

**A Nimród fehérje- és géncsalád szerepe a  
mikroorganizmusok felismerésében és bekebelezésében**

**PhD értekezés**

**Szerző:**

**Zsámboki János**

**Témavezető:**

**Dr. Kurucz Éva**

**Biológia doktori iskola**

**MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

**Genetikai Intézet**

**SZTE TTIK**

**2013**

**Szeged**

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3. old
1. Bevezetés	4. old
1.1 A <i>Drosophila melanogaster</i> immunvédekezése	4. old
1.2 A NimC1 fehérje doménszerkezete és a nimród géncsalád	10. old
2. Célkitűzések	15. old
3. Anyagok és módszerek	16. old
3.1 Anyagok	16. old
3.2 Módszerek	19. old
4. Eredmények	30. old
4.1 A P1 molekula azonosítása	30. old
4.2 A NimC1 fehérjét kódoló <i>nimC1</i> gén azonosítása	31. old
4.3 A nimród géncsalád tagjainak transzkripciója	33. old
4.4 A NimC1 szerepe a fagocitózisban	37. old
4.5 A natív, hemocitákból izolált NimC1 fehérje baktériumkötése	38. old
4.6 A NimC1 fehérje ligandjának vizsgálata	42. old
4.7 A rekombináns Nimród fehérjék baktériumkötése	44. old
5. Az eredmények megbeszélése	48. old
6. Köszönetnyilvánítás	53. old
7. Hivatkozott közlemények	54. old
8. Magyar nyelvű összefoglaló	60. old
9. Summary	63. old

## Rövidítések jegyzéke

**APS:** ammónium perszulfát  
**BSA:** marha szérumból származó albumin fehérje  
**DAPI:** 4,6-diamidin-2-fenilindol  
**DEPC:** dietil-pirokarbonát  
**DMSO:** dimetil-szulfoxid  
**EDTA:** 2-[2-(Bisz(karboximetil)amino)etil-(carboximetil)amino]ecetsav  
**FACS:** áramlási citometria (Fluorecence Activated Cell Sorting)  
**FITC:** fluoreszcein izotiocianát  
**GFP:** zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein)  
**HEPES:** 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav  
**IPTG:** izopropil-béta-D-thiogalaktopiranozid  
**KRPMI:** 5% marha szérummal kiegészített RPMI-1640 szövettenyésztő táptalaj (Roswell Park Memorial Institute)  
**LB:** Luria Bertani/Lysogenic Broth táptalaj  
**LDL:** alacsony sűrűségű lipoprotein (Low Density Lipoprotein)  
**LPS:** lipopoliszaccharid  
**LTA:** lipoteikolsav  
**MFI:** a fluoreszcencia-intenzitások számtani közepe (Mean Fluorescence Intensity)  
**NP-40:** Nonidet P-40 oktil fenoxipolietoxietanol  
**PG:** peptidoglikán  
**PGRP:** peptidoglican recognition protein  
**PRR:** Mintázatfelismerő receptor (Pattern Recognition Receptor)  
**PTU:** 1-fenil-2-tiourea  
**PVDF:** poli-1,1 difluoretilén  
**RMFI:** relatív fluoreszcencia intenzitás (a minta MFI és a kontroll MFI értékek hányadosa)  
**SDS:** sodium dodecil sulphate  
**TEMED:** tetrametiléndiamin  
**TRIS:** 2-Amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol  
**X-Gal:** 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid

# 1. Bevezetés

## 1.1 A *Drosophila melanogaster* immunvédekezése

Az eukarióta szervezetekre állandó veszélyt jelentenek a környezetükben nagy mennyiségben élő mikroorganizmusok, ezért homeosztázisuk fenntartásához hatékony védekező rendszer szükséges. A többsejtű szervezetek első védelmi vonalát a veleszületett immunitás képezi, amely a csíravonalban kódolt elemeivel azonnali immunválasszal képes fellépni a mikróbák ellen. A *Drosophila melanogaster*, az ecetmuslica a veleszületett immunitás egyik széles körben használt modellszervezete, immunrendszerének effektor folyamatai a bekebelezés, az antimikrobiális peptidek termelése és a melanizált tok képzése (Lemaitre és Hoffmann, 2007).

