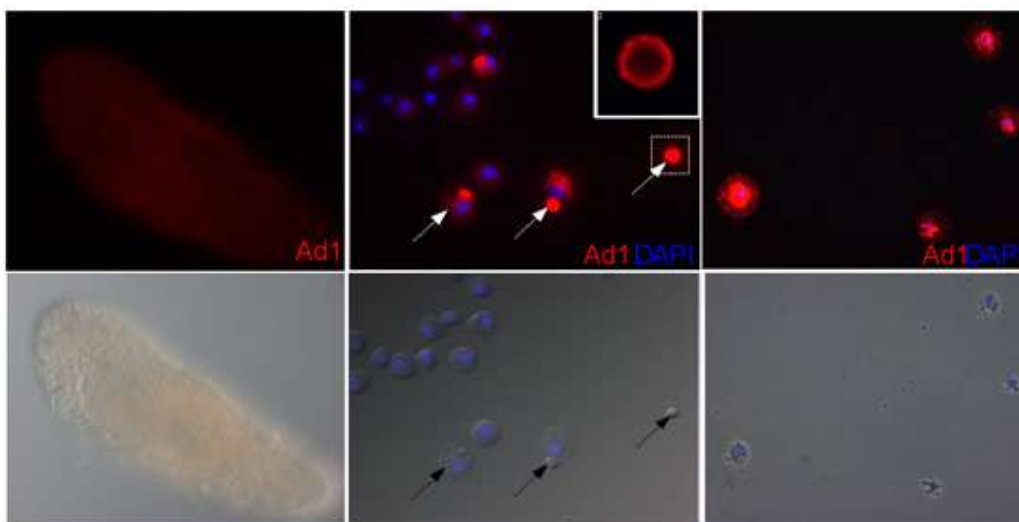


**A Pályázat keretében a *Drosophila melanogaster* sejtközvetítette immunválaszának szabályozását vizsgáltuk immunológiai, genetikai és „in silico” analízissel, valamint molekuláris immunológiai és genetikai ismeretek elsajátítását és projekt építését tettük lehetővé a tudomány iránt érdeklődő diákok és fiatal kutatók számára.**

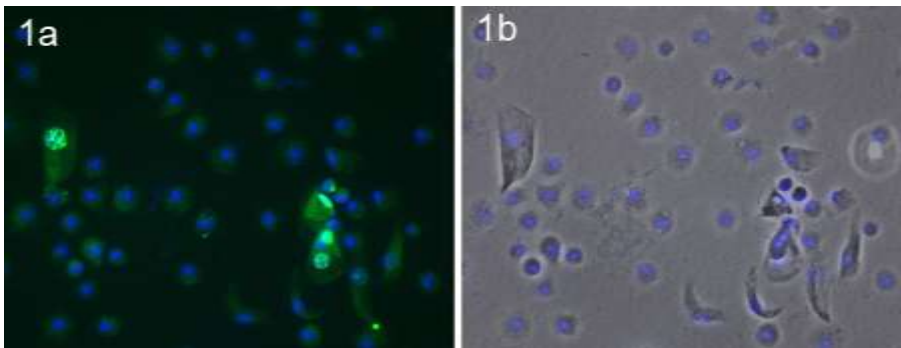
**1.) Az adult *Drosophila melanogaster* vérsejtjeire, az embrionális makrofágokra és a lamellocitákra jellemző markermolekulákat azonosítottunk immunológiai módszerekkel.**

**1.1.) Az adult vérsejtjeire jellemző molekula** egy alacsony molekulatömegű transzmembrán fehérje, mely az egyedfejlődés során a lárva fejlődésének előrehaladtával a plazmatocitákon jelenik meg (alábbi ábra). Embrionális makrofágokon nem nyilvánul meg (bal panel), ezért expressziója illetve annak hiánya lehetővé teszi az embrionális makrofágok és a plazmatocitaként jellemezhető lárvális makrofágok elkülönítését egymástól. A metamorfózis során zajló szövetátrendeződés során az antigént hordozó speciális, kettős membránnal határolt vakuólumok (középső panel) keletkezését figyeltük meg, melyek nem tartalmazzák az eddig általunk azonosított többi transzmembrán fehérjét. A metamorfózis végeztével az adult összes vérsejtje hordozza az antigént (jobb oldali panel). Az antigént hordozó vakuólumok (középső panel, fent) szerkezetének és funkciójának a vizsgálata a metamorfózis során zajló, a plazmatociták közreműködésével zajló, eddig kevésbé ismert szövetátrendeződés folyamatának a megértését, a vakuólumokra és az adult vérsejtjeire jellemző molekulának a jellemzése pedig a plazmatociták funkciójának a megismerését segítheti. Létrehoztuk a molekula génjének azonosításához szükséges expressziós génkönyvtárat és antigén izolálásához speciális immunprecipitációt dolgoztunk ki.



**1.2.) Az embrió makrofágjaira jellemző molekula** az embrióban kizárólag a makrofágokon nyilvánul meg, azonban a lárva és az adult valamennyi vérsejtjén, a szívcső sejtjein és a központi nyirokszerv sejtjein is jelen van. A molekulát eddig sem biokémiai vagy molekuláris genetikai módszerrel nem sikerült jellemezni.

