra helyeztük, majd a lárvák túlélését epifluoreszcens binokuláris mikroszkóppal (Leica) ellenőriztük. A recipiens lárvákban a transzplantált hemociták a kutikulán keresztül is láthatók.

Western blot analízis

A hemocita mintákat redukáló, vagy nem redukáló minta pufferben főztük 5 percig, centrifugáltuk, majd SDS poliakrilamid gélelektroforézisnek (SDS-PAGE) vetettük alá. A gélben elválasztott fehérjéket 4°C-on nitrocellulóz

filterre vittük át. Ezután a nitrocellulózt zsírmentes tejporból készített oldatban 1 órán keresztül telítettük, majd a hibridóma felülúszókban inkubáltuk. Ezt követően a nitrocellulózt Trissel pufferelt fiziológias sóoldatban (TBS) mostuk 3 x 10 percen át, majd az anti-egér-HRPO-val (1:5000, 1% BSA-TBS-ben) 1 órán keresztül inkubáltuk. Ezt 3x10 perces mosás követte TBS-ben, majd a reakciót ECLplus oldattal (Amersham) a gyártó utasításai szerint hívtuk elő.

Immunprecipitáció

Az ellenanyagot Protein-G Sepharose gyöngyökhöz kötöttük, majd 20 mM Dimethyl pimelimidate dihydrochloride (DMP) kovalensen keresztkötöttük. A gyöngyöket ezután TBS-sel 3 x mostuk, majd a sejtlyázummal egy éjszakán át 4°C -on inkubáltuk. A felülúszó eltávolítása után a gyöngyöket lízis pufferrel mostuk, SDS mintapufferben felvéve 1 órán át 56°C-on inkubáltuk, majd öt perces forralást követően SDS-PAGE-n futtattuk.

Tirozin foszforiláció kimutatása

A hemocitákból 20 mM NaF és 5 mM NaVO₄ tartalmú lízis pufferrel kivonatot készítettünk, amelyet immunprecipitálást követő Western-blot analízisnek vetettünk alá egér anti-foszfotirozin (PY20) (Abcam) és tormaperoxidázal konjugált anti-egér (Abcam) ellenanyagokat felhasználva.

Az *atilla* mutánsok létrehozása

Az *atilla* mutánsokat a Szegedi *Drosophila* Törzsközpontban elérhető *EP(2)364* homozigóta életképes inszerció remobilizálásával hoztuk létre, amely az *atilla* gén 3' végétől 1 kb távolságra helyezkedik el. A régióval átfedő nagyobb méretű deléciót hordozó *Df(2L)Prl/CyO* törzset a transzpozáz forrást biztosító *Sp/CyO*; $\Delta 2-3Sb/TM6Ubx$ törzzsel kereszteztük. A keresztezésből kiválasztottuk azokat a hímekeket, amelyek a 2. kromoszómán a deléciót, a 3. kromoszómán pedig a transzpozáz gént hordozzák. Ezeket a hímekeket kereszteztük a homozigóta életképes *EP(2)0364* P-elem inszerció nőtényekkel. A keresztezésből a jumpstarter hímekeket, azaz olyan sárga szemű hímekeket gyűjtöttük, melyek a 2. kromoszómájukon a P-elem inszerciót, a 3. kromoszómájukon pedig a transzpozáz gént hordozták. A jumpstarter hímekeket egyedenként a 2. kromoszómás balanszert hordozó *SM6b/Sco* szűz nőtényekkel kereszteztük. A P-elem kivágódását a szemszín markert elvesztése jelzi. A fehér szemű egyedi hímekekből genomi DNS-t izoláltunk és a deléciót az EP elem 5' oldalára (K) és a gén 5' elejére (L) tervezett primerek felhasználásával polimeráz láncreakcióval határoztuk meg. Mivel az *SM6b* balanszer az *atilla* génben töréspontot tartalmaz, ami az L primer komplementer szekvenciájának elvesztésével is jár, a P-elem pontos kivágódását *SM6b* balanszer felett a vad típusú fragment hiánya jelezte. A felhasznált primerek szekvenciái:

K (forward): 5'-TACTTCTTATATGACCGCTACGA-3',

L (reverse): 5'-GAGATTTTCCGAACCTTGACGA-3',

CG6579 F reverse primer (a gén intronjában): 5'-GAGCCTGTGACTCATTTAGAAG-3',

Pry4 P-elem specifikus primer: 5'-CAATCATATCGCTGTCTCACTCA-3'.

A P-elem remobilizáció során kapott deléciók: *atilla*₄₀, *atilla*₄₁, *atilla*₂₇₅, *atilla*₃₀₉, *atilla*₃₄₆, *atilla*₃₇₁, *atilla*₃₇₆, *atilla*₃₈₇ és az *atilla* gént nem érintő kontroll excíziók:

*atilla*₂₆₇, *atilla*₂₉₁, *atilla*₃₄₁, *atilla*₃₄₂, *atilla*₃₄₃, *atilla*₃₈₄.

Genomi DNS izolálás

Száz felnőtt egyed -80°C-on lefagyasztottunk, majd 2 ml grinding pufferben (0.2 M szukróz, 0.1 M Tris, pH 9.2, 50 mM EDTA, 0.5% SDS) homogenizáltunk, és 30 percig 65°C-on inkubáltunk. Ezután 300 µl 8 M K acetátot adtunk a mintához, melyet szuszpendáltunk, 30 percen át jégen inkubáltunk, majd 10 percen át szobahőmérsékleten Eppendorf centrifugában (11200 g) centrifugáltunk. Ezután a mintához azonos mennyiségű -20 °C-os 95%-os etanolt adtunk, felsuszpendáltuk és 5 percen át centrifugáltuk (11200 g). A DNS üledéket -20°C-os 70%-os etanollal mostuk, ezután szárítottuk, végül 300 µl TE pufferben oldottuk és -20°C-on tároltuk.

Teljes RNS izolálása lárvából és hemocitákból

Az RNS tisztításához az üvegedényeket DEPC tartalmú desztillált vízben áztattuk egy éjszakán át szobahőmérsékleten, majd a DEPC eltávolítása érdekében 30 percig autoklávoztuk. A lárvákat, illetve a sejteket TRIzol reagensben (Invitrogen) homogenizáltuk (80 mg lárv / 1 ml TRIzol reagens, 8 x 10⁶ sejt / 1ml TRIzol reagens), 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a mintához kloroformot adtunk (0,2 ml kloroform / 1ml TRIzol). A homogenizátumot 15 mp-ig erőteljesen ráztuk, 3 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 15 percig 4°C-on centrifugáltuk (11200 g) A vizes fázist friss csöbe téve az RNS-t izopropil-alkohollal kicsaptuk, majd 30 percig 4°C-on centrifugáltuk (16100 g). Az üledéket 1 ml 70% etanolban mostuk, majd 5 percig 4°C-on

centrifugáltuk (6300 g). A felülúszót eltávolítottuk, az üledéket levegőn szárítottuk, majd 50 µl DEPC kezelt vízben oldottuk fel, majd az RNS koncentrációjának meghatározását követően a mintákat -80°C-on tároltuk.

Az *atilla* specifikus mRNS kimutatása hemocitákban

Az *atilla* gén lamellocitákban történő RNS szintű átíródását az *atilla* génre specifikus primerpár felhasználásával reverz transzkripcióval kapcsolt polimeráz láncreakció módszerével vizsgáltuk. A forward primert az 5' nem transzlálódó régióba, a reverz primert a kódoló szakasz 3' végére terveztük, annak érdekében, hogy a közbeeső intronszekvencia miatt a cDNS-ről származó PCR termék a mérete alapján megkülönböztethető legyen a genomikus DNS-ről származó PCR fragmenttől.

Expressziós génkönyvtár készítése és tesztelése

Teljes RNS izolálása

A teljes RNS izolálásához a TRIzol Plus RNA Purification Kit-et használtuk, a gyártó használati utasítása szerint. Az *l(3)mbn-1* genotípusú lárvákból származó 1,18 x 10⁸ hemocitát 8 ml TRIZOL reagenssel lizáltuk, a mintához öt perces szobahőmérsékleten történő inkubálás után 2 ml kloroformot adtunk, majd keverés után újabb 2 percig inkubáltuk. Ezt követően a mintát 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk (11200 g), melynek során az RNS a felső vizes fázisba került. Az RNS-t 5 ml izopropil-alkohollal csaptuk ki. Tíz perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után az elegyet 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk (11200 g). Az RNS gélyszerű csapadékként jelent meg a centrifugácső oldalán, a felülúszót eltávolítottuk, az RNS üledéket 75%-os etanollal mostuk, majd 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk (6300 g). Az RNS mintát szárítás után DEPC kezelt vízben felfuszpendáltuk, majd az oldat RNS koncentrációját, NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) spektrofotométerrel 260 nm-en mért optikai denzitása alapján határoztuk meg.

Poli(A)+RNS izolálás

A poly(A)+RNS izolálást az Amersham illustraTM mRNA Purification Kit-tel végeztük, a gyártó használati utasítása szerint. A teljes RNS mintákat 5 percig inkubáltuk 65 °C-on, majd jégen lehűtöttük, és 200 µl minta puffert hozzáadva oligo dT cellulóz oszlopokra vittük. Az oszlopokat 2 percig centrifugáltuk (350 g) majd kétszer mostuk 250 µl magas sókoncentrációjú pufferrel (Kit), háromszor pedig 250 µl alacsony sókoncentrációjú pufferrel (Kit), amivel eltávolítottuk a dT oszlophoz nem kötődött, nem poliadenilált RNS-eket. Ezután az oszlopokat 250 µl 65 °C-os elúciós pufferrel négyszer mostuk. A frakciókat összegyűjtöttük, és 100 µl mintapuffer, 10 µl glikogén oldat és 2,5 ml jéghideg etanol hozzáadását követően két órán keresztül -20 °C-on inkubáltuk. A kicsapott RNS-t DEPC kezelt vízben felfuszpendáltuk.

cDNS szintézis

A cDNS szintézishez és az expressziós génkönyvtár előállításához a ZAP Express cDNA Synthesis Kit and ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit-et (Stratagene) használtuk a gyártó utasításai szerint. A cDNS szintéziséhez 8,2 µg mRNS használtunk. Az első szál szintéziséhez 5 µl 10-szeres töménységű első szál puffert, 3 µl metilált dNTP keveréket, 2 µl linker primer oldatot, 1 µl RNáz inhibitor oldatot, 37,5 µl DEPC kezelt vízzel hígított mRNS oldatot (5 µg mRNS) elegyítettünk, majd ezt az elegyet 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután hozzáadtunk a keverékhez 1,5 µl AccuScript RT enzimet. A reakcióelegyet keverés után centrifugáltuk, majd egy órán keresztül 42 °C-on inkubáltuk. A második szál szintéziséhez 20 µl 10-szeres töménységű második szál puffert, 6 µl dNTP keveréket (nem metilált), 114 µl steril desztillált vizet, 2 µl RNáz H-t és 11 µl DNS polimeráz I-t elegyítettünk, majd az elegyet óvatos keverés után centrifugáltuk, ezután 16 °C-on 2,5 órán át inkubáltuk.

cDNS végek feltöltése

A jégen tartott reakcióelegyhez 23 µl feltöltő dNTP keveréket és 2 µl Pfu DNS polimerázt adtunk. Az elegyet óvatosan kevertük, majd Eppendorf centrifugában 2 másodpercig centrifugáltuk (16100 x g) és 30 percig 72 °C-on inkubáltuk. Az inkubálás után 200 µl fenol:kloroform 1:1 v/v arányú keverékét adtuk hozzá és óvatosan elkevertük. A mintát két percig, szobahőmérsékleten centrifugáltuk (16100 x g), majd a cDNS-t tartalmazó felső vizes fázist egyenlő térfogatú kloroformmal kevertük össze és az elegyet újabb két percig centrifugáltuk (16100 x g). A felső fázishoz 20 µl 3 M Na-acetátot és 400 µl 100%-os etanolt adtunk, összekevertük, majd egy éjszakán át -20 °C-on inkubáltuk. Másnap, 16 óra elteltével, a jégen felolvasztott mintát 1 órán keresztül, 4 °C-on, centrifugáltuk (16100 x g), a felülúszót eltávolítottuk, és a csapadékot 500 µl 70%-os etanollal óvatosan mostuk. Ezután a mintát 2 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk (16100 x g). A csapadékot szárítást követően 9 µl EcoRI restrikciós hasító hellyel ellátott adapter molekulát tartalmazó oldatban hagytuk feloldódni, majd 30 percig 4 °C-on inkubáltuk.