Az ecetmuslica nyílt keringési rendszerrel rendelkezik, a hemolimfájában keringő vérsejtek, a hemociták az immunválasz effektor sejtjei. A hemocitákat három morfológiailag eltérő csoportba sorolhatjuk, a keringő vérsejtek kilencvenöt százalékát a kisméretű (8-10  $\mu\text{m}$ ), kerek plazmatociták teszik ki. A plazmatociták a mikróbák és apoptotikus sejtek bekebelezésével, valamint antimikrobiális peptidek és extracelluláris mátrix fehérjék termelésével járulnak hozzá a szervezet homeosztázisának fenntartásához. A kristálysejtek a plazmatocitáknál nagyobb méretű (10-12  $\mu\text{m}$ ) kerek sejtek, a keringő vérsejtek öt százalékát teszik ki, a citoplazmájukban a vérnyirok-alvadáshoz és a tokképzéshez szükséges melanin bioszintézisét végző profenoxidáz enzim kristályait tartalmazzák. A hemociták harmadik típusába a nagyméretű (15-40  $\mu\text{m}$ ), lapos lamellociták tartoznak, amelyek a parazitoid darázsfertőzést követően jelennek meg a keringésben és a parazita petéjének a felületére tapadva a pete körül kialakuló melanizált tok képzésében játszanak szerepet (Evans és mtsai., 2003; Williams, 2007).

A mikróbák elleni immunvédekezés fontos effektor folyamata a bekebelezés vagy fagocitózis, amely az eukariótákra általánosan jellemző ősi, az evolúció során konzervált mechanizmus. A bekebelezés az eukarióta egysejtűekben a táplálkozáshoz szükséges, a többsejtűekben az egyedfejlődés során a szövetek átrendeződésében valamint az immunvédekezésben játszik szerepet. A többsejtűekben a fagocita sejtek az apoptózissal elpusztuló saját sejteket és a szervezet homeosztázisát felborító mikróbákat kebelezik be. A fagocitózis első lépése a bekebelezendő részecske felismerése, melyet a csíravonalban kódolt receptorfehérjék végeznek. Mivel ezek a fagocitózis receptorok a mikroorganizmusokra közösen jellemző molekuláris mintázatot ismernek fel, mintázatafelismerő receptoroknak nevezzük őket. A

mintázatfelismerő receptorok a mikrobák nagyobb rendszertani csoportjain megtalálható ligandjai lehetnek a lipopoliszaccharid, a peptidoglikán, vagy a lipoteikolsav, azaz egyetlen, csírvonalban kódolt receptorfehérje számos különböző mikroba felismerésére is képes.

A fagocitózis első lépése a bekebelezni kívánt mikroba felismerése és megkötése. A *Drosophila melanogaster*ben számos különböző típusú fagocitózis receptort írtak le eddig (Stuart és Ezekowitz, 2005; Stuart és Ezekowitz, 2008): a scavenger-receptorokat (Stuart és mtsai., 2005), a teljes átalakulással fejlődő rovarokban széles körben elterjedt, egyetlen csírvonalban kódolt génről alternatív splicinggal nagy számú különböző receptorfehérjét kódoló messenger RNS-t átírni képes DSCAM fehérjéket (Watson és mtsai., 2005), az NPC2 domént tartalmazó receptorokat (Shi és mtsai., 2012), a PGRP-LC fehérjét (Werner és mtsai., 2000), a Tep fehérjéket (Boun Aun és mtsai., 2011), valamint az epidermal growth factor (EGF) doméneket tartalmazó receptorfehérjéket, az Eatert, a Drapert és a NimC4-et (Kocks és mtsai., 2005; Manaka és mtsai., 2004). Az ismert fagocitózis receptorok működéséről szerzett ismereteink azonban sok szempontból hiányosak: számos génről csupán annyi adattal rendelkezünk, hogy Schneider-2 sejtvonalon végzett RNS inhibíció hatására csökken a sejtek fagocitáló képessége és sokszor a fehérjék biokémiai vizsgálatáról sincs adatunk. Számos fehérjecsaldának csak egyetlen reprezentatív tagjáról rendelkezünk adatokkal és a hozzájuk hasonló fehérjék működése is gyakran ismeretlen.