**1.3.) A lamellocitákra jellemző új markereket azonosítottunk.** Mivel korábbi megfigyeléseink azt mutatták, hogy a tokképzésben résztvevő lamellociták egy jól jellemezhető kompartmentumból származnak (Márkus és mtsi. PNAS, 2009) megkíséreltük olyan markerek azonosítását, melyek segítségével az összejtéig visszanyúlva nyomon követhetjük a sejtek érését. A kompartmentumból izolált sejtekkel immunizálva olyan markereket azonosítottunk, melyek az érett lamellocitákon is jelen vannak. Elsőként azonosítottunk továbbá egy fehérjét, mely kizárólag a lamellociták magjában van jelen és ez fölveti azt a lehetőséget, hogy a fehérje egy, a lamellociták differenciálódását szabályozó transzkripciós faktor (alábbi ábra).



**1.4.) Az L5 antigénről megállapítottuk,** hogy a molekula egy adapter típusú sejtvezérlő fehérje magas molekulahúlyú izoformája mely részt vesz a lamellociták differenciálódásának a szabályozásában, a lamellocita differenciálódás szuppresszáálásával (Rus és mtsi. 2006),

**2.) A vérképzést és a vérsejtek funkcióit szabályozó géneket és molekulákat azonosítottunk transzkriptóm analízissel és genetikai screenek alkalmazásával.**

**2.1.) Transzkriptóm analízis**

**2.1.1.) Vérsejtpopulációk analízise**

A lamellociták differenciálódását szabályozó faktorok azonosítására transzkriptóm analízis végeztünk. A vérsejteket a korábban leírt rozetta-módszerrel szeparáltuk l(3)mbn-1 mutáns törzsből és Oregon-R vad típusú lárvákból a korábban azonosított sejttypusspecifikus markerek alkalmazásával. A szeparált sejtekből Trizol regenssel teljes RNS-t izoláltunk, DNázssal kezeltük és Quiagen RNEasy kittel tisztítottuk. Az RNS mintákat a cDNS szintézis lépésnél aminoallyl-lal kezeltük, majd az aminoallylhoz

kötöttük a Cy3 ill. a Cy5 fluoreszcens festéket. A jelölt cDNS mintákat párban, a *Drosophila* genom 99,6%-át reprezentáló, 21306 transzkriptet tartalmazó PCR fragment alapú Heidelberg FlyArray *Drosophila* chipre (Hild et al. Genom Biology, 2003) hibridizáltuk. A kísérletek nem hoztak olyan eredményt melyből bármilyen, a lamellociták differenciálódására vonatkozó bármilyen szilárd következtetést le tudunk vonni, azaz a jellemzett sejtpopulációk génexpresszió-mintázatában nem találtunk jellegzetes különbségeket. A különbségek hiányára a 2008-ban végzett, az L2-4-6 antigéneknek vizsgálatán alapuló eredményeink adnak magyarázatot (3.2. pont)

### 2.1.2.) Atilla mutáns törzsek analízise

Az L1 (Atilla) antigénre nézve nullmutáns törzs transzkriptóm-analízisét végeztük el a fenti módszerrel, kivéve, hogy a detektálásra Affymetrix GeneChip®*Drosophila* 2.0 Array-t használtunk. Mivel az Atilla fehérjét kódoló gén mutáns alléljei önmagukban nem okozzák a lamellociták képződésének, sem a tokképzés folyamatának sérülését, bár a lamellociták fő funkciója a tokképzés során a szoros összekapcsolódásuk, amelyet több adhéziós molekula kölcsönhatása és ezek együttműködése biztosíthat. Részletes expressziós analízissel, microarray módszerrel kívántuk megvizsgálni, hogy milyen változások történnek parazitoid darázsfertőzést követően a lárvális élet során az Atilla fehérje hiányában, amelynek eredményei új irányt adhatnak a lamellociták tokképzésben betöltött szerepének vizsgálatához. Az Atilla fehérje expressziójában nullmutáns egyedek lárvális mRNS populációját hasonlítottuk össze az Atilla fehérjét kifejező kontroll törzsszel, *Leptopilina bouvardi* G486 parazitoid darázsfertőzést követően 24, 48 és 72 óra elteltével, amelyek a tokképzés folyamatának három állomását tükrözik, különösen a vesejtek differenciálódásának stádiumait és azoknak a darázspetéhez való asszociációját. A fluoreszcens festékekkel jelölt mRNS minták hibridizálása az Affymetrix GeneChip® *Drosophila* 2.0 Array alkalmazásával történt a három időpontban páronként. Összesen 3507 transzkript expressziós szintje változott a három időpontban. A logaritmikus skála szerinti háromszoros vagy annál nagyobb mértékű expressziós változásokat mutató géneket választottuk ki a további vizsgálatok céljából. Ezek közül 14 olyan gént választottunk ki, amelyek mindhárom időpontban csökkent vagy megnövekedett expressziót mutatnak. Ezeknek a géneknek egy része bizonyított vagy potenciális immunfunkcióval rendelkezik, pl. sejtadhéziós molekula vagy mintáztfelismerő receptor, nagyobb részük szerepe azonban ismeretlen. Ezeknek a géneknek a részletesebb vizsgálata közelebb vihet minket a parazitoid darazsak elleni védelem lépéseinek megértéséhez illetve a folyamatban szerepet játszó molekulák megismeréséhez.