Adapterek ligálása

A cDNS-t és EcoRI restrikciós hasító hellyel ellátott adapter molekulát tartalmazó szuszpenzióhoz 1 µl tízszeres töménységű T4 ligáz puffert (Stratagene), 1 µl 10 mM ATP-t és 1 µl T4 DNS ligáz oldatot adtunk, majd 2 percig

centrifugáltuk (16100 x g). Ezt követően a mintát egy éjszakán át inkubáltuk 8 °C-on, majd a ligáz enzimet 30 percig 70 °C-on inaktívtuk.

EcoRI végek foszforilálása

Az EcoRI adapterrel ligált cDNS-t tartalmazó mintát 2 percig centrifugáltuk (16100 x g), ezután 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd hozzáadtunk 1 µl tízszeres töménységű ligáz puffert (Stratagene), 2 µl 10mM rATP-t, 5 µl steril tridesztillált vizet és 2 µl T4 polinukleotid kinázt. Az elegyet 2 percig 37 °C-on centrifugáltuk (16100 x g), majd 70 °C-on 30-30 percig inkubáltuk, 2 percig ismét centrifugáltuk (16100 x g) és ezt követően 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

XhoI emésztés

A foszforilált EcoRI hasító helyben végződő cDNS-t tartalmazó mintához hozzáadtunk 28 µl XhoI puffert és 3 µl XhoI restriktációs endonukleáz enzimet, majd másfél óráig 37 °C-on inkubáltuk. Ezután hozzáadtunk 5 µl tízszeres töménységű STE puffert és 125 µl 100%-os etanolt, majd egy éjszakán át -20 °C-on inkubáltuk. Másnap 4 °C-on egy órán keresztül centrifugáltuk (16100 x g). A felülúszót eltávolítottuk, a csapadékot megszáritottuk, majd 14 µl egyszeres töménységű STE pufferben felfuszpendáltuk és 3,5 µl töltőpuffert adtunk hozzá.

Méret szerinti frakcionálás

A cDNS mintákat STE pufferrel átmosott Sepharose CL-2B oszlopon frakcionáltuk. Miután meghatároztuk az egyes frakciók DNS koncentrációját, a frakciókból vett mintákat agaróz gél-elektroforézisnek vetettük alá. A kettős szálú DNS-t tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és a cDNS-t precipitáltuk.

cDNS precipitálása

A cDNS mintához azonos mennyiségű fenol-kloroform 1:1 arányú elegyét adtuk, majd keverés után két percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk (16100 x g). A felső vizes fázishoz azonos térfogatú kloroformot adtunk, összekevertük és két percig centrifugáltuk (16100 x g), majd kétszeres térfogatú 100%-os etanollal egy éjszakán át -20 °C-on precipitáltuk, a precipitáláshoz szükséges NaCl-t a STE puffer tartalmazta. Másnap (16 óra elteltével) a mintákat egy órán keresztül 4 °C-on centrifugáltuk (16100 x g). A felülúszó eltávolítása után a csapadékot 200 µl 80%-os etanollal óvatosan mostuk, majd 2 percig centrifugáltuk (16100 x g). A felülúszót eltávolítottuk, az üledéket szobahőmérsékleten színtelenedésig szárítottuk, majd 5 µl steril vízben felfuszpendáltuk. A minták DNS tartalmát agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, a DNS koncentrációját Nanodrop készülékkel (Thermo Scientific) határoztuk meg. Az *l(3)mbn-1* hemocitákból készített minta 2,4 µg cDNS-t tartalmazott.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A reverz transzkripció ellenőrzésére mind az egyes, mind a kettős szálú mintákból 0,5 µl-t használva PCR-t végeztünk, kontrollként az rp49 riboszómális fehérjére specifikus primereket használtunk. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen futtattuk.

A cDNS inszert ligálása

A 100 ng cDNS-t tartalmazó szuszpenzióhoz 0,5 µl tízszeres töménységű ligáz puffert (Stratagene), 0,5 µl 10 mM ATP-t, 1 µl ZAP Express EcoRI és XhoI restriktációs endonukleázokkal előemésztett vektort és 0,5 µl T4 DNS ligáz enzimet adtunk, majd a reakcióelegyet egy éjszakán át 12 °C-on inkubáltuk.

Fertőzőképes fág *in vitro* összeállítás

A fágfehérje kivonathoz (Gigapack III Gold Packaging Extract) 2,5 µl klónozóvektorba ligált cDNS-t tartalmazó mintát adtunk, óvatosan összekevertük, két másodpercig centrifugáltuk (16100 x g), majd két órán keresztül szoba hőmérsékleten inkubáltuk, mialatt a klónozó vektort tartalmazó fertőzőképes fágok képződtek. Ezt követően a fág szuszpenzióhoz 500 µl SM puffert és 20 µl kloroformot adtunk, majd óvatos keverés után 2 másodpercig centrifugáltuk (16100 x g). A fágkönyvtárat tartalmazó felülúszót titráltuk és kék-fehér analízisnek vetettük alá.

Titrlás és kék-fehér szelekció

Tetraciklinnel kiegészített LB agar lemezen egy éjszakán át 37 °C-on növesztett XL1-Blue MRF' baktérium telepéből 50 ml-es folyadékkultúrát készítettünk (OD₆₀₀ 1,0). A baktériumkultúrát 10 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk (1000 x g). A baktérium üledéket 25 ml 10 mM MgSO₄ oldatban felfuszpendáltuk és OD₆₀₀ 0,5-re hígítottuk. A baktérium kultúrát egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk, majd 200 µl baktérium szuszpenzióhoz az elsődleges fágkönyvtárból 1 µl-t, egy másik 200 µl baktérium szuszpenzióhoz a tízszeresre hígított elsődleges fágkönyvtárból szintén 1 µl-t adtunk. A fággal fertőzött baktériumkultúrákhoz 15 perces 37 °C-on történő inkubálás után 3 ml 48 °C-os 15 µl 0,5M IPTG-t és 50 µl 250 mg/ml X-gal-t tartalmazó 0,6%-os NZY fedőagart adtunk, amit 1,5 %-os NZY agarlemezre szélesztettünk és 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltunk. Másnap megszámloltuk a kék és a fehér telepeket és a kit használati utasításában megadott képlet alapján (Plakkok száma x hígítás x teljes pakolási térfogat (520 µl)/teljes bepakolt DNS mennyiség (µg) x szélesztett térfogat (µl) meghatároztuk a fágkönyvtár titerét (1,9 x 10⁶ plaque-forming unit (pfu) /ml).

Könyvtárak amplifikálása

Az elsődleges expressziós génkönyvtárak instabilitása miatt egy héten belül elvégeztük a génkönyvtár amplifikálását. Az XL1-Blue MRF⁺ baktérium kultúra (OD₆₀₀ 0,5) 600 µl-es aliquotjait 5 x 10⁴ faggal fertőztük, majd 15 perces 37 °C-on történő inkubálás után 6,5 ml 48 °C-os 0,6%-os NZY fedőagarral elkeverve 1,5 %-os NZY agarlemezre szélesztettük. Ezt követően a lemezeket 6 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd a fedőagar felületére 8 ml SM puffert vittünk fel, és egy éjszakán át 4 °C-on vízszintesen mozgatva inkubáltuk a lemezeket. Másnap a lemezekről összegyűjtöttük a baktériumokból kiszabadult fágokat tartalmazó SM puffert, azaz a fágkönyvtárat és titráltuk (1,6 x 10⁹ pfu /ml).

A cDNS expressziós génkönyvtárak ellenanyaggal történő tesztelése

Az XL1-Blue MRF⁺ baktérium kultúra (OD₆₀₀ 0.5) 600 µl-éhez az *l(3)mbn-1* hemocita cDNS expressziós génkönyvtárból 10⁴ fágot tartalmazó szuszpenziót adtunk. A keveréket 15 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd 6,5 ml 48 °C-os 0,6%-os NZY fedő agarral összekevertük, és 37 °C-ra előmelegített 1,5%-os NZY agar lemezre szélesztettük. A lemezt 5,5 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a tűszűrősszerű tarfoltok megjelenéséig. Ezután a fedő agarra 100 mM izopropil-β-D-thiogalaktopiranoziddal (IPTG) kezelt HyBond C nitrocellulóz filtert tettünk, és így inkubáltuk a lemezt egy éjszakán át 37 °C-on. Másnap a nitrocellulóz filtert levettük a lemeztől, és egyszeres töménységű TBS pufferrel leöblítettük. A telítést 5%-os tejpor-TBS oldatban végeztük egy órán keresztül, folyamatos himbálással. Ezt követően a filtert ismét TBS pufferrel öblítettük, majd az elsődleges egér monoklonális ellenanyaggal 3 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Másnap a nitrocellulóz membránt TBS pufferben háromszor mostuk, majd 1%-os BSA-TBS oldatban tormaperoxidázzal konjugált anti-egér ellenanyaggal (1:1000) egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubálás után a membránt háromszor mostuk TBS pufferben, majd az ECL Plus reagens (Amersham) segítségével 5 perc inkubálás után ólomkazettába helyezve röntgenfilmre vetítettük és a röntgenfilmet előhívtuk. A röntgenfilmen megfeketedő foltoknak megfelelő tarfoltokat a lemezeken visszakerestük, és kivágtuk a fedőagarból. A tarfoltokból a fágokat 500 µl SM pufferben kioldottuk és 1,5 µl kloroformmal kiegészítve 4 °C-on tároltuk. Az azonosított fágokat kisebb koncentrációban kétszer egymás után újra teszteltük annak érdekében, hogy a tarfoltok egymástól kellő távolságban helyezkedjenek el ahhoz, hogy homogén, azaz egyféle cDNS-t hordozó fágokat izoláljunk.

Az azonosított cDNS-t tartalmazó fágok felszaporítása

A kétszeresen izolált faggal ferőzött XL1-Blue MRF⁺ baktérium kultúra felhasználásával a fent ismertetett módon fedőagart szélesztettünk. A lemezeket 6 óráig 37 °C-on inkubáltuk, majd 5 ml SM puffert vittünk fel a lemezek felületére és 24 órán át vízszintesen mozgatva inkubáltuk azokat 4 °C-on. A lemezekről az SM pufferbe kioldódott fágokat összegyűjtöttük, a baktériumokat centrifugálással eltávolítottuk és a felülúszóban titrálással meghatároztuk a fágok koncentrációját.