A mintázatfelismerő receptorok egyik típusa a scavenger-receptorokhoz hasonló szerkezetű fehérjék. Az emlős scavenger receptorok közös tulajdonsága, hogy képesek acetilált vagy oxidált LDL ligandot kötni, de a fehérjecsaldák számos tagja baktériumok vagy apoptotikus sejtek felismerésében játszik szerepet, ezek felületén általában több különböző, jellemzően polianionos ligandhoz kapcsolódnak (Peiser és mtsai., 2002). Az *ecetmuslica* genom több scavenger receptort is kódol, ám ezek funkciójáról keveset tudunk. A *Drosophila* Scavenger Receptor-CI (dSR-CI) módosított LDL-hez kötődik, valamint Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok fagocitálásában játszik szerepet. A dSR-CI fehérjét CHO sejtvonalon kifejeztetve, a hővel előlt *E. coli* és *S. aureus* baktériumok a sejtek felszínén aggregálódnak. Ez a baktériumkötés lipoteikolsavval gátolható, lipopoliszachariddal azonban nem. A dSR-CI transzkript mennyiségnek RNS inhibícióval történő csökkentése során a Schneider-2 sejtvonalon sejtjeinek baktérium fagocitáló képessége ötödével csökken (Rämet és mtsai., 2001). A dSR-CI molekula *D. melanogaster* genomban kódolt további három doménszerkezeti homológjának (dSR-CII, dSR-CIII, dSR-CIV) funkcióját még nem ismerjük (Rämet és mtsai., 2001, Pearson és mtsa., 1995).

Az emlősök B típusú scavenger receptoraihoz hasonló fehérjék is megtalálhatóak az ecetmuslicában. A *D. melanogaster* genomjában tizennégy, az emberi CD36 molekulához hasonló fehérjét kódoló gént azonosítottak (Herboso és mtsai., 2011). Ezek közül a Croquemort és a Peste fehérjék az emlős makrofágok scavenger receptorainak feladatát látják el az ecetmuslica hemocitáin. További négy CD36-hoz hasonló fehérjét kódoló gén, az *emp*, *ninaD*, *santa-maria*, *SNMP* szerepe ismert, ám ezek nem rendelkeznek immunfunkcióval (Voolstra és mtsai. 2006, Pak és mtsai., 2012, Jin és mtsai., 2008).

A Croquemort receptor ligandjai apoptotikus sejteken megnyilvánuló molekulák (Franc és mtsai., 1996, Franc és mtsai., 1999). A *croquemort* gén RNS inhibíciós csendesítése következtében csökken a sejtek *S. aureus* fagocitáló képessége, ám *E. coli* fagocitáló képességük nem változik. Ezen eredmények hatására vizsgálták meg az emberi CD36 receptort és fedezték fel, hogy az szerepet játszik az apoptotikus sejtek bekebelezésében. A HEK293 emberi sejtvonalban a CD36 fehérje kifejeztetése megnöveli a sejtek *E. coli* és *S. aureus* fagocitáló képességét, a CD36 fehérje hiánya viszont csökkenti az egér makrofágok *S. aureus* fagocitáló képességét (Stuart és mtsai., 2005).