	az expressziós	protein domén	potenciális funkció
--	----------------	---------------	---------------------

	szint növekedésének mértéke (log)				
annotáció	24 óra	48 óra	72 óra		
CG8577 (PGRP- SC1b)	2,98	1,32	1,01		immunvédekezés
CG15735	1,34	1,26	0,95	pentaxin	lehetséges immunvédekezés
CG6788	3,05	2,28	0,75		sejtadhézió, baktériumok elleni immunvédekezés
CG9040	1,92	1,62	1,26		
CG5097 (mtnC)	1,69	1,27	1,85	DNS/RNS nem specifikus endonukleáz	fémekhomeosztázisa
CG3819	2,83	2,09	3,42		
	az expressziós szint csökkenésének mértéke (log)				
annotáció	24 óra	48 óra	72 óra	protein domén	potenciális funkció
CG6579 (atilla)	6,72	5,36	6,14		
CG15173	3,13	1,18	2,24	tetrtrico-peptid ismétlődés	
CG32368	1,89	2,47	0,79		
CG33346	1,25	0,37	1,52	DNS/RNS nem specifikus endonukleáz	
CG3568	1,21	1,11	1,38		
CG9766	1,07	0,71	0,86	ankyrin ismétlődés	
CG6870	0,63	1,18	0,56	citokróm c	
CG3599	0,75	0,78	1,75	nitriláz/N-karbamil-D- aminosav amidohidroláz	sejt-sejt kommunikáció, sejtadhézió
CG13075	0,44	0,79	1,13	kitin kötő domén	

## 2.2.) Genetikai screenek

**2.2.1.) Funkcióvesztéses genetikai screenben** azonosított epigenetikus regulátor génnek a vérsejtképzésben játszott szerepét jellemeztük. Megállapítottuk, hogy a génnek szerepe

van a vérsejtek osztódásának szabályozásában. A gén mutációja a keringő vérsejtek számának növelésén kívül a központi nyirokszerv proliferációját és immunindukció nélkül a lamellocyták differenciációt okozza. Megállapítottuk, hogy az epigenetikus regulátor mutáns háttérben a kristálysejtek sorsát kialakító mestergén a lozenge expressziója megemelkedik. A homozigóta mutáns lárvákban lozenge expressziót mutattunk ki nemcsak a kristálysejtekben, hanem egy lamellocyta alcsoportban is. További vizsgálatokkal kimutattuk, hogy ez a lozenge pozitív lamellocyta alpopuláció immunindukció hatására vad háttéren is megjelenik. Hőmérséklet érzékeny lozenge mutánsokban vizsgáltuk a kristálysejtek és lamellocyták megjelenését különböző hőmérsékleteken immunindukció nélkül és immunindukciót követően. Eredményeink alapján a lozenge gén nemcsak a kristálysejtek, de a lamellocyták sejtors meghatározását is irányítja. Az epigenetikus mutáns háttérben a lozenge regulációjának zavara együtt jár a lamellocyták ektopikus megjelenésével (Bajusz és mtsi. a kézirat megírás alatt).

**2.2.2.) A hemocita-specifikus meghajtóelemeket hordozó törzseink segítségével RNSi mutáns gyűjteményben *in vivo* vizsgálható a vérképző szövetek kialakulása.** A vérsejtek anatómiailag jól körülhatárolható ún. vérsejt kompartmentumokban vannak jelen és differenciálódnak. Lárvában három ilyen kompartmentumot különböztetünk meg: a keringést, a központi nyirokszervet és a szesszilis szövetet. Ez utóbbiról nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Munkacsoportunk írta le ennek a szövetnek a funkcióját a sejt közvetítette immunválasz során. Immunindukciót követően ezek a vérsejtek belépnek a keringésbe és részt vesznek a sejt közvetítette immunválaszban, sejtjeinek egy részéből speciális immunsejtek, a lamellocyták differenciálódnak (Márkus és mtsi, PNAS, 2009). A szesszilis szövet sejtjeinek eredetéről illetve kialakulásáról nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Annak érdekében, hogy a szigetekben lévő vérsejtek differenciálódását illetve egy lehetséges niche működését megismerjük, szesszilis szövetspecifikus gének és géntermékek azonosítására tettünk kísérletet. Ezért széleskörű genetikai screent végeztünk, melyben az általunk létrehozott vérsejtspecifikus meghajtóelemeket tartalmazó törzseket valamint a Japán Nemzeti Genetikai Intézet által létrehozott RNSi mutáns gyűjteményt használtuk (NIG-Fly), amely törzsgyűjtemény folyamatosan bővül. A széleskörű RNSi-mutáns gyűjteményt létrehozásának célja a gének illetve génhálózatok szerepének megismerése valamint az új gének azonosítása volt. A gyűjtemény egyes elemei már 2006-ban rendelkezésre álltak, ezért saját gyűjtemény létrehozása okafogyottá vált. Az UAS-GAL4 rendszer révén szövetspecifikus meghajtóelemekkel kettős szálú RNS termeltethető, amelynek következtében a célgén termékének kifejeződése számottevően csökken. Ezáltal *in vivo* rendszerben vizsgálható a különböző gének funkciója illetve hiányának / csökkenésének hatása. A munkacsoportunk által létrehozott genetikai eszközök révén lehetőségünk nyílt a szesszilis szövet kialakulásának komplex genetikai vizsgálatra. A hemocita-specifikus meghajtóelemeket hordozó törzseinkben (Hemese-GAL4, UAS-GFP; Hemolactin-GAL4, UAS-GFP) *in vivo* vizsgálható a szesszilis vérképző szövet kialakulása. Jelen esetben a hemocita-specifikus meghajtóelemeket hordozó törzseket bekeresztettük az RNSi mutánsgyűjtemény törzseivel, az utódokat vizsgáltuk *in vivo*. Olyan fenotípusú lárvákat keresünk, amelyekben valamilyen módosulást tapasztaltunk a szesszilis vérképző szövetben. A jelöltek jellemzése folyamatban van. Egyik jelöltünk az egyik általunk