In vivo excízió:

Az azonosított cDNS inszertet tartalmazó pBK CMV fágmidet a ZAP Express vektorból interferencia rezisztens helper fág segítségével vágtuk ki, mivel a pBK CMV fágmid fonalas fág formában képes fertőzni az XL0LR *E. coli* törzset, és abban plazmidként felszaporítható. Tetraciklinel kiegészített LB agar lemezen egy éjszakán át 37 °C-on növesztett XL1-Blue MRF⁺ és XL0LR baktériumtörzsekből 50-50 ml-es kultúrákat készítettünk (OD₆₀₀ 1.0). A kultúrákat 10 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk (1000 x g). A felülúszót eltávolítottuk, az üledéket 10 mM MgSO₄ oldatban felfuszpendáltuk és OD₆₀₀ 1.0-ra hígítottuk, majd 200 µl XL1-Blue MRF⁺ kultúrát 10⁵ fágot tartalmazó szuszpenzióval és 10⁶ ExAssist helper faggal fertőztünk. A keveréket 15 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd hozzáadtunk 3 ml kiegészített LB tápoldatot, és három órán keresztül 37 °C-on rázatva inkubáltuk. Ezt követően húsz perc 70 °C-on történő inkubáció során lizáltuk a sejteket, így a fágmid vektor fonalas fág formájában az oldatba került. Ezután a keveréket 15 percig centrifugáltuk (1000 x g). A fonalas fágot tartalmazó felülúszó 100 µl-ével 200 µl XL0LR kultúrát (OD₆₀₀ 1.0) fertőztünk, és a keveréket 15 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően hozzáadtunk 300 µl NZY tápoldatot, és 45 percig 37 °C-on kevertetve inkubáltuk. A keverékből 200 µl-t kanamicinnel kiegészített LB agarlemezre szélesztettünk, és egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. A lemezen kinőtt telepekből plazmid DNS-t izoláltuk.

Plazmid DNS izolálása „alkalikus lízis miniprep” módszerrel

Egyedi baktériumtelepeket LB táptalajban egy éjszakán át 37 °C-on rázatva inkubáltuk, majd 1,5 ml baktériumsuszpenziót egy percen át centrifugáltuk (18900 rpm). Az üledékhez 100 µl 0 °C-os I. oldatot (50 mM glükóz, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) adtunk, majd vortex-szel szuszpendáltuk. A szuszpenzióhoz hozzáadtunk 200 µl frissen készített II. oldatot (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS), majd óvatosan összekevertük. Ezután a mintához hozzáadtunk 150 µl jéghideg III. oldatot (60 ml 5 M Kálium-acetát, 11,86 ml Ecetsav (96%), 28,14 ml desztillált víz), majd óvatosan összekevertük. A keveréket öt percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd egy percig centrifugáltuk (12000 g). A felülúszóhoz 1 ml etanolt (96%) adtunk, vortex-szel kevertük, húsz percen át -20 °C-on inkubáltuk, majd húsz percig 4 °C-on centrifugáltuk (12000 g). A felülúszót eltávolítottuk, majd a DNS

csapadékot 200 µl etanollal (70%) mostuk. Ezt követően öt percen át centrifugáltuk (12000 g). A DNS üledéket szobahőmérsékleten szárítottuk, majd 50 µl TE pufferben feloldottuk és 1 µl 10 mg/ml RNáz A oldatot adtunk hozzá.

Restrikciós emésztés és agaróz gélelektroforézis

Az egyedi baktériumtelepekből készített plazmid DNS preparátumokat restrikciós endonukleázokkal (EcoRI, XhoI) történő emésztés után agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk. A 2 µl plazmid DNS-t tartalmazó mintához hozzámerünk 2,5 µl 10X puffert (Fermentas), 20,1 µl desztillált vizet, valamint 0,2 µl EcoRI és 0,2 µl XhoI restrikciós endonukleázt (10U/µl Fermentas). Az oldatot egy órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd az emésztési termékeket etidium-bromid jelenlétében agaróz gélelektroforézist követően UV fényben tettük láthatóvá. A gélképek alapján kiválasztottuk a reprezentatív mintákat és azokat megszekvenáltattuk.

Szekvenálás

EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit -tel (Bio-Basic) a szekvenálásra kiválasztott plazmid preparátumok 60 µl-éből visszaizoláltuk a DNS-t, amelyet 50 µl eluáló pufferrel (2mM TRIS-HCl pH 8.0) oldottunk le az oszlopról. Az izolált DNS-t T3 és T7 primerek felhasználásával az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Nukleinsav szekvenáló laboratóriumában szekvenáltattuk meg, majd az így kapott szekvenciákkal BLAST keresést végeztünk.

Géntermék csendesítés kettősszálú RNS interferenciával

A *nimC1* gén RNS inhibíciójához egy kettősszálú RNS (dsRNS) konstruktot készítettünk (AB186054), amelyben a *nimC1* gén 5' nem transzlálódó régiójának egy 403 bázispár hosszúságú szakaszát használtuk, amelyet mindkét orientációban egy pUAST vektorba klónoztuk, a wingless gén 1177 bázispár hosszúságú intronjával elválasztva. A konstruktot P-elem transzpozáz enzimet kódoló helper plazmid segítségével juttattuk a *w¹¹¹⁸* törzs genomjába. A kiválasztott szakasz, amelyből a kettősszálú RNS kialakul, mely egyetlen egyéb *D. melanogaster* génnel sem tartalmaz tizenhat bázispárnál hosszabb egyezést.

A NimC1 fehérje kifejeztetése a Schneider2 sejtvonalon

A *nimC1* gén kódoló régióját hordozó LP05465 vektorban, annak ellenőrzésekor azt tapasztaltuk, hogy a *nimC1* kódoló régió a genomi szekvenciához képest két bázispár deléciót tartalmaz az 1564. bázispárnál, aminek hatására a cDNS-ről csonkolt NimC1 fehérje íródik át. A hiba javításához, a *nimC1* génben található BamHI hasítóhelytől downstream irányban 1,8 kilobázis méretű szakaszt amplifikáltunk polimeráz láncreakcióval a genomi DNS templárról, majd ezt a fragmentet klónoztuk a pMT/V5-HisA vektorba. A *nimC1* pMT/V5-HisA vektort Effectene reagenssel (Qiagen) transzfektáltuk a Schneider-2 sejtekbe és a NimC1 fehérje kifejeződését réz-szulfát hozzáadásával indukáltuk.

FITC-tal jelölt baktérium készítése

A baktérium sejteket (10 ml OD₆₀₀ 1,5) háromszor mostuk PBS-ben és forrásban lévő vízben 1 órán át inaktívtuk. A hóvel elölt baktériumot 10 ml 0,25 M karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9,0) szuszpendáltuk, amelyben cseppenként hozzáadva, 100 µl DMSO-ban oldott 0,5 mg FITC-et oldottunk fel. A baktérium szuszpenziót egy éjszakán át forgatva inkubáltuk (4 °C), majd nyolcszor mostuk PBS-ben.

Fagocitózis tesztek

***In vivo* fagocitózis**

Mikrokapilláris segítségével 1 µl FITC-el jelölt baktérium szuszpenziót injektáltunk az élő lárvák testüregébe. A hemocitákat az injektálást követő 30 perc elteltével izoláltuk és fenotípusukat indirekt immunfluoreszcenciával határoztuk meg.

***In vitro* fagocitózis**

A hemocitákat (2x10⁶) FITC-el jelölt baktériumokkal szobahőmérsékleten inkubáltuk 20 percig, majd a sejtekhez tapadt baktériumok fluoreszcenciájának kioltására 0,2% tripánkéket adtunk a sejtuszuszpenzióhoz. A hemociták által fagocitált baktériumokat fluoreszcens mikroszkóppal, vagy FACSCalibur áramlási citométerrel vizsgáltuk.

A rekombináns Nimród fehérjék kifejeztetése bakulovírus alapú eukarióta expressziós rendszerben

FLAG-taget kódoló plazmid készítése

A FLAG epitópot és az XbaI és NotI restrikciós endonukleázok hasítóhelyét két oligonukleotidként szintetizáltattuk, mint 5'-CAATCTAGAGATTACAAAGACGACGACGACAAATAGTAAGCGGCCGCAAC-3' és a reverz komplement szekvenciája. Mindkét oligonukleotidból 1 nmol-t használtunk és tíz percig 95 °C-on inkubáltuk, majd egy percig 70 °C-on, 1 percig 60 °C-on, egy percig 50 °C-on, két percig 40 °C-on, ahhoz, hogy, a két egyesszálú DNS szakasz kettősszálú DNS molekulákat hozzon létre. Az oldathoz 0,6 µl NotI (Fermentas) és 0,6 µl XbaI (Fermentas)

enzimet, valamint 2 µl BamHI puffert (10X, Fermentas) és 6,8 µl desztillált vizet adtunk, majd két órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. A restrikciós endonukleáz enzimeket húsz percen át 80 °C-on inaktiváltuk, majd az inszertet egy NotI-XbaI emésztett pBKSII+ vektorba klónoztuk. A kapott klónokat T3 és T7 primerek segítségével szekvenálással ellenőriztük. Az inszert tervezésekor ügyeltünk arra, hogy a FLAG epitópot kódoló szakaszon a két STOP kodon a pBluescriptII plazmid klónozó helyén található β-galaktozidáz α-fragmensét kódoló géntől különböző leolvasási keretbe kerüljön. A β-galaktozidáz gén leolvasási keretében így nincsenek STOP kodonok, a plazmidról működőképes β-galaktozidáz fehérje íródik át és a pB-FLAG kék-fehér szelekcióra is alkalmas.

A rekombináns fehérjéket kódoló baculovírus előállítás

A Nimród fehérjék sejtén kívüli doménjét kódoló inszerteket polimeráz láncreakcióval állítottuk elő. A felhasznált primerek a Sall, vagy XbaI restrikciós endonukleázok hasítóhelyét, a forward primerek egy START (ATG) kodont is tartalmaztak:

NimC1 forward: 5'-CAAGTCGACATGATTTGTAACCGATCGCAGG-3'

NimC1 reverse: 5'-CAATCTAGATACCTCGCTGGTTGATGTCTG-3'

NimA forward: 5'-CAAGTCGACATGATACCATTGGGATCAGGACAAAACAG-3'

NimA reverse: 5'-CAATCTAGAGGCCTCACCTCCAACGAATCC-3'

NimB1forward: 5'-CAAGTCGACATGACGCTGGTGGCATTTCCTG-3'

NimB1reverse: 5'-CATTCTAGATAGATATCCTTCGCGGCAGTGAC-3'

NimB2 forward: 5'-CAAGTCGACATGAAGACGGCTGGCATCAAGACAC-3'

NimB2 reverse: 5'-CAATCTAGACAAAACCGGAAGCGCACTCACAG-3'

Draper forward: 5'-GTTGTCGACATGTTGCCGGTAATCCTCATAGC-3'

Draper reverse: 5'-CAATCTAGAGTCGCACTGGCACTTCTGG-3'

Atilla forward: 5'-CAAGTCGACATGCACAGTGCATCGGCCATCAAG-3'

Atilla reverse: 5'-CAATCTAGATGCACTGACCGCCACAAAG-3';