A Peste receptor molekula a baktériumok bekebelezésében játszik szerepet. Megfigyelték, hogy a *peste* RNS mennyiségét csökkentő kettősszálú RNS konstrukttal kezelt Schneider-2 sejtek kisebb hatékonysággal kebelezik be a *Mycobacterium fortuitum* baktériumokat, viszont a Peste fehérje nem játszik szerepet sem az *E. coli*, sem a *S. aureus* fagocitálásában. Az emberi HEK293 sejtvonalban kifejeztetett Peste fehérje megnöveli a sejtek *M. fortuitum*, valamint kis mértékben *E. coli* és *S. aureus* felvevő képességét (Philips és mtsai., 2005).

A Dscam molekulát eredetileg az idegrendszer fejlődésében szerepet játszó fehérjeként azonosították. A *D. melanogaster* Dscam fehérjét kódoló génről alternatív splicinggal elméletileg tizenkilencezer különböző fehérjét kódoló messenger RNS molekula képződhet. Erről a rendkívül változékonysággal rendelkező fehérjéről az is kiderült, hogy a baktériumok fagocitálásában szintén szerepet játszik. A Dscam fehérje a zsírtestben és a keringő hemocitákban is kifejeződik. A sejtmembránhoz kötött Dscam molekula mellett egy rövidebb méretű, a hemolimfában keringő Dscam izoformát is azonosítottak. A Dscam funkcióvesztéses mutánsok hemocitái kevesebb *E. coli* baktériumot fagocitálnak, mint a vad típusú hemociták. Áramlási citometriával azt is kimutatták, hogy az egyes Dscam izoformák különböző affinitással kötődnek *E. coli* baktériumokhoz (Watson és mtsai., 2005).

A *D. melanogaster* genom több peptidoglikánt felismerő fehérjét (PGRP) kódoló gént tartalmaz, az általuk kódolt PGRP fehérjék közös jellemzője a róluk elnevezett PGRP domén (Werner és mtsai., 2000). A PGRP receptorok közül az PGRP-SA, PGRP-SD, PGRP-LE elsősorban a humorális immunválaszban játszik szerepet, a fagocitózis folyamatában a molekulacsalád egyetlen tagja, a PGRP-LC vesz részt. A PGRP-LC transzmembrán fehérje kifejeződésének RNS inhibíciós gátlása csökkenti a Schneider-2 sejtek *E. coli* fagocitáló képességét, míg a *S. aureus* bekebelezésére nincs hatással. PGRP-LC hiányában jelentősen csökken a Schneider-2 sejtek által immunindukció következtében termelődő antimikrobiális peptidek mennyisége. Immunindukció hatására a *PGRP-LC* null mutáns *ecetmuslica* egyedekben jelentősen csökkent a *Diptericin* messenger RNS mennyisége és ez a mutáns muslicatörzs a vad típusúnál érzékenyebb az *E. coli* fertőzésre is (Rämet és mtsai., 2002).