azonosított plazmatocita specifikus gén homológja, amely számos Nim repeatet tartalmaz. Ebben a lárvában a géncsendesítés következtében a szesszilis szövet szerkezete felbomlik, nincs jelen a jellegzetes sávozott mintázat. Lehetséges, hogy ez a molekula a baktériumok megkötésén kívül a sejteknek a testüreg falához való kitapadását biztosítja, hasonlóan az adhézións molekulákhoz. A szigeteken a sejtek egymáshoz kapcsolódva fürtszerűen helyezkednek el, ezért egy lehetséges kapcsoló molekula hiánya okozhatja a tapasztalt fenotípust. A jelölt gén konstitutívan aktív RNSi homozigóta törzsének előállítását folyamatban van, a további kísérleteket ezzel a törzssel végezzük. Eredményeink azt sejtetik, hogy a szesszilis szigeteken egy niche-szerű szöveti differenciálódási egység van jelen, amelynek a szerkezete egyelőre nem ismert és amelyet, a fenti mutáció vonatkozásában jelenleg is vizsgálunk.

### **3.) A veleszületett immunitás effektor-fázisának jellemzése.**

#### **3.1.) A fagocitózist szabályozó molekula azonosítása**

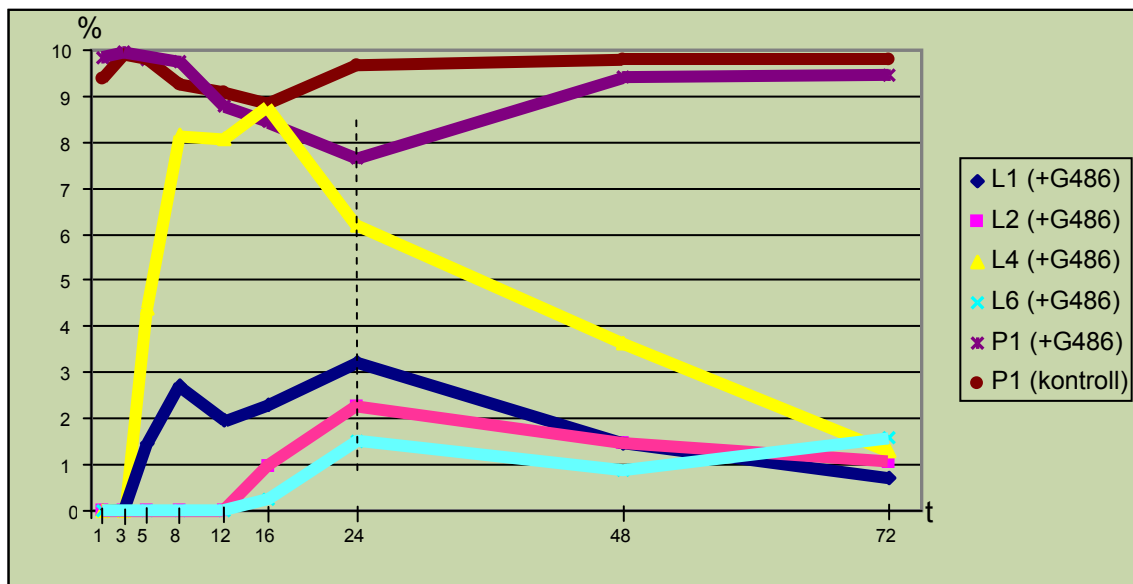
A *Drosophila melanogaster* fagocita sejtjein egy eddig ismeretlen molekulát, a NimC1-t, azonosítottunk és jellemeztünk, mely részt vesz a fagocitózis folyamatának a szabályozásában (Kurucz és mtsi, Current Biology, 2007). Az immunoprecipitált NimC1 molekula MALDI-TOF analízise során két peptid szekvenciája egy annotált *Drosophila* gént határozott meg, amit nimC1-nek nevezünk el. Annak igazolásához, hogy a nimC1 gén valóban a *Drosophila* fagocita sejtjein megnyilvánuló NimC1 fehérjét kódolja, a génterméket az S2 embrionális eredetű, NimC1-t nem expresszáló „NimC1 negatív” *Drosophila* sejtvonalon fejztettük ki. Ehhez a *Drosophila* Genomics Resource Center-ből beszerzett cDNS-t a pMT/V5-HisA expressziós vektorba klónoztuk, de a szekvenálás során kiderült, hogy ez a cDNS a genomi szekvenciához képest két bázis deléciót tartalmaz. A hibás régiót kivágtuk és a helyére a genomi szekvenciáról PCR-rel átírt szakaszt illesztettünk. A javított nimC1 cDNS-t tartalmazó *Drosophila* metallothionein (MT) promoterral meghajtott pMT/V5-HisA expressziós vektort S2 sejtekbe transzfektáltuk és rézszulfát indukciót követően a NimC1 fehérje expressziót specifikus ellenanyagainkkal indirekt immunofluoreszcenciával élő sejteken vizsgálva a sejtmembrán festődését detektáltuk. A NimC1 fehérje fagocita sejteken történő megnyilvánulását a nimC1 gén kettősszalú RNS interferencián alapuló géncsendesítésével sikeresen gátoltuk. Ehhez létrehoztuk a nimC1 inverted repeat-eket tartalmazó UAS-nimC1-IR hairpin konstrukciót, melyet, a kizárólag a *Drosophila* vérsejtjeiben, a hemocitákban megnyilvánuló Hemese gén