A NimA inszert előállításához templátként a teljes RNS mintából reverz transzkripcióval előállított cDNS mintát használtunk, a többi inszert előállításához a következő cDNS plazmidokat használtunk templátként: pMT/V5-hisA (NimC1), GH07762 (NimB1), HL01444 (NimB2), RE50156 (Atilla), IP15264 (Draper). A polimeráz láncreakciók termékeit Sall és XbaI restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd a pB-FLAG vektorba klónoztuk. Az inszertek szekvenciáját T3 és T7 primereket használva szekvenálással ellenőriztük. A FLAG epitóppal ellátott rekombináns fehérjéket baculovírus expressziós rendszerben fejeztettük ki (Bac-to-Bac, Invitrogen). Az inszerteket a pB-FLAG vektorból a Sall és NotI restrikciós endonukleázok felhasználásával pFastBacDual vektorba klónoztuk. A pFastBacDual-*atilla*, pFastBacDual-*nimA*, pFastBacDual-*nimB1*, pFastBacDual-*nimB2*, pFastBacDual-*nimC1* és pFastBacDual-*draper* plazmidokkal DH10Bac kompetens sejteket transzformáltunk, amelyek egy shuttle vektort, más néven bacmidot hordoznak, amely egy fertőzőképes baculovírus genomját tartalmazza. Az inszertek a pFastBacDual vektorokon Tn7 rekombinációs szignálszekvenciák között találhatók, a shuttle vektor is tartalmaz Tn7 szignálszekvenciákat egy lacZ génben, a DH10Bac baktériumsejtek pedig kifejezik a szükséges rekombináz enzimet, így a DH10Bac törzsben az inszert a pFastBacDual vektorról a shuttle vektorra rekombinál. A sikeresen rekombinálódott inszert működésképtelenné teszi a bacmid lacZ génjét, így a sikeres rekombináció termékei kék-fehér szelekcióval azonosíthatók. A fehér színű telepekből 7 telepet választottunk ki, amelyeket kanamicinnel, tetraciklinnel, gentamicinnel, IPTG-vel, X-Gal-lal kiegészített LB agarlemezre szélesztettük és 24 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A kinőtt telepek közül kiválasztottuk a fehéreket, amelyeket 2 ml kanamicinnel, tetraciklinnel és gentamicinnel kiegészített LB táptalajba oltottunk, majd ezeket a kultúrákat egy éjszakán át 37 °C-on ráztuk. A baktérium szuszpenziókból alkalikus lízissel plazmid DNS-t izoláltuk, majd az inszert beépülését az izolált bacmid DNS-en végzett polimeráz láncreakcióval ellenőriztük, pUC/M13 forward (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') és reverse (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') primerek segítségével. Az inszertet tartalmazó bacmidot hordozó klónokat kanamicinnel, tetraciklinnel és gentamicinnel kiegészített 60 ml folyékony LB táptalajba oltottuk, majd a baktériumkultúrákat OD₆₀₀ 1,5 denzitásig növesztettük. A bacmid DNS-t Qiagen Plasmid MIDI KIT segítségével izoláltuk, majd TE pufferben oldottuk fel.

Fertőzőképes baculovírus előállítása

A vektor DNS-sel *Spodoptera frugiperda* (Sf9) lepke eredetű sejtvonalat transzfektáltunk. Az Sf9 lepke sejtvonal sejtjeit TNM-FH táptalajban 60-70%-os denzitásig szaporítottuk, majd szérumbmentes TNM-FH táptalajban háromszor mostuk. A 1,5 µg bacmid DNS-t és 12 µl Cellfectin II reagenst (Invitrogen) tartalmazó szérumbmentes TNM-FH táptalajt 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 300 µl szérumbmentes TNM-FH táptalajhoz keverve a mosott Sf9 sejtekkel szobahőmérsékleten 12 óráig himbálva inkubáltuk. A sejteket ezután szérumbmentes TNM-FH táptalajban mostuk és 72 óráig 26 °C-on inkubáltuk. A sejt kultúra felülszója tartalmazta a fertőzőképes

baculovírus részecskéket (P1 vírus törzsoldat), mellyel újabb Sf9 sejteket fertőztünk, melynek a felülúszójában termelődő baculovírus részecskék képezték a P2 vírus törzsoldatot, ezzel ismét Sf9 sejteket fertőztünk melynek a felülúszójában lévő baculovírus részecskék adták a P3 vírus törzsoldat, ezzel fertőzve az Sf9 sejteket azok felülúszója lett a P4 vírus törzsoldat.

Sf9 sejtek fertőzése és lízise

Az Sf9 sejt kultúrát P4 baculovírus törzsoldattal fertőztük, majd 72 órán át 25 °C-on inkubáltuk. A rekombináns fehérjét termelő sejteket lízispufferben felfuszpendáltuk, a mintát szonikáltuk, folyékony nitrogénben fagyasztottuk-olvasztottuk, majd 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk (18000 x g).

A Nimród fehérjék baktériumkötésének tesztelése áramlási citometriával

A FITC-el jelölt baktériumokat (5-10 µl) 4 percig 4 °C-on (11200 x g) centrifugáltuk és 400 µl hemocita lizátummal, vagy a rekombináns fehérjét termelő SF9 sejtek lizátumának 800 µl-ével egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk állandó forgatás mellett. Ezután a baktériumsejteket 4 percig 4 °C-on (11200 x g) centrifugáltuk és háromszor mostuk PBS-ben. A baktérium üledékhez 1 ml elsődleges ellenanyagot P1a és P1b monoklonális egér ellenanyagok keverékét (Kurucz és mtsai. 2007a), L1a és L1b egér monoklonális ellenanyagok keverékét (Kurucz és mtsai. 2007a), vagy anti-FLAG egér monoklonális ellenanyagot (1:1000 hígítás 5% FBS RPMI-ben) adtunk. Fél perc intenzív keverés után a mintát két órán át forgattuk 4 °C-on, majd háromszor mostuk 5% szérummal kiegészített RPMI táptalajban, majd centrifugáltuk. A baktérium üledékhez másodlagos ellenanyagként 1 ml Alexa Fluor 633 fluorokrómmal jelölt anti-egér IgG-t (Invitrogen) (1:600 hígítás 5% FBS RPMI-ben) adtunk, 45 percen át forgattuk 4 °C-on majd centrifugáltuk. Miután a baktérium pelletet háromszor mostuk 5% szérummal kiegészített RPMI táptalajban és kétszer PBS-ben, a baktériumsejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával határoztuk meg. A baktériumsejteket az FL-1 csatornán mért FITC (zöld) fluoreszcenciájuk alapján különítettük el a törmeléktől, és a kapzott sejt populáció Alexa Fluor 633 (távolsági vörös) fluoreszcencia intenzitását az FL-4 csatornán mértük egy FACSCalibur áramlási citométerrel.

A vizsgált fehérjék baktériumkötésének statisztikai elemzése

A vizsgált fehérjék baktériumkötését a távoli vörös tartományban mért fluoreszcencia intenzitások számtani közepével (MFI) jellemeztük. A NimC1 fehérjét felismerő ellenanyaggal festett minta MFI értékét elosztva a kontroll minta MFI értékével számítottuk ki a minta relatív MFI értékét (RMFI). Minden ábrán feltüntettük az RMFI értékek standard deviációját (SD), a minta adatok szóródását az átlag körül. Az áramlási citometriával mért MFI értékeken Student t-tesztet végeztünk. A baktériumkötésnek fogadtuk el azt az értéket ahol a minta MFI értékei szignifikánsan különböznek a kontroll MFI értékeitől.

Szeptikus sérülési teszthez baktérium pázsit előállítása

A baktérium pázsit elkészítése során a hősterilizett *Drosophila* tenyésztő fiolákba 2 ml 2%-os LB táptalajt öntöttünk. A megszilárdult LB médium felszínén szétszórattunk 20 µl baktérium szuszpenziót, majd éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk.

A szeptikus sérülés kiváltására alkalmazott módszer

A sérülést 1-5 napos *D. melanogaster* nőtények első pár végtagja tarzális ízének eltávolításával idéztük elő szemsebészeti ollóval, szén-dioxidos altatásban. Fiolánként 30 sérült egyed helyezettünk a baktérium pázsitot tartalmazó fiolákba. Az állatokat 5 óra elteltével standard *Drosophila* táptalajt tartalmazó fiolákra helyeztük, majd a túlélő egyedek számát 3 napig rögzítettük. A sérülésnek az életképességre gyakorolt hatását steril LB táptalajt tartalmazó fiolák alkalmazásával határoztuk meg.

A szeptikus sérülési tesztek kísérleti eredményeink kiértékelése

A túlélési görbék készítéséhez használt adatok legalább három egymástól független kísérletből származtak. A különböző kísérleti csoportokban, amelyeket különböző baktérium törzsekkel fertőztünk, legalább 100 egyed túlélését vizsgáltuk. A mutáns állatok túlélését a kontrollként használt w^{1118} egyedek túléléséhez viszonyítottuk. A kontroll és a mutáns állatok túlélésének vizsgálatát egymással párhuzamosan végeztük. A statisztikai értékelést a Microsoft Excel Student's t-test (nem egyenlő mintaeloszlás) programjának segítségével végeztük. A túlélési görbét [Charroux és Royet 2009] munkája alapján készítettük. A hibavonalak (error bars) a standard hibát jelölik. $p < 0.05$ érték esetében a különbséget szignifikánsnak tekintettük.

Az *Drosophila* és a parazitoid darázs túlélésének vizsgálata

A darázs fertőzést követően 48 órával a darázzsal szűrt lárvákat ecetmuslica táptalajt tartalmazó fiolákra helyeztük. Két nap elteltével rögzítettük a fiolákban fellelhető bábok, majd a bábokból kikelő ecetmuslicák illetve darázsok számát. A kísérleteket legalább háromszor megismételtük és genotípusonként legalább 150 egyedet vizsgáltunk.

A tokképzési reakció vizsgálata

A darázsszűrást követő 48 illetve 72 óra után a lárvákat 12 lyukú tárgylemezen boncoltuk és rögzítettük az élő, nem melanizált, a részlegesen melanizált és a teljesen melanizált darázslárvák számát. Meghatároztuk azoknak a tokoknak a számát, amelyek a lamellociták lazán, illetve szorosan vettek körül. Azokat a lárvákat, amelyekben nem volt melanizált tok, vagy nem figyeltünk meg melanizált pontokat a kutikulán szintén kiboncoltuk és megvizsgáltuk, hogy van-e bennük élő darázs lárv. Ezt követően genotípusonként meghatároztuk az élő, nem melanizált darázs lárvák, illetve a részlegesen melanizált és a teljesen melanizált darázs peték számát. Meghatároztuk a fertőzöttség mértékét is, vagyis az ecetmuslica lárvájában lévő parazitoidok számát. Az átlag darázs lárvák számát a következő képlettel számoltuk ki: átlag darázs lárvák=összes darázs lárvák/összes ecetmuslica lárvák.