A *D. melanogaster* genom öt olyan gént tartalmaz, amely az állatvilágban erősen konzervált  $\alpha 2$ Macroglobulin fehérjecsaládba tartozó Tep (thioester-containing protein) fehérjét kódol. A *tep* géncsalád tagjai harmadik stádiumú lárvákban immunindukció nélkül a lymph glandben (*tep1*, *tep4*), a plazmatocitákban (*tep1*, *tep2*, *tep3*, *tep4*, *tep6*), fejeződnek ki, ám *E. coli* és *Micrococcus luteus* baktériumok keverékével végzett immunindukció hatására a *tep1*, *tep2* és *tep4* gének a zsírtestben is kifejeződnek, míg a *tep6* gén kifejeződése nem változik. Az Mcr/TepVI (macroglobulin complement related) mennyiségét RNS inhibícióval csökkentve Schneider-2 sejtekben csökken a sejtek *C. albicans* fagocitáló képessége, ám ezek a sejtek a kezeletlen Schneider-2 sejtekhez hasonlóan kebelezik be az *E. coli* baktériumokat és a gumigyöngyöket (Boun Aoun és mtsai., 2011). A különböző Tep fehérjék különböző mikrobák fagocitálásához szükségesek, a TepII fehérje RNS inhibíciós csendesítése hatására csökken a sejtek *E. coli* fagocitáló képessége, ám a *C. albicans* és *S. aureus* bekebelezése nem változik, míg a TepIII RNS inhibíciós csendesítése kizárólag a *S. aureus* fagocitózisát gátolja. Schneider-2 sejtek felülűszójával vad típusú *C. albicans* törzset kezelve, az Mcr fehérje Western blot elemzéssel kimutatható a *C. albicans* sejteken (Strochein-Stevenson és mtsai., 2006). Az *E. coli*, *E. cloacae*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* és *M. marinum* baktériumfertőzést követően a *tep1*, *tep2*, *tep3* és *tep4* funkcióvesztéses mutánsok életképessége meglepő módon megegyezik a vad típusal illetve a *tep1*, *tep2*, *tep4*, *tep6* funkcióvesztéses mutánsok a vad típusúhoz hasonló mértékben éltek túl a *Beauveria bassiana* gombafertőzést. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a Tep fehérjék működése redundáns, a mutáns fehérjék funkcióit a többi Tep fehérje képes helyettesíteni, az egyes *tep* gének funkcióvesztéses mutánsainak nincs mérhető fenotípusa (Boun Aoun és mtsai., 2011).

A közelmúltban azonosítottak egy új típusú, ML (MD-2 related lipid recognition) domént tartalmazó fehérjecsaládot, amelyekből a *D. melanogaster* genomja nyolcat kódol, ezeket NPC2-szerű fehérjéknek nevezik. Prokarióta expressziós rendszerben, *E. coli* baktériumban kifejeztetett rekombináns NPC2a, NPC2e és NPC2h fehérjék kötődnek lipopoliszaccharidhoz, Lipid A-hoz, peptidoglikánhoz és lipoteikolsavhoz (Shi és mtsai., 2012).

Az ecetmuslicában három epidermal growth factor (EGF) doméneket tartalmazó fagocitózis receptor ismerünk, a Draper-t, az Eater-t és a NimC4/Six microns under-t (Simu) (Ulvila és mtsai., 2011).

A Draper fehérjét elsőként apoptotikus sejtek receptoraként írták le. A *draper* messenger RNS mennyiségét az l(2)mbn sejtvonalon RNS inhibíció módszerrel csökkentve, a sejtek apoptotikus sejt fagocitáló képessége csökkent, ám a gumigyöngy és a zymosan (élesztő sejtfa polimer) bekebelezése nem változott. *D. melanogaster* embriókban a *draper* messenger RNS-t *in vivo* RNS inhibícióval csendesítve, az embrionális makrofágok apoptotikus sejt fagocitáló képessége csökkent (Manaka és mtsai., 2004). Az apoptotikus sejtek felszínén a Draper receptor ligandja a Pretaporter fehérje, a *pretaporter* null mutánsokban a hemociták és a gliasejtek alacsonyabb hatékonysággal kebelezik be a az apoptotikus sejteket az idegrendszer területén (Kuraishi és mtsai., 2009). A *draper* messenger RNS mennyiségét RNS inhibícióval csökkentve, a hemociták *E. coli* és a *S. epidermidis* fagocitáló képessége is csökken (Cuttell és mtsai., 2008, Hashimoto és mtsai., 2009).