promotor régióját tartalmazó Hemese-Gal4 (He-Gal4) meghajtó elem segítségével expresszáltattunk. A transzgenikus lárvákban a NimC1 kifejeződése szignifikánsan csökkent, ami szintén arra utal, hogy az általunk azonosított transzmembrán fehérje azonos a nimC1 géntermékkel. A transzfektált S2 sejteken és az RNS-inhibíciós konstrukttal transzfektált egyedeken funkcionális vizsgálatokat végeztünk, melynek eredményeként a nim-C1 molekulát egy új típusú repeateket –nim-repeatek- tartalmazó fagocita receptorként jellemeztünk (Kurucz és mtsi, Current Biology, 2007). A jellegzetes repeatek egy eddig nem azonosított géncsaládot határoznak meg, mely géncsalád filogenetikai anlizisét is elvégeztük (4.1. pont).

### 3.2.) A tokképzés folyamatának immunológiai és genetikai vizsgálata

#### 3.2.1.) A lamellociták differenciálódásának funkcionális- és markeranalízise

A tokképző reakcióban résztvevő sejteken, a lamellocitákon megnyilvánuló antigéneket azonosítottunk, melyeknek segítségével lehetővé vált a lamellocitáknak és közvetlen előalakjaiknak a jellemzése és szeparálása. A szeparált populációk transzkriptóm analízise nem várt eredménnyel járt (2.1. pont), ezért - minden eddigi időfelbontástól eltérően - 2 órás időablakokban vizsgáltuk a lamellocita antigének expresszióját és a sejtek morfológiai és funkcionális jellemzőit, az immunindukciót követően.

Megállapítottuk, hogy az antigének expressziója nem abszolút, azaz az immunindukciót követően jellegzetes populációdinamika figyelhető meg.



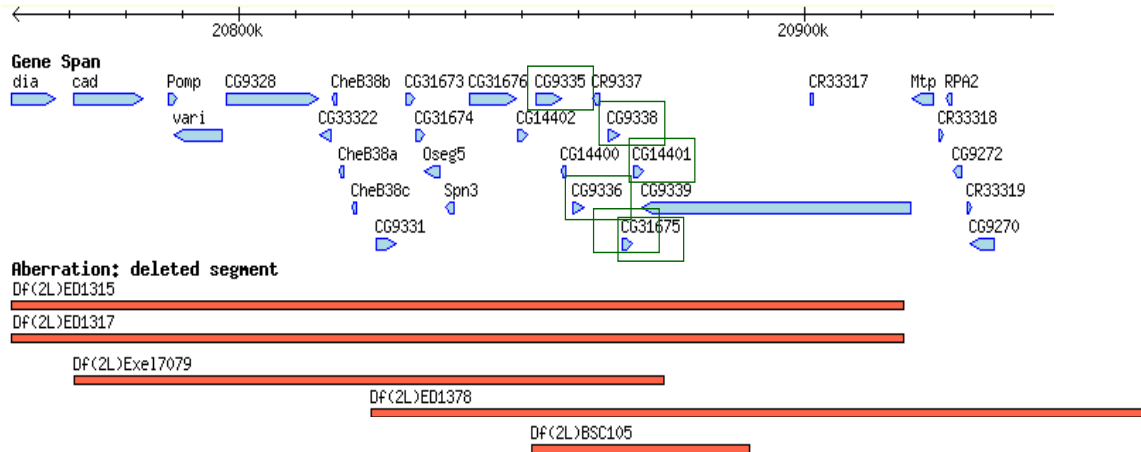
A NimC1 (P1) plazmatocita-specifikus antigént kifejező sejtek aránya az immunindukciót követően nem változik. Az egyes lamellocita-antigéneket hordozó sejtek aránya arra enged következtetni, hogy az immunindukciót követő korai időintervallumban található a keringésben olyan sejtek, melyek egyidejűleg pozitívak a lamellocita specifikus L1 és L4 valamint a NimC1 antigénekre nézve. Ezt az eredményt lamellocitaspecifikusan GFP-riportergént kifejező vonalban, P1 immunfestéssel direkt módon megerősítettük. Megállapítottuk azt is, hogy az immunindukció után korán megjelenő, lamellocita specifikus antigéneket (L1, L2, L4) kifejező sejtek képesek baktériumok bekebelezésére. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a lamellocita-specifikus antigének az immunindukciót követően szekvenciálisan nyilvánulnak meg. A szesszilis kompartmentumból származó (Márkus és mtsi, PNAS, 2009) előalakok intenzíven fagocitálnak, a markerekre nézve egymással részlegesen átfedők. Az előalakokból differenciálódó és a markerekkel jellemezhető köztesalakok a differenciálódás során fokozatosan veszítik el fagocitáló képességüket. A tokképzés fő