A tokok immunfestése

A *Leptopilina boulardi* G486 darázsszűrást követő 48 illetve 72 óra után a lárvákat kiboncoltuk és izoláltuk a parazitoid darázs petéket 5% magzati borjú szérumot (FBS) és PTU-t tartalmazó Schneider's médiumban, majd 5 percig mostuk PBS-ben. 12 percig fixáltuk 2%-os paraformaldehidben majd háromszor mostuk PBS-ben. A mintákat 20 percig telítettük 0,1%-os marha szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS-ben és éjszakán át 4°C-on inkubáltuk az elsődleges ellenanyagot tartalmazó hibridoma felülszűzében, majd háromszor mostuk PBS-ben. Ezután 45 percig inkubáltuk a CF-568 (Sigma-Aldrich) másodlagos ellenanyaggal (1:1000 hígítás). A sejtmagvakat 1:400 hígított DAPI-val (Sigma-Aldrich) jelöltük. A mintákat három alkalommal 5 percig mostuk PBS-ben, ezután a mintákat fedőmédiummal fedtük (Fluoromount G, SouthernBiotech) és Zeiss Axioscope 2 MOT fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

9. Irodalomjegyzék

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferreira S, Fleischmann W, Fosler C, Gabriellian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacle JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA,

- Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. **2000**. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-95.
- Aderem A** and Underhill DM. **1999**. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. of Immunol.* 17: 593-623.
- Agaisse H** and Perrimon N. **2004**. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 198:72-82.
- Agaisse H**, Burrack LS, Phillips JA, Rubin EJ, Perrimon N, Higgins DE. **2005**. Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science* 309:1248-1251.
- Akhouayri I**, Turc C, Royet J, Charroux B. **2011**. Toll-8/Tollo negatively regulates antimicrobial response in the *Drosophila* respiratory epithelium. *PLoS Pathog.* (10):e1002319.
- Akira S**, Mammalian Toll-like receptors. **2003**. *Curr. Opin. Immunol.* 15:5-11.
- Ando I**, Zakany J, Takacs L, Petri I, Kaiser G, Veres G, Balazs L, Nikolova EB, Beverley PCL, Monostori E. The use of monoclonal antibodies to dissect the human haemopoietic and lymphoreticular system. In: Rohlich P, Bacsy E (szerk.) *Tissue Culture and Reticuloendothelial System: Proceedings of the joint congress of the European Tissue Culture Society and the European Reticuloendothelial Society*. Budapest: Akadémiai Kiadó, **1984**. pp. 241-246. (ISBN:978-9630536561).
- Antonny B**. Membrane deformation by protein coats. **2006**. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18:386-394.
- Ariel O**, Levi Y, Hollander N. **2009**. Signal transduction by CD58: the transmembrane isoform transmits signals outside lipid rafts independently of the GPI-anchored isoform. *Cell Signal.* 21:1100-1108.
- Asha H**, Nagy I, Kovacs G, Stetson D, Ando I, Dearolf CR. **2003**. Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* 163:203-215.
- Avet-Rochex A**, Perrin J, Bergeret E, Fauvarque MO. **2007**. Rac2 is a major actor of *Drosophila* resistance to *Pseudomonas aeruginosa* acting in phagocytic cells. *Genes Cells* 12:1193-1204.
- Awasaki T**, Tatsumi R, Takahashi K, Arai K, Nakanishi Y, Ueda R, Ito K. **2006**. Essential role of the apoptotic cell engulfment genes *draper* and *ced-6* in programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Neuron* 50:855-867.
- Baba T**, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M. **2006**. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, *Mol. Syst. Biol.* 2:1-11.
- Barral DC és Brenner MB**. **2007**. CD1 antigen presentation: how it works. *Nature Reviews Immunology* 7:929-941.
- Bataillé L**, Augé B, Ferjoux G, Haenlin M, Waltzer L. **2005**. Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors. *Development* 132: 4635-4644.
- Bausek N**, és Zeidler MP. **2014**. Gα73B is a downstream effector of JAK/STAT signalling and a regulator of Rho1 in *Drosophila* haematopoiesis. *J. Cell Sci.* 127:101-110.
- Belvin MP és Anderson KV**. **1996**. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* Toll dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12:393-416.
- Bhutkar A**, Schaeffer SW, Russo SM, Xu M, Smith TF, Gelbart WM. **2008**. Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 *Drosophila* genomes. *Genetics* 179:1657-1680.
- Bidla G**, Lindgren M, Theopold U, Dushay MS. **2005**. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev. Comp. Immunol.* 29:669-679.
- Bidla G**, Hauling T, Dushay MS, Theopold U. **2009**. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *J. Innate Immun.* 1:301-308.

- Blasi F, and Carmeliet P. 2002.** uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:932-943.
- Boman HG, Nilsson I, Rasmuson B. 1972.** Inducible antibacterial defense system in *Drosophila*. *Nature.* 237:232-235.
- Brennan CA és Anderson KV. 2004.** *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu. Rev. Immunol.* 22:457-483.
- Brennan CA, Delaney JR, Schneider DS, Anderson KV. 2007.** Psidin is required in *Drosophila* blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body. *Curr. Biol.* 17:67-72.
- 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.
- Brückner K, Kockel L, Duchek P, Luque CM, Rorth P, Perrimon N. 2004.** The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 7:73-84.
- Callebaut I, Mignotte V, Souchet M, Mornon JP. 2003.** EMI domains are widespread and reveal the probable orthologs of the *Caenorhabditis elegans* CED-1 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300:619-623.
- Campbell ID and Bork P. 1993.** Epidermal growth factor-like modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:385-392.
- Carton Y és Nappi AJ. 1997.** *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol. Today.* 13:218-227.
- Castellano F, Chavrier P, Caron E. 2001.** Actin dynamics during phagocytosis. *Semin. Immunol.* 13:347-355.
- Cerenius L and Söderhäll K. 2004.** The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198:116-126.
- Cerenius L, Kawabata S, Lee BL, Nonaka M, Söderhäll K. 2010.** Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem. Sci.* 35:575-583.
- Charroux B és Royet J. 2009.** Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the *Drosophila* immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:9797-9802.
- Chen L és Coleman WG Jr. 1993.** Cloning and characterization of the *Escherichia coli* K-12 *rfa*-2 (*rfaC*) gene, a gene required for lipopolysaccharide inner core synthesis. *J. Bacteriology* 175:2534-2540.
- Cheng PC, Brown BK, Song W, Pierce SK. 2001.** Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling. *J Immunol.* 166:3693-3701.
- Cheng LW, Viala JP, Stuurman N, Wiedemann U, Vale RD, Portnoy DA. 2005.** Use of RNA interference in *Drosophila* S2 cells to identify host pathways controlling compartmentalization of an intracellular pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:13646-13651.
- Cherry S és Silverman N. 2006.** Host-pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend. *Nature Immunology* 7:911-917.
- Choe KM, Werner T, Stoven S, Hultmark D, Anderson KV. 2002.** Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science* 296:359-62.
- Chung YS and Kocks C. 2011.** Recognition of pathogenic microbes by the *Drosophila* phagocytic pattern recognition receptor Eater. *J. Biol. Chem.* 286:26524-2632.
- 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.
- Comber K**, Huelsmann S, Evans I, Sánchez-Sánchez BJ, Chalmers A, Reuter R, Wood W, Martín-Bermudo MD. **2013**. A dual role for the β PS integrin myospheroid in mediating *Drosophila* embryonic macrophage migration. *J. Cell. Sci.* 126:3475-3484.
- Cook GP és Tomlinson IM.** **1995**. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol. Today.* 16:237-242.
- Crozatier M**, Ubeda JM, Vincent A, Meister M. **2004**. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol.* 8:1107-1113.
- Crozatier M és Meister M.** **2007**. *Drosophila* haematopoiesis. *Cell Microbiol.* 9:1117-1126.
- Davies A**, Simmons DL, Hale G, Harrison RA, Tighe H, Lachmann PJ, Waldmann H. **1989**. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J. Exp. Med.* 170:637-654.
- Davis RJ**, Tavsanlı BC, Dittrich C, Walldorf U, Mardon G. **2003**. *Drosophila* retinal homeobox (*drx*) is not required for establishment of the visual system, but is required for brain and clypeus development. *Dev. Biol.* 259:272-287.
- Defaye A**, Evans I, Crozatier M, Wood W, Lemaitre B, Leulier F. **2009**. Genetic ablation of *Drosophila* phagocytes reveals their contribution to both development and resistance to bacterial infection. *J. Innate Immun.* 1:322-334.
- De Gregorio E**, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B. **2001**. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:12590-12595.
- Desjardins M.** **2001**. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* 152:165-180.
- Desjardins M.** ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. **2003**. *Nat. Rev. Immunol.* 3:280-291.
- Desjardins M**, Houde M, Gagnon E. **2005**. Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev.* 207:158-165.
- de Wit E**, Braunschweig U, Greil F, Bussemaker HJ, van Steensel B. **2008**. Global chromatin domain organization of the *Drosophila* genome. *PloS Genet.* 4:e1000045.
- Drosophila 12 Genomes Consortium**, **2007**. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450:203-218.
- Dudzic JP**, Kondo S, Ueda R, Bergman CM, Lemaitre B. **2015**. *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biol.* 13:81.
- Duffy JB.** **2002**. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34:1-15.
- Dushay MS**, Asling B, Hultmark D. **1996**. Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:10343-10347.
- Duvic B**, Hoffmann JA, Meister M, Royet J. **2002**. Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Curr. Biol.* 12:1923-1927.
- Edwards DN**, Towb P, Wasserman, SA. **1997**. An activity-dependent network of interactions links the Rel protein Dorsal with its cytoplasmic regulators. *Development* 124:3855-3864.
- Ekengren S és Hultmark D.** **1999**. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:965-972.
- Ekengren S**, Tryselius Y, Dushay MS, Liu G, Steiner H, Hultmark D. **2001**. A humoral stress response in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 11:71-718.

- Elrod-Erickson M, Mishra S, Schneider D. 2000.** Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10:781-784.
- Engström Y, Kadalayil L, Sun SC, Samakovlis C, Hultmark D, Faye I. 1993.** kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 232:327-333.
- Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U. 2003.** Thicker than blood. Conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev. Cell.* 5:673-690.
- Evans CJ, Liu T, Banerjee U. 2014.** *Drosophila* hematopoiesis: Markers and methods for molecular genetic analysis. *Methods.* 68:242-251.
- Evans IR, Hu N, Skaer H, Wood W. 2010.** Interdependence of macrophage migration and ventral nerve cord development in *Drosophila* embryos. *Development* 137:1625-1633.
- Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM. 1991.** Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351:155-158.
- Fauvarque MO és Williams MJ. 2011.** *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *J. Cell. Sci.* 124:1373-1382.
- Ferjoux G, Augé B, Boyer K, Haenlin M, Waltzer L. 2007.** A GATA/RUNX cis- regulatory module couples *Drosophila* blood cell commitment and differentiation into crystal cells. *Dev. Biol.* 305:726-734.
- Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA. 2007.** The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 11:862-874.
- Ferrandon, D. 2013.** The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. *Curr. Opin Immunol.* 25:59-70.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fossett N, Hyman K, Gajewski K, Orkin SH, Schulz RA. 2003.** Combinatorial interactions of Serpent, Lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:11451-11456.
- Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA, 1996.** Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 4:431-443.
- Franc NC, Heitzler P, Ezekowitz RA, White K. 1999.** Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* 284:1991-1994.
- Gajewski KM, Sorrentino RP, Lee JH, Zhang Q, Russell M, Schulz RA. 2007.** Identification of a crystal cell-specific enhancer of the black cells prophenoloxidase gene in *Drosophila*. *Genesis* 45:200-207.
- Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Gateff E. 1977.** Malignant neoplasms of the hematopoietic system in three mutants of *Drosophila melanogaster*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 52:81-83.
- Gateff E. 1977.** Malignant neoplasms of the hematopoietic system in three mutants of *Drosophila melanogaster*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 52:81-83.
- Gay N and Keith F. 1991.** *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351:355-356.
- Gerlitz O, Nellen D, Ottiger M, Basler K. 2002.** A screen for genes expressed in *Drosophila* imaginal discs. *Int. J. Dev. Biol.* 46:173-176.
- Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. 2001.** Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *J. Immunol.* 167:1882-1885.