Az *eater* gén csendesítésének hatására a Schneider-2 sejtek *E. coli* és *S. aureus* fagocitáló képessége is csökken. Az *eater* null mutánsok hemocitái alacsonyabb hatékonysággal fagocitálják a *S. marcescens* és *S. aureus* baktériumokat, mint a vad típusú hemociták, ez a fenotípus menekíthető az Eater fehérje kifejeztetésével. Az Eater fehérje N-terminális 199 aminosavnyi szakaszát rekombináns fehérjeként kifejeztetve áramlási citometriával kimutatható az Eater fehérje *S. marcescens* baktériumsejtekhez való kötődése (Kocks és mtsai., 2005). Szintén áramlási citometriás mérésekkel látták be, hogy a rekombináns Eater fehérje kötődik hőinaktivált vagy etil-alkohollal inaktivált Gram-negatív *E. coli*, *S. marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* és Gram-pozitív *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* baktériumokhoz, míg *Micrococcus luteus* baktériumokon és *C. albicans* gombákon nem mutattak ki Eater kötődést. A rekombináns Eater fehérje kötődik élő vagy formaldehiddel inaktivált *E. faecalis* és *S. aureus* baktériumokhoz, viszont nem kötődik élő vagy formaldehiddel inaktivált Gram-negatív *E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* baktériumokhoz (Chung és Kocks 2011a). A Cecropin A antimikrobiális peptiddel (Chung és Kocks 2011a) vagy lizozim enzimmel (Chung és Kocks 2011b) kezelt élő *E. coli* baktériumokat viszont köti az Eater



molekula. Ennek a jelenségnek valószínűleg az a magyarázata, hogy az ép bakteriális membránon belül rejtve marad az Eater receptor ligandja és a membrán fellazítása szükséges ahhoz, hogy a ligand az Eater receptor számára hozzáférhetővé váljon (Nehme és mtsai., 2011).

A NimC4/Simu (Kurant és mtsai., 2008) fehérjéről kimutatták, hogy a gliasejteken valamint az embrionális makrofágokon fejeződik ki és a központi idegrendszer érése során az apoptózissal elpusztuló sejtek fagocitózisában játszik szerepet. A NimC4 null mutánsa homozigóta életképes, fejlődési rendellenességgel nem rendelkezik, ám az embrionális idegrendszer fejlődése során ebben a mutánsban az apoptotikus sejtek eltakarítása késik (Kurant és mtsai., 2008).

**1. táblázat: A *Drosophila melanogaster* fagocitózis receptorok**

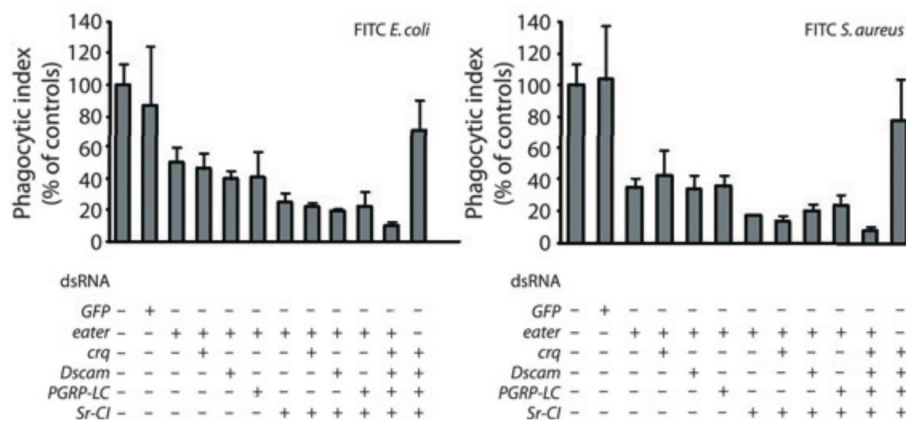
Receptor	Gram-negatív baktérium	Gram-pozitív baktérium	gomba	apoptotikus sejt
dSR-CI	+	+	NA	NA
PGRP-LC	+	-	NA	NA
MCR/TEP6	-	NA	+	NA
TEPII	+	-	-	NA
TEPIII	-	+	-	NA
Peste	+	+	NA	NA
Croquemort	+	+	NA	+
Dscam	+	NA	NA	NA
NPC2a, 2e, 2h	+?	+?	NA	NA
NimC4/Simu	NA	NA	NA	+
Draper	+	+	NA	+
Eater	+	+	NA	NA