sejtes elemeit alkotó terminálisan differenciálódott lamellociták nem fagocitálnak és az L6 antigénnel jellemezhetők (Honti és *mtsi*, kézirat elkészült).

### 3.2.2.) A lamellociták effektor funkciójának genetikai szabályozása

Az *atilla* gén homológjainak vizsgálata során a *Drosophila* 2. kromoszómájának 38F régiójában olyan mutációt azonosítottunk, amely a parazitoid darázs ellen lejátszódó tokképzési reakció utolsó lépésében, a melanizációs folyamatban mutat defektust, amely a parazitoid darázs pusztulásához vezető szabadgyökök felszabadulásáért felelős lépés. A mutációt térképezzük a régiót átfedő deléciók és a régióban megtalálható P-elemek felhasználásával (alábbi ábra). A fenotípusért felelős gén, vagy szabályozó elem meghatározása jelentősen hozzájárulna az immunvédekezés effektor lépéseinek mélyebb ismeretéhez.

A 38F kromoszóma 100 kb szakaszának genomikus régiója. Kékkel a régióban található gének, pirossal az átfedő deléciók vannak feltüntetve, zöld négyzettel pedig az *atilla*-szerű géneket jelöltük. Az átfedő deléciók közül csökken a melanizációs képessége a Df(2L)ED1317, a Df(2L)ED1378 és a Df(2L)BSC105 homozigóta letális delécióknak.



## 4.) A sejtfelszíni antigének evolúciója

### 4.1.) A nimród gén- és fehérjecsalád vizsgálata



A *Drosophila melanogaster* teljes proteomjában végrehajtott homológia keresések segítségével több olyan fehérjét is találtunk, melyek NIM repeateket tartalmaznak. Ezek a gének egy gén-szupercsaládot alkotnak, ennek tagjai legnagyobb változatosságban a rovarokban található meg. Filogenetikai vizsgálatainkat emiatt rovarokra korlátoztuk. A nagyobb időléptékű változásokat egymástól távolabbi rokonságban álló fajok szekvenciáinak összehasonlításával követtük (Hymenoptera: *Apis mellifera*; Coleoptera: *Tribolium castaneum*; Diptera: *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*), a finomabb felbontású vizsgálatokhoz különböző *Drosophila* fajok szekvenciaadatait használtuk. Bár a vizsgált fajok esetében teljes genomszekvenciák állnak rendelkezésünkre, a gének annotálása nem történt még meg teljes megbízhatósággal. Emiatt az összegyűjtött és a felhasználni szándékozott gének és az általuk kódolt fehérjék szekvenciáit egyenként megvizsgáltuk és szükség esetén módosítottuk az adatbázisban szereplő adatokat. A végleges szekvencia-illesztéseket és leszármazási fákat így a lehető legpontosabb adatok felhasználásával készítettük el.

A Nimród gének evolúcióját három szempontból is megvizsgáltuk (Somogyi és mtsi. Mol.Biol. Evolution, 2008).

A NIM repeat szekvenciájának a széles elterjedtségű EGF repeat-tel történő összevetéséből kiindulva javaslatot tettünk a **NIM repet kialakulásának** modelljére. Eszerint egy ősi, többszörös EGF ismétlődést hordozó fehérjében lezajlott szekvencia-átrendeződések vezettek egy olyan fehérje kialakulásához, melyben az EGF lánc első két eleméből egy EMI domén és egy NIM repeat keletkezett. Ez a modell egyszerre ad magyarázatot a NIM repeat és az EMI domén létrejöttére és föl hívja a figyelmet a repetitív egységekben lezajló átrendeződések jelentőségére az új fehérjedomének kialakulásában.