- Ghosh S, Singh A, Mandal S, Mandal L. 2015.** Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. *Dev. Cell* 33:478-488.
- Gold KS, és Brückner K. 2015.** Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. *Semin. Immunol.* 27:357-368.
- Gordon S, Crocker PR, Morris L, Lee SH, Perry VH, Hume DA. 1986.** Localization and function of tissue macrophages. *Ciba Found Symp.* 118:54-67.
- Gordon, S.** Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **2002.** *Cell* 111:927-930.
- Goto A, Kumagai T, Kumagai C, Hirose J, Narita H, Mori H, Kadowaki T, Beck K, Kitagawa. 2001.** A *Drosophila* haemocyte-specific protein, hemolectin, similar to human von Willebrand factor. *Biochem. J.* 359:99-108.
- Goto A, Kadowaki T, Kitagawa Y. 2003.** *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev. Biol.* 264:582-591.
- Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, Ferrandon D, Royet J. 2002.** The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 416:640-44.
- Govind S. 1999.** Control of development and immunity by *rel* transcription factors in *Drosophila*. *Oncogene.* 18:6875-6887.
- Greenberg S és Grinstein S. 2002.** Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14:136-145.
- Grigorian M, Mandal L, Hartenstein V. 2011.** Hematopoiesis at the onset of metamorphosis: terminal differentiation and dissociation of the *Drosophila* lymph gland. *Dev. Genes Evol.* 221:121-131.
- Hálová I, Dráberová L, Dráber P. 2002.** A novel lipid raft-associated glycoprotein, TEC-21, activates rat basophilic leukemia cells independently of the type 1 Fc epsilon receptor. *Int. Immunol.* 14:213-23.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 2000.** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- Hanratty WP és Dearolf CR. 1993.** The *Drosophila* Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the *hopscotch* locus. *Mol. Gen. Genet.* 238:33-37.
- Harrison DA, Binari R, Nahreini TS, Gilman M, Perrimon N. 1995.** Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.* 14:2857-2865.
- Hashimoto Y, Tabuchi Y, Sakurai K, Kutsuna M, Kurokawa K, Awasaki T, Sekimizu K, Nakanishi Y, Shiratsuchi A. 2009.** Identification of lipoteichoic acid as a ligand for *draper* in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* hemocytes. *J. Immunol.* 183:7451-7460.
- Hedengren M, Asling B, Dushay MS, Ando I, Ekengren S, Wihlborg M, Hultmark D. 1999.** Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol. Cell.* 4:827-837.
- Heinrichs DE, Yethon JA, Whitfield C. 1998.** Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology.* 30:221-232.
- Hijazi A, Masson W, Augé B, Waltzer L, Haenlin M, Roch F. 2009.** *boudin* is required for septate junction organisation in *Drosophila* and codes for a diffusible protein of the Ly6 superfamily. *Development* 136:2199-2209.
- Hillyer JF. 2016.** Insect immunology and hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.* 58:102-18.

- Hoebe K**, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U, Beutler B. **2005**. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433:523-527.
- Hoffmann JA**, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. **1999**. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-1318.
- Hoffmann JA**. **2003**. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426:33-38.
- Holt RA**, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson PW, Baden H, de Berardinis V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, Cai S, Center A, Chaturverdi K, Christophides GK, Chrystal MA, Clamp M, Cravchik A, Curwen V, Dana A, Delcher A, Dew I, Evans CA, Flanigan M, Grundschober-Freimoser A, Friedli L, Gu Z, Guan P, Guigo R, Hillenmeyer ME, Hladun SL, Hogan JR, Hong YS, Hoover J, Jaillon O, Ke Z, Kodira C, Kokoza E, Koutsos A, Letunic I, Levitsky A, Liang Y, Lin JJ, Lobo NF, Lopez JR, Malek JA, McIntosh TC, Meister S, Miller J, Mobarry C, Mongin E, Murphy SD, O'Brochta DA, Pfannkoch C, Qi R, Regier MA, Remington K, Shao H, Sharakhova MV, Sitter CD, Shetty J, Smith TJ, Strong R, Sun J, Thomasova D, Ton LQ, Topalis P, Tu Z, Unger MF, Walenz B, Wang A, Wang J, Wang M, Wang X, Woodford KJ, Wortman JR, Wu M, Yao A, Zdobnov EM, Zhang H, Zhao Q, Zhao S, Zhu SC, Zhimulev I, Coluzzi M, della Torre A, Roth CW, Louis C, Kalush F, Mural RJ, Myers EW, Adams MD, Smith HO, Broder S, Gardner MJ, Fraser CM, Birney E, Bork P, Brey PT, Venter JC, Weissenbach J, Kafatos FC, Collins FH, Hoffman SL. **2002**. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298:129-149.
- Holz A**, Bossinger B, Strasser T, Janning W, Klapper R. **2003**. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 130:4955-4962.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Houde M**, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M. **2003**. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425:402-406.
- Hultmark D**, Engström A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG. **1983**. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* 2:571-576.
- Hultmark D**. **2003**. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* 15:12-19.
- Iatsenko I**, Kondo S, Mengin-Lecreux D, Lemaitre B. **2016**. PGRP-SD, an extracellular pattern-recognition receptor, enhances peptidoglycan-mediated activation of the *Drosophila* Imd pathway. *Immunity* 45:1013-1023.
- Imler JL és Bulet P**. **2005**. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy.* 86:1-21.
- Indik ZK**, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. **1995**. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86:4389-4399.

- Ip YT, Reach M, Engstrom Y, Kadalayil L, Cai H, González-Crespo S, Tatei K, Levine M. 1993.** *Dif*, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell*. 75:753–763.
- Irving P, Troxler L, Hetru C. 2004.** Is innate enough? The innate immune response in *Drosophila*. *C R Biol*. 327:557-570.
- Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, Hoffmann JA, Hetru C, Meister M. 2005.** New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol*. 7:335-350.
- Iwanaga S, Kawabata T, Muta S. 1998.** New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J. Biochem* 123:1-15
- Janeway CA Jr. 1989.** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. 54:1-13.
- Janeway CA Jr és Medzhitov R. Innate immune recognition. 2002.** *Annu. Rev. Immunol*. 20:197-216.
- Ju JS, Cho MH, Brade L, Kim JH, Park JW, Ha NC, Söderhäll I, Söderhäll K, Brade H, Lee BL. 2006.** A novel 40-kDa protein containing six repeats of an epidermal growth factor-like domain functions as a pattern recognition protein for lipopolysaccharide. *J. Immunol*. 177:1838-1845.
- Jung SH, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U. 2005.** The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132:2521-33.
- Kadalayil L, Petersen UM, Engstrom Y. 1997.** Adjacent GATA and κ B-like motifs regulate the expression of a *Drosophila* immune gene. *Nucleic Acids Res*. 25:1233-1239.
- Kari B, Zsámboki 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.
- 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.
- Kemmerling B, Halter T, Mazzotta S, Mosher S, Nürnberger T. 2011.** A genome-wide survey for *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinases implicated in plant immunity. *Front. Plant. Sci*. 2:88.
- Kleino A és Silverman N. 2014.** The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Dev. Comp. Immunol*. 42:25-35.
- Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, Ghosh S. 2013.** Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38:119-130.
- Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, Strom C, Conto SL, Hetru C, Stuart LM, Stehle T, Hoffmann JA, Reichhart JM, Ferrandon D, Rämet M, Ezekowitz RA. 2005.** Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123:335-346.
- Konrad L, Becker G, Schmidt A, Klockner T, Kaufer-Stillger G, Dreschers S, Edstrom JE, Gateff E. 1994.** Cloning, structure, cellular localization, and possible function of the tumor suppressor gene *lethal(3)malignant blood neoplasm-1* of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol*. 163:98-111.
- Kounatidis I és Ligoxygakis P. 2012.** *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol*. 2:120075.
- Kovacsovics-Bankowski M és Rock KL. 1995.** A phagosome to cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267:243-246.

- Köhler G és Milstein C. 1976.** Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 7:511-519.
- Krangel MS.** Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. **2009.** *Curr. Opin. Immunol.* 21:133-139.
- Krautz R, Arefin B, Theopold U. 2014.** Damage signals in the insect immune response. *Front. Plant. Sci.* 5:342.
- Krzemień J, Dubois L, Makki R, Meister M, Vincent A, Crozatier M. 2007.** Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 446:325-328.
- Kuefer MU, Look AT, Pulford K, Behm FG, Pattengale PK, Mason DY, Morris SW. 1997.** Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood* 90:2901-2910.
- Kuraishi T, Nakagawa Y, Nagaosa K, Hashimoto Y, Ishimoto T, Moki T, Fujita Y, Nakayama H, Dohmae N, Shiratsuchi A, Yamamoto N, Ueda K, Yamaguchi M, Awasaki T, Nakanishi Y. 2009.** Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. *EMBO J.* 28:3868-78.
- Kurant E, Axelrod S, Leaman D, Gaul U. 2008.** Six-microns-under acts upstream of Draper in the glial phagocytosis of apoptotic neurons. *Cell* 133:498-509.
- Kurucz E, Glavits R, Krenacs L, Krenacs T, Ocsovszky I, Keresztes G, Monostori E, Ando I. 1993.** An antiserum reacts with an evolutionary conserved region in the epsilon subunit of the T-cell receptor-CD3 complex in phylogenetically distant species. *Immunol. Lett.* 38:167-70.
- 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.
- Kurucz E, Váczi B, Márkus R, Laurinyecz B, Vilmos P, Zsámboki J, Csorba K, Gateff E, Hultmark D, Andó I. 2007a.** Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biol. Hung.* 58:95-111.
- 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. 2007b.** Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr. Biol.* 17:649-654.
- Külshammer E és Uhlirova M. 2013.** The actin cross-linker filamin/cheerio mediates tumor malignancy downstream of JNK signaling. *J. Cell Sci.* 126:927-938.
- Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capovilla M, Hoffmann JA. 2000.** Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:11427-11432.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. 2001.** Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol.* 230:243-257.
- Lavine M és Strand MR. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1295-1309.
- Lebestky T, Chang T, Hartenstein V, Banerjee U. 2000.** Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 288:146-149.
- Lee HK, Lee J, Tobias PS. 2002.** Two lipoproteins extracted from *Escherichia coli* K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling. *J. Immunol.* 168:4012-4017.
- Lemaitre B, Kromer-Metzger E, Michaut L, Nicolas E, Meister M, Georgel P, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1995a.** A recessive mutation, *immune deficiency (imd)*, defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:9465-9469.

- Lemaitre B, Meister M, Govind S, Georgel P, Steward R, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1995b.** Functional analysis and regulation of nuclear import of Dorsal during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.* 14:536-545.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann J. 1996.** The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Lemaitre B, Reichhart J, Hoffmann J. 1997.** *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:14614-14619.
- Lemaitre B. 2004.** The road to Toll. *Nat. Rev. Immunol.* 4:521-27.
- Lemaitre B és Hoffmann J. 2007.** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25:697-743.
- Lesch C, Goto A, Lindgren M, Bidla G, Dushay MS, Theopold U. 2007.** A role for Hemolymph in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Comp. Immunol.* 31:1255-1263.
- Letourneau M, Lapraz F, Sharma A, Vanzo N, Waltzer L, Crozatier M. 2016.** *Drosophila* hematopoiesis under normal conditions and in response to immune stress. *FEBS Lett.* 590:4034-4051.
- Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu JH, Caroff M, Lee WJ, Mengin-Lecreux D, Lemaitre B. 2003.** The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol.* 4:478-84.
- Leulier F és Lemaitre B. 2008.** Toll-like receptors, taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.* 9:165-78.
- Levashina E, Ohresser S, Bulet P, Reichhart J, Hetru C, Hoffmann J. 1995.** Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem.* 233:694-700.
- Li MG, Serr M, Edwards K, Ludmann S, Yamamoto D, Tilney LG, Field CM, Hays TS. 1999.** Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell. Biol.* 146:1061-1074.
- Li Q, Verma IM. 2002.** NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature. Rev. Immunol.* 2:725-734.
- Lindgren M, Riazi R, Lesch C, Wilhelmsson C, Theopold U, Dushay MS. 2008.** Fondue and transglutaminase in the *Drosophila* larval clot. *J. Insect. Physiol.* 54:586-592.
- Little TJ, Hultmark D, Read AF. 2005.** Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat. Immunol.* 6:651-654.
- Loof TG, Schmidt O, Herwald H, Theopold U. 2011.** Coagulation systems of invertebrates and vertebrates and their roles in innate immunity: the same side of two coins? *J. Innate Immun.* 3:34-40.
- Lorand L, Graham RM. 2003.** Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:140-56.
- Lorén CE, Scully A, Grabbe C, Edeen PT, Thomas J, McKeown M, Hunter T, Palmer RH. 2001.** Identification and characterization of DALK: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation in vivo. *Genes Cells.* 6:531-544.
- Luo H, Rose PE, Roberts TM, Dearolf CR. 2002.** The Hopscotch Jak kinase requires the Raf pathway to promote blood cell activation and differentiation in *Drosophila*. *Mol. Genet. Genomics* 267:57-63.
- Mackenzie DK, Bussi re LF, Tinsley MC. 2011.** Senescence of the cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 46:853-859.