**(NA=nincs adat)**

A *Drosophila melanogaster*ben eddig azonosított fagocitózis receptorok jelentős mértékben redundáns funkciókkal rendelkeznek, például *E. coli* baktériumok fagocitálásában a PGRP-LC, TEPII, Peste, Croquemort, Dscam, Draper és Eater fehérje is szerepet játszik. A legtöbb adatunk a Schneider-2 sejteken végzett funkcióvesztéses vizsgálatokból származik, ezek azonban néhol ellentmondanak a funkciónyeréses vizsgálatokból származó adatoknak. A *croquemort* RNS inhibícióval történő csendesítése hatására például a Schneider-2 sejtek *S. aureus* fagocitáló képessége csökkent, ám *E. coli* fagocitáló képességük nem változott, míg a *croquemort* gént emberi sejtvonalban kifejeztetve, a sejtek *S. aureus* és *E. coli* fagocitáló képessége is emelkedett. Több fagocitózis receptor esetében csak arról rendelkezünk adatokkal, hogy a lehetséges ligandok egyik osztályának a bekebelezésében játszik szerepet, így például az Eater molekula kötődik Gram-

negatív és Gram-pozitív baktériumokhoz is, de arról nincs adat, hogy a gombák vagy az apoptotikus sejtek fagocitózisában szerepet játszik -e (1. táblázat).

Az RNS inhibíciós vizsgálatok alapján arról is vannak ismereteink, hogy az egyes receptorok milyen arányban vesznek részt a fagocitózisban. Az *eater*, *croquemort*, *Dscam*, *PGRP-LC* és *Sr-CI* gének egyidejű csendesítése körülbelül 90%-kal csökkentette a Schneider-2 sejtek *E. coli* és *S. aureus* fagocitáló képességét (1. ábra), azonban az *eater* gén csendesítése önmagában 50%-kal csökkentette a sejtek fagocitáló képességét, a többi receptor szerepe ehhez képest lényegesen szerényebb. A *croquemort*, *Dscam*, *PGRP-LC* és *Sr-CI* gének együttes lecsendesítése kisebb mértékben csökkenti a sejtek fagocitáló képességét, mint önmagában az *eater* gén csendesítése (Ulvila és mtsai., 2011).



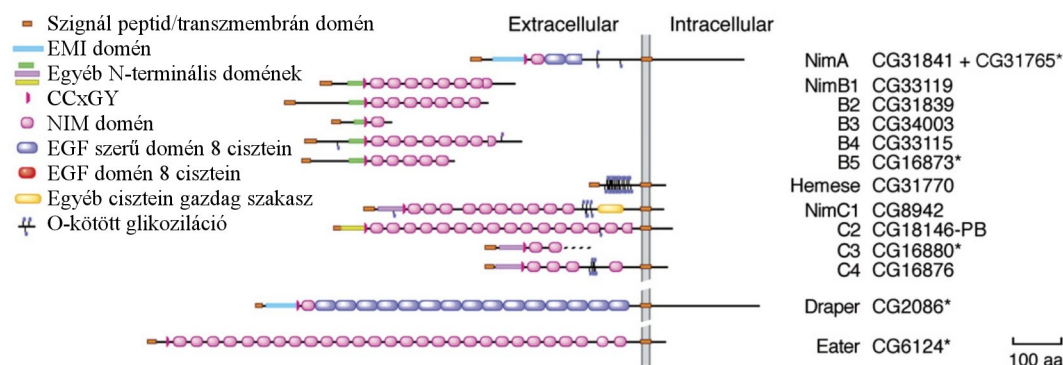
**1. ábra: Az eddig ismert fagocitózis receptorok szerepe Schneider-2 sejtek fagocitózisában**

Az eddig leírt fagocitózis receptoroknak a bekebelezés folyamatában betöltött szerepét Schneider2 sejtvonalban végzett RNS inhibícióval hasonlították össze. Az *eater* gén RNS inhibíciós csendesítése csökkenti legnagyobb mértékben az *E. coli* és a *S. aureus* baktériumok fagocitózisát, míg a *croquemort*, *Dscam*, *PGRP-LC*, *Sr-CI* szerepe lényegesen kisebb e két baktérium bekebelezésében (Ulvila és mtsai., 2011).