Ebből a legősibbnek tekinthető Nimród fehérjéből alakultak ki később a további Nimród fehérjeváltozatok. Változatos filogenetikai módszerek alkalmazásával leírtuk a **Nimród szupercsalád evolúcióját**: típusainak és azokon belül az egyes géneknek valószínűsíthető kialakulását, leszármazását. Eszerint az ősi, EMI domént és egyetlen NIM repeatet, valamint számos EGF repeatet hordozó fehérjéből (Draper-típus) az EGF elvesztésével és a NIM repeatek többszöri duplikációjával alakulhattak ki a csak rovarokban megtalált poli-NIM típusú fehérjék. Ezek közül ősibbnek tekintjük a Draper-típushoz hasonlóan transzmembrán domént (TMD) tartalmazó Nimród C-típusú fehérjét, melyből a TMD elvesztésével jöhettek létre a Nimród B típusú fehérjék. Az egyes típusokon belül rekonstruáltuk az odatarozó gének leszármazását is. A Nimród gének mindhárom típusa esetében rendelkezésre állnak olyan kísérleti adatok, melyek Nimród gének immunfolyamatokban való részvételét írják le, a szupercsalád filogenetikája így az immunrendszer evolúciójának megértése szempontjából is fontos adat.

A sokszoros ismétlődésben megtalálható NIM repeatek alkalmat adtak a repetitív egységek evolúciójának megvizsgálására. A probléma alaposabb analizésére kifejlesztettünk egy hatékonyan bizonyult bioinformatikai eljárást (Sipos és mtsi., **BMC Bioinformatics**, 2008). A **NIM repeatek evolúciója** változatos mintázatokat mutat, mind a születés-és-halál („birth-and-death”), mind az összehangolt („concerted”) evolúcióra

utaló jelenségek megfigyelhetők. Ennek a munkának az elméleti jelentősége mellett kiemelhető, hogy immunfolyamatokban résztvevő fehérjékben nagyon kevés ilyen jellegű adat került még közlésre.

A Nimród génekkel kapcsolatos további megfigyelésünk szerint a gének többsége egymás közvetlen közelében helyezkedik el a rovarok genomjaiban. A jelenség érdekességét tovább növeli, hogy a Nimród géneken kívül további 3 géncsalád tagjai is rendre megtalálhatók ezekben a klaszterekben. Ez a feltűnő mértékű konzervált kapcsoltság felveti egy összehangolt expressziójú, az immunfolyamatokban szerepet játszó génklaszter lehetőségét. Az ezzel kapcsolatos vizsgálataink jelenleg is folynak és ez munka terveink szerint ebben az évben egy további kézirat elkészítéséhez fog vezetni.

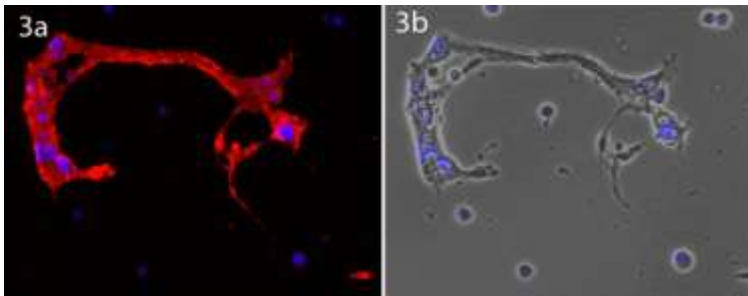
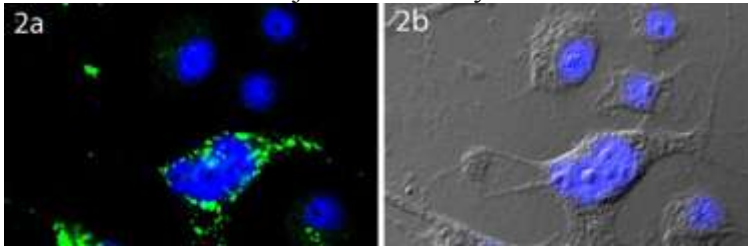
#### 4.2.) A vérsejtantigének megnyilvánulása *Drosophila* fajokban

A *Drosophila* Genom Projekt keretében eddig több *Drosophila* faj teljes genom és transzkriptóm analízise fejeződött be. A *Drosophila melanogaster* modellszervezet mellett ezért a többi *Drosophila* faj immunitásának a vizsgálata is elkezdődött. A *Drosophila* fajok immunitásának a vizsgálata során az általunk kifejlesztett detektáló rendszer egyéb *Drosophila* fajokra történő kiterjesztésének a lehetőségét vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a *melanogaster* alcsoportba tartozó fajokban a reagensek egy része használható. A vizsgálatok során azt is megállapítottuk, hogy az egyik korábban azonosított reagens minden eddig tesztelt faj fagocitáló sejtjével, a plazmatocitákkal reagál, ezért a jövőben univerzális reagensként használható a *Drosophila* fajok immunrendszerének a vizsgálata során. Azt is megállapítottuk, hogy a molekula tömege minden fajban azonos, 10 kDa, ami igen nagyfokú konzerváltságra utal. A marker molekuláris jellemzése és egyéb rovarfajokban történő tesztelése folyamatban van.