- MacKrell** AJ, Blumberg B, Haynes SR, Fessler JH. **1988**. The *lethal myospheroid* gene of *Drosophila* encodes a membrane protein homologous to vertebrate integrin beta subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85:2633-2637.
- MacPherson** M és **Fagerholm** SC. **2010**. Filamin and filamin-binding proteins in integrin-regulation and adhesion. Focus on: "FilaminA is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298:C206-208.
- Manaka** J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, Nakanishi Y. **2004**. Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J. Biol. Chem.* 279:48466-48476.
- Mandal** L, Banerjee U, Hartenstein V. **2004**. Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat. Genet.* 36:1019-1023.
- Mandal** L, Martinez-Agosto JA, Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U. **2007**. A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* 446:320-324.
- Mangahas** PM és **Zhou** Z. **2005**. Clearance of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 16:295-306.
- Marfatia** SM, Leu RA, Branton D, Chishti AH. **1995**. Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 270:715-719.
- 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.
- 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.
- Martinek** N, Shahab J, Saathoff M, Ringuette M. **2008**. Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.* 121:1671-1680.
- Matsunaga** TM and **Fujiwara** H. **2002**. Identification and characterization of genes abnormally expressed in wing-deficient mutant (flugellos) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:691-699.
- Mattner** J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C 3rd, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB, Bendelac A. **2005**. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433:523-527.
- Mayor** S és **Riezman** H. **2004**. Sorting GPI-anchored proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:110-120.
- McVicar** DW. **2008**. Rafting with the IL-12 receptor. *Blood* 111:3911-3912.
- Metchnikoff** II. **1908**. On the present state of the question of immunity in infectious disease [online]<http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikov-lecture.html>
- Medzhitov** R, Preston-Hurlburt P, Janeway C. **1997**. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Medzhitov** R. **2001**. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature. Reviews. Immunology.* 1:135-145.
- Meister** M. **2004**. Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 10-15.
- Mello** CC és **Conte** D Jr. **2004**. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338-342.

- Mellroth P, Karlsson J, Steiner H. 2003.** A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J. Biol. Chem.* 278:7059-7064.
- Metaxakis A, Oehler S, Klinakis A, Savakis C. 2005.** Minos as a genetic and genomic tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 171:571-581.
- Meijers R, Puettmann-Holgado R, Skinotis G, Liu JH, Walz T, Wang JH, Schmucker D** Structural basis of Dscam isoform specificity. **2007.** *Nature* 449:487-491.
- Mezey, J.G., Nuzhdin, S.V., Ye, F. and Jones, C.D. 2008.** Coordinated evolution of co-expressed gene clusters in the *Drosophila* transcriptome. *BMC Evol. Biol.* 8:2.
- Milchanowski AB, Henkenius AL, Narayanan M, Hartenstein V, Banerjee U. 2004.** Identification and characterization of genes involved in embryonic crystal cell formation during *Drosophila* hematopoiesis. *Genetics.* 168:325-339.
- Minakhina S és Steward R. 2006.** Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes. *Genetics* 174:253-263.
- Moran M és Miceli MC. 1998.** Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* 9:787-796.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. 1994.** Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263:1281-1284.
- Mossman KL, Mian MF, Lauzon NL, Gyles CL, Lichty B, Mackenzie R, Gill N, Ashkar AA. 2008.** Cutting Edge: FimH Adhesin of Type 1 Fimbriae Is a Novel TLR4 Ligand. *J. Immunol.* 181:6702-6706.
- Munier AI, Doucet D, Perrodou E, Zachary D, Meister M, Hoffmann JA, Janeway CA Jr, Lagueux M. 2002.** PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in *Drosophila* larvae. *EMBO Rep.* 3:1195-1200.
- Nappi AJ, Vass E, Malagoli D, Carton Y. 2004.** The effects of parasite-derived immune-suppressive factors on the cellular innate immune and autoimmuneresponses of *Drosophila melanogaster*. *J. Parasitol.* 90:1139-49.
- Negre, N, Brown CD, Shah PK, Kheradpour P, Morrison CA, Henikoff JG, Feng X, Ahmad K, Russell S, White RA, Stein L, Henikoff S, Kellis M, White KP. 2010.** A comprehensive map of insulator elements for the *Drosophila* genome. *PLoS Genet.* 6:e1000814.
- Nehme NT, Liégeois S, Kele B, Giammarinaro P, Pradel E, Hoffmann JA, ... Ferrandon D. 2007.** A Model of Bacterial Intestinal Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens.* 3:e173.
- Neyen C, Bretscher AJ, Binggeli O, Lemaitre B. 2014.** Methods to study *Drosophila* immunity. *Methods* 68:116-28.
- Neyen C és Lemaitre B. 2016.** Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective. *Curr. Opin. Immunol.* 38:8-17.
- Nosjean O, Briolay A, Roux B. 1997.** Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1331:153-186.
- Owusu-Ansah E and Banerjee U. 2009.** Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461:537-41.
- Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. 2009.** Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem. J.* 420:345-361.
- Parsons B és Foley E. 2016.** Cellular immune defenses of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Comp. Immunol.* 58:95-101.
- Paulick MG and Bertozzi CR. 2008.** The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* 47:6991-7000.

- Pearson A, Lux A, Krieger M. 1995.** Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:4056-4060.
- Pearson AM, Baksa K, Rämets M, Protas M, McKee M, Brown D, Ezekowitz RA. 2003.** Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect.* 5:815-824.
- Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N. 2005.** *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science* 309:1251-1253.
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. 2000.** Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:545-576.
- Popowicz GM, Schleicher M, Noegel AA, Holak TA. 2006.** Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 31:411-419.
- Qimron U, Marintcheva B, Tabor S, Richardson CC. 2006.** Genomewide screens for *Escherichia coli* genes affecting growth of T7 bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:19039-1944.
- Qiu P, Pan PC, Govind S. 1998.** A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* 125:1909-1920.
- Rämets M, Pearson A, Manfrulli P, Li X, Koziel H, Göbel V, Chung E, Krieger M, Ezekowitz RA. 2001b.** *Drosophila* Scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* 15:1027-1038.
- Rämets M, Manfrulli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RA. 2002.** Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 416:644-48.
- Ramond E, Meister M, Lemaitre B. 2015.** From Embryo to Adult: Hematopoiesis along the *Drosophila* Life Cycle. *Dev. Cell.* 33:367-368.
- Reit J és Mayer C. 2011.** Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Appl. Microb. Biotechnol.* 92:1-11.
- Rietveld A, Neutz S, Simons K, Eaton S. 1999.** Association of sterol-glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J. Biol. Chem.* 274:12049-12054.
- Rizki TM and Rizki RM. 1974.** Basement membrane abnormalities in melanotic tumor formation of *Drosophila*. *Experientia* 30:543-546.
- Rizki TM, Rizki RM, Grell EH. 1980.** A mutant affecting the crystal cells in *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch Dev Biol.* 188:91-99.
- Rizki TM and Rizki RM. 1980.** Properties of the larval hemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 36:1223-1226.
- Rizki TM and Rizki RM. 1984.** The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. (eds King, R. C. & Akai, H.) 579-604 (Plenum Publishing Corporation, New York).
- Rizki TM and Rizki RM. 1992.** Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Dev. Comp. Immunol.* 16:103-110.
- Roos E, Björklund G, Engström Y. 1998.** *In vivo* regulation of tissue-specific and LPS-inducible expression of the *Drosophila* Cecropin genes. *Insect Mol. Biol.* 7:51-62.
- Royet J, Reichhart JM, Hoffmann JA. 2005.** Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.* 17:11-17.
- Röper K, Mao Y, Brown NH. 2005.** Contribution of sequence variation in *Drosophila* actins to their incorporation into actin-based structures in vivo. *J. Cell. Sci.* 118:3937-48.
- Rubin GM and Lewis EB. 2000.** A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science* 287:2216-2218.

- Rus F**, Kurucz E, Márkus R, Sinenko SA, Laurinyecz B, Pataki C, Gausz J, Hegedus Z, Udvardy A, Hultmark D, Andó I. **2006**. Expression pattern of Filamin-240 in *Drosophila* blood cells. *Gene Expr. Patterns*. 6:928-934.
- Russo J**, Dupas S, Frey F, Carton Y, Brehelin M. **1996**. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* 112:135-42.
- Rutschmann S**, Jung AC, Hetru C, Reichhart JM, Hoffmann JA, Ferrandon D. **2000**. The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* 12:569-580.
- Sackton TB**, Lazzaro BP, Schlenke TA, Evans JD, Hultmark D, Clark AG. **2007**. Dynamic evolution of the innate immune system in *Drosophila*. *Nat. Genet.* 39:1461-1468.
- Samakovlis C**, Kimbrell DA, Kylsten P, Engström A, Hultmark D. **1990**. The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J.* 9:2969-2976.
- Sarraf P és Sneller MC**. **2005**. Pathogenesis of Wegener's granulomatosis: current concepts. *Expert. Rev. Mol. Med.* 7:1-19.
- Schmitz G és Orsó E**. **2002**. CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. *Curr. Opin. Lipidol.* 13:513-521.
- Schmucker D**, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, Dixon JE, Zipursky SL. **2000**. *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 101:671-684.
- Schneider I**. **1972**. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*; *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27:353-365.
- Sears HC**, Kennedy CJ, Garrity PA. **2003**. Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis. *Development* 130:3557-3565.
- Sheterline P**, Clayton J, Sparrow J. **1999**. Actin Oxford University Press, USA.
- Shiratsuchi A**, Mori T, Sakurai K, Nagaosa K, Sekimizu K, Lee BL, Nakanishi Y. **2012**. Independent recognition of *Staphylococcus aureus* by two receptors for phagocytosis in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 287:21663-21672.
- Sokol NS and Cooley L**. **1999**. *Drosophila* Filamin encoded by the *cheerio* locus is a component of ovarian ring canals. *Curr. Biol.* 9:1221-1230.
- Sokol NS and Cooley L**. **2003**. *Drosophila* filamin is required for follicle cell motility during oogenesis. *Dev. Biol.* 260:260-272.
- Sollinger HW**, Belzer FO, Deierhoi MH, Diethelm AG, Gonwa TA, Kauffman RS, Klintmalm GB, McDiarmid SV, Roberts J, Rosenthal JT. **1992**. RS-61443 (mycophenolate mofetil). A multicenter study for refractory kidney transplant rejection. *Ann. Surg.* 216:513-518.
- 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.
- Somogyi K**, Sipos B, Péntes Z, Andó I. **2010**. A conserved gene cluster as a putative functional unit in insect innate immunity. *FEBS Lett.* 584:4375-4378.
- Sorrentino RP**, Carton Y, Govind S. **2002**. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev. Biol.* 243:65-80.
- Söderhäll K**, Cerenius L. **1998**. Role of phenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10:23-28.
- Spellman PT. and Rubin GM**. **2002**. Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. *J. Biol.* 1:5.

- Stramer B**, Wood W, Galko MJ, Redd MJ, Jacinto A, Parkhurst SM, Martin P. 2005. Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J Cell Biol.* 168:567-573.
- Sternberg SH**, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507:62-67.
- Steiner H**, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292:246-248.
- Steiner H**. 2004. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol. Rev.* 198:83-96.
- Stofanko M**, Kwon SY, Badenhorst P. 2008. A misexpression screen to identify regulators of *Drosophila* larval hemocyte development. *Genetics* 180:253-267.
- Stroschein-Stevenson SL**, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD. 2005. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol.* 4:e4.
- Stuart LM and Ezekowitz RA**. 2005. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity.* 22:539-50.
- Stuart LM**, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, Ezekowitz RA, Moore KJ. 2005. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol.* 170:477-485.
- Stuart LM**, Boulais J, Charriere GM, Hennessy EJ, Brunet S, Jutras I, Goyette G, Rondeau C, Letarte S, Huang H, Ye P, Morales F, Kocks C, Bader JS, Desjardins M, Ezekowitz RA. 2007. A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature* 445:95-101.
- Stuart LM és Ezekowitz RA**. 2008. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat. Rev. Immunol.* 2:131-141.
- Swanson JA és Hoppe AD**. 2004. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 76:1093-1103.
- Takehana A**, Yano T, Mita S, Kotani A, Oshima Y, Kurata S. 2004. Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO J.* 23:4690-4700.
- Takeuchi O** and Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
- Tepass U**, Fessler LI, Aziz A, Hartenstein V. 1994. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* 120:1829-1837.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium**. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443:931-949.
- Theopold U**, Li D, Fabbri M, Scherfer C, Schmidt O. 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:363-372.
- Theopold U**, Schmidt, O. Söderhäll, K. Dushay M.S. 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.* 25:289-294.
- Theopold U**, Krautz R, Dushay MS. 2014. The *Drosophila* clotting system and its messages for mammals. *Dev. Comp. Immunol.* 42:42-46.
- Tokusumi T**, Sorrentino RP, Russell M, Ferrarese R, Govind S, Schulz RA. 2009a. Characterization of a lamellocyte transcriptional enhancer located within the misshapen gene of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 4:e6429.
- Tokusumi T**, Shoue DA, Tokusumi Y, Stoller JR, Schulz RA. 2009b. New hemocyte-specific enhancer-reporter transgenes for the analysis of hematopoiesis in *Drosophila*. *Genesis* 47:771-774.

- Tolhuis B**, de Wit E, Muijters I, Teunissen H, Talhout W, van Steensel B, van Lohuizen M. **2006**. Genome-wide profiling of PRC1 and PRC2 Polycomb chromatin binding in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 38:694-699.
- Uvila J**, Parikka M, Kleino A, Sormunen R, Ezekowitz RA, Kocks C, Rämetsä M. **2006**. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *J. Biol. Chem.* 281:14370-14375.
- Uttenweiler-Joseph S**, Moniatte M, Lagueux M, Van Dorsselaer A, Hoffmann JA, Bulet P. **1998**. Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:11342-11347.
- Valanne S**, Wang JH, Rämetsä M. **2011**. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *J. Immunol.* 186:649-656.
- Vanha-Aho LM**, Valanne S, Rämetsä M. **2016**. Cytokines in *Drosophila* immunity. *Immunol. Lett.* 170:42-51.
- Vierstraete E**, Cerstiaens A, Baggerman G, Van den Bergh G, De Loof A, Schoofs L. **2003**. Proteomics in *Drosophila melanogaster*: first 2D database of larval hemolymph proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:831-838.
- Vilmos P**, Kurucz E, Ocsóvszki I, Keresztes G, Andó I. **1996**. Phylogenetically conserved epitopes of leukocyte antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52:415-426.
- Vilmos P and Kurucz E.** **1998**. Insect Immunity : Evolutionary Roots of the Mammalian Innate Immune System. *Immunol. Lett.* 62: 59-66.
- 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.
- Waltzer L**, Ferjoux G, Bataille L, Haenlin M. **2003**. Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J.* 22:6516-6525.
- Wang L és Ligoxygakis P.** **2006**. Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response. *Immunobiology* 211:251-261.
- Wang JH**, Valanne S, Rämetsä M. **2010**. *Drosophila* as a model for antiviral immunity. *World J. Biol. Chem.* 1:151-159.
- Wang Z**, Wilhelmsson C, Hyrsl P, Loof TG, Dobes P, Klupp M, Loseva O, Morgelin M, Ikle J, Cripps RM, Herwald H, Theopold U. **2010**. Pathogen entrapment by transglutaminase—a conserved early innate immune mechanism. *PLoS Pathog* 6:e1000763.
- Watson FL**, Püttmann-Holgado R, Thomas F, Lamar DL, Hughes M, Kondo M, Rebel VI, Schmucker D. **2005**. Extensive diversity of Ig superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* 30:1874-1878.
- Weaver TA and White RA.** **1995**. *headcase*, an imaginal specific gene required for adult morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 121:4149-4160.
- Williams MJ**, Ando I, Hultmark D. **2005**. *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes Cells.* 10:813-823.
- Williams MJ**, Wiklund ML, Wikman S, Hultmark D. **2006**. Rac1 signalling in the *Drosophila* larval cellular immune response. *J. Cell. Sci.* 119:2015-2024.
- Williams MJ.** **2007**. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* 178:4711-4716.
- Wood W és Jacinto A.** **2007**. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:542-551.
- Wouters MA**, Rigoutsos I, Chu CK, Feng LL, Sparrow DB, Dunwoodie SL. **2005**. Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Sci.* 14:1091-1103.

- Yarovinsky F**, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. **2005**. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626-1629.
- Yoshiga T**, Georgieva T, Dunkov BC, Harizanova N, Ralchev K, Law JH. **1999**. *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *Eur. J. Biochem.* 260:414-420.
- 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.
- Zusman S**, Patel-King RS, Ffrench-Constant C, Hynes RO. **1990**. Requirements for integrins during *Drosophila* development. *Development* 108:391-402.
- 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.

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 megszakitva, 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, Medzihradszky 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 Vértranszfúziós 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.

11. Rövidítések jegyzéke

Ab	Ellenanyag
Alk	Anaplastic limfóma kináz
Alk-CA	Állandóan aktív anaplastic limfóma kináz
AML1	Acute myeloid leukemia 1 fehérje
Ance	Angiotensin converting enzim
ANK	Ankirin
Aop	anterior open
AprA	Metalloproteáz
Arp2/3	Actin-related proteinen
bp	Bázis pár
Bc	Black cells
CD	Cluster of Differentiation
CenG	Centaurin gamma
Col	Collier
CR	komplement receptor
CRC	Kristálysejt
CRQ	Croquemort
CTB	Kolera toxin B
CZ	Lymph gland kortikális zóna
Cy3	Cyanine festék
DAP-PGN	Diaminopimelic savat tartalmazó peptidoglikán
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole fluoreszkáló DNS festék
Dom	Domeless receptor
DoxA1	Profenoloxidáz izoforma
DoxA3	Profenoloxidáz izoforma
DN	Domináns-negatív
Dpp	Decapentaplegic
Dredd	Death related ced-3/Nedd2-like protein
DSS	Disuccinimidyl suberate
Dscam	Down syndrome sejtadhéziós molekula
dDuox	<i>Drosophila</i> dual oxidáz 1
dsRNA	Kettősszálú RNS
dUev1A	<i>Drosophila</i> ubiquitin-conjugating enzim 1A variáns
Dif	Dorsal-related immunity factor
DmIKK	<i>Drosophila</i> IkappaB kináz
ECL	Western blot előhívó reagens
EGFR	Epidermalális növekedési faktor receptor
EMI	EMILIN családba tartozó fehérjékre jellemző domén
FADD	Fas-associated death domain
FcR	Fc Receptor
FilGAP	Filamin A (FLNa)-binding RhoGTPase-aktiváló fehérje
FITC	Fluoreszcein izotiocianát
FOG1	Friend of GATA
GAL4/UAS	Élesztő transzkripciót aktiváló fehérje/ Upstream Activation Sequence, egy olyan enhancer elem, amelyhez a GAL4 specifikusan kötődve aktiválja a génátíródást.

Gcm	Glial cells missing
Gcm2	Glial cells missing-2
GFP	Green fluorescein protein
GNBP	Gram negatív baktériumkötő fehérje
GPI	Glikozilfoszfatidilinozitol
<i>He>GFP</i>	<i>Hemese>GAL4</i> elemmel meghajtott <i>UAS>GFP</i> .
Hep	Hemipterous
Hop	Hopscoch
HRPO	Tormaperoxidáz
<i>Hml>GFP</i>	<i>Hemolentin>GFP</i>
Htl	Heartless
IFN	Interferon
IFNR	Interferon receptor
IL1	Interleukin 1
IMP	Inosin-5'-monofoszfát dehidrogenáz
IMD	Immune deficiency jelátviteli útvonal
IP	Immunprecipitátum
IR	Inverted repeat
Ird5	Immune response deficient 5
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
JNK	Jun-N-terminal kináz
kDa	Kilo Dalton molekulatömeg
Lg	Lymph gland
LPS	Lipopoliszacharid
LTA	Lipoteichoic sav
LYS-PGN	Lizint tartalmazó peptidoglikán
L	Lamellocita
Lz	Lozenge
mAb	Monoklonális ellenanyag
MBL	Mannóz kötő lektin
MFI	Mean fluorescence intensity
MR	Mannóz receptor
MYD88	Myeloid differentiation primary response gén
MZ	Lymph gland medulláris zóna
Mut	Más mutáns
<i>mys</i>	<i>lethal(l)myospheroid</i> gén
N	Notch
NF-κB	Nuclear factor-kappa B transzkripció faktor
NimA	Nimrod A
NimB	Nimrod B
NimC	Nimrod C
nls	Sejtmagi lokalizációs szignál
Nrg	Neuroglian
PAK1	Serine/threonine-protein kináz
PC	Perikardiális sejtek
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGN	Peptidoglikán

PGRP	Peptitoglikán receptor
PGRP-SA,SB	Szolubilis peptitoglikán receptor
PGRP-LC	Sejtfelszíni peptitoglikán receptor
PHT	Posterior hematopoetikus szövet
PI-PLC	foszfoszfatidilinozitol foszfolipáz C
PKC	Protein kináz C
PL	Plazmatocita
PM	Plazma membrán
pnt	pointed
PS	Foszfatidil szerin
PS integrin	position-specific (PS) integrins
PSC	Posterior signaling center
PCR	Polimeráz láncreakció
Pvf	PDGF and VEGF-Receptor Related
Pvr	PGF and VGF-Receptor Related
Rac1, Rac2	Kis GTP-áz
Ras	Ras oncogén
RelC	Relish C terminus
RelN	Relish N terminus
RMFI	Relative mean fluorescence intensity
RNSi	Kettősszálú RNS alapú géntermék csendesítés
ROS	Reaktív oxigén gyökök
RUNX	Runt-related transcription factor
ppA	Prophenoloxidáz
Pro-ppA	Prophenoloxidáz aktiváló enzim
S2	Schneider 2 sejtvonal
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sgg	shaggy
SIMU	Six-microns-under
Sna	Snail
SPE	Spätzle-processing enzim
SPZ	Spätzle, Toll ligand
SR	Scavenger receptor
SREC	Scavenger receptor
Srp	Serpent
TAK1	Transforming growth factor-beta-aktivált kináz
TEP	Tioészter tartalmú fehérjék
Tl.10b	Toll _{10b}
TM9SF	Nonaspanin
TLR	Toll-szerű receptor
TNF	Tumor nekrosis faktor
Twist	Twist
Ubc13	Ubiquitin konjugáló enzim
Ub	Ubiquitin
u-PAR	Urokináz plasminogén aktivátor receptor
Upd3	Unpaired 3
Ush	U-shaped

VEGF	Vascular endothelial growth factor–related factor
WB	Western blot
Wg	Wingless
Wnt	Wnt oncogén analóg
WT	Vad típus