#### Általános plazmatocita marker kifejeződése *Drosophila* fajokban

Fajok	Lárva hemociták	Adult hemociták	WB lárva testeken 10kDa
<i>D. pseudoobscura</i>	+++	+++++	+
<i>D. takahasi</i>	+++	+++++	n.d
<i>D. eugracilis</i>	Plz +++ , Lam-	+++++	+
<i>D. erecta</i>	Plz ~70% +++	+++++	+
<i>D. simulans</i>	+++++	+++++	n.d.
<i>D. virilis</i>	+++++	+++++	+
<i>D. yacuba</i>	++++ (Heterogén)	+++++	+
<i>D. teisseri</i>	+++ (Heterogén)	+++++	+
<i>D. hydei</i>	+++	+++++	+
<i>D. mauritana</i>	+++	+++++	-
<i>D. kikkawai</i>	+	+++++	+
<i>D. bipectinata</i>	++++	+++++	+
<i>D. ananassae</i>	+	+++++	+
<i>D. melanogaster</i>	++ (Heterogén)	+++++	-

A *Drosophila* fajokon végzett kísérletek során eddig nem jellemzett morfológiai sajátosságokkal rendelkező sejtípusokra lettünk figyelmesek. Mivel ezek a sejtek eddig ismeretlenek, érdekesnek gondoltuk sejtípus-specifikus molekuláris markerek fejlesztését. Kísérleteink sikerrel jártak; az újonnan azonosított sejteket az alábbi ábrán mutatjuk be, a bal oldali panelen pedig a specifikus reagensek reakciói láthatók. A sejtek és a markermolekulák jellemzése folyamatban van.



## 5.) Oktatás

A csoport munkatársai részt vettek a szegedi egyetemi oktatásban és a posztgraduális képzésben. "Veszélyes immunitás" címmel 26 órás kurzust tartottunk/ a SZTE diákjai és a posztgraduális képzésben résztvevők részére 2006-ban és 2007-ben. A szemeszter kollokviummal zárult. Az előadások tartalmát digitális adathordozón rögzítettük, amelyet minden, a kurzuson résztvevő hallgatónak és érdeklődőnek átadtunk.

2006-ban és 2007-ben 24 órából álló magyar nyelvű kurzust tartottunk Veszélyes Immunitás címmel a kolozsvári Babes-Bolyai Tudományegyetemen és előadásokat tartottunk „Innate Immunity” címmel a kolozsvári Babes-Bolyai Tudományegyetemen a Molekuláris Biológiai posztgraduális továbbképzés keretében.

A kolozsvári Babes-Bolyai Tudományegyetemen 2007-ben 8 órás gyakorlatot tartottunk, amelyen a *Drosophila melanogaster* immunrendszerének a vizsgálati lehetőségeit mutattuk be, valamint alapvető immunológiai módszereket tanítottunk.

A fentiekén túl a csoport munkatársai rendszeresen tartanak elméleti órákat és gyakorlatokat a Szegedi Tudományegyetemen.

Honti Viktor:

2007 és 2008-ban: Válogatott fejezetek a modern muslicagenetikából

4 x 45 perc előadás

Zsámboki János:

2006: Szegedi Tudományegyetem: Genetika gyakorlat (Egész félév, 12 alkalom 12x240 perc)

2006és 2007 Szegedi Tudományegyetem: Genetika gyakorlat Egész félév, 12 alkalom 12x240 perc

2007-2008: Szegedi Tudományegyetem: Válogatott fejezetek a modern muslicagenetikából 2x35 perc

2008-2009: Szegedi Tudományegyetem: Válogatott fejezetek a modern muslicagenetikából 2x45 perc

Márkus Róbert

2006. Szegedi Tudományegyetem, Biológus Képzés, Genetika Tanszék - Genetikai Gyakorlat 12x240 perc

2008. Szegedi Tudományegyetem, Biológus Képzés- Mikroszkópos technikák – elmélet és gyakorlat 2x90 perc

Laurinyecz Barbara

2006. Drosophila genetika: 12x3 óra

Kurucz Éva

2006. Nemzetközi Továbbképző Tanfolyam: Immunological Methods 2 óra, Innate Immunity 2 óra

2007. Nemzetközi Továbbképző Tanfolyam: Immunological Methods 2 óra, Innate Immunity 2 óra

2008. Nemzetközi Továbbképző Tanfolyam: Immunological Methods 2 óra, Innate Immunity 2 óra

A laboratóriumban egy PhD fokozat született (Márkus Róbert), egy PhD dolgozat védelem előtt áll (Honti Viktor), egy PhD dolgozat van megírás alatt (Zsámboki János) és a laboratóriumban jelenleg három szakdolgozó végez kutatómunkát.

**6. Megjegyzés:** Az általunk azonosított markereket a *Drosophila* vérésejt-differenciálódását és funkcióit vizsgáló laboratóriumokban rutinszerűen használják (2006 óta 322 reagens mintát küldtünk).