## 1.2 A NimC1 fehérje doménszerkezete és a *nimród* géncsalád

A *D. melanogaster* hemocitái molekuláris markerek segítségével is azonosíthatóak (Kurucz és mtsai., 2007a). Az első, kizárólag a plazmatocitákra jellemző transzmembrán fehérje az általunk azonosított NimC1 (Kurucz és mtsai., 2007b). A NimC1 fehérje a transzmembrán fehérjékre jellemző doménszerkezetet mutat: Rendelkezik szignál peptiddel, extracelluláris, transzmembrán és intracelluláris régiókkal. Az extracelluláris régió számos prediktált O- és N-glikozilációs hellyel rendelkezik, míg az intracelluláris régió számos prediktált szerin, treonin és tirozin foszforilációs

helyet tartalmaz (Blom és mtsai., 1999). Az extracelluláris régió a számítógépes predikció szerint tíz EGF domént tartalmaz, ám a NimC1 fehérjében található EGF domének a többi ismert EGF doménhez képest konzerváltabbak, szigorúbb konszenzusszekvenciával írhatóak le, így ezt a domént elneveztük NIM doméneknek. A NIM domén, (konszenzusszekvenciája: CxPx<sup>n</sup>CxxxCxNGxCxxPxxCx<sup>n</sup>CxxGY) és az EMI domén feltételezhetően két EGF domén átrendeződésével jött létre (Callebaut és mtsai., 2003; Somogyi és mtsai., 2008).



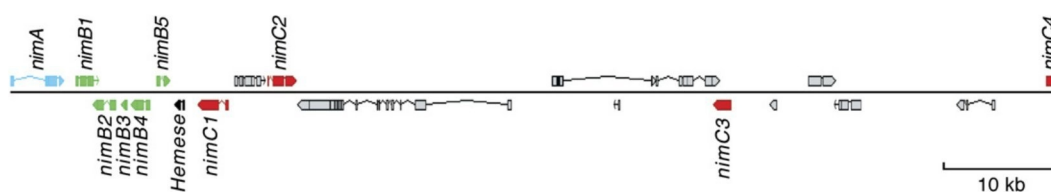
## 2. ábra: A *Drosophila melanogaster* genomban kódolt NIM domént tartalmazó fehérjék

A Nimród fehérjék mindegyike rendelkezik szignál peptiddel, legalább egy NIM doménnel és egy CCXGY szekvenciával. A NimC fehérjék 2-16 NIM doménjük mellett transzmembrán doménnel rendelkeznek, kivéve a NimC3 fehérjét, amely nem rendelkezik transzmembrán doménnel, ám a génklaszteren belüli elfoglalt helye és szekvenciájának a a NimC fehérjékhez mutatott hasonlósága alapján a NimC fehérjék közé soroljuk. A NimB fehérjék 1-9 NIM doménnel rendelkeznek, ám nem tartalmaznak transzmembrán domént, így valószínűsíthetően szekretáltak. A NimA típusú Draper és a NimC típusú Eater fehérjéket kódoló gének a klasztertől távol találhatóak a genomban.

A *Drosophila melanogaster* genomja számos NIM domént tartalmazó receptormolekulát kódol (2. ábra). A *nimC1* gén közvetlen genomi környezetében kilenc NIM domént hordozó fehérjét kódoló gén található, amelyek a munkacsoportunkban azonosított Nimród fehérje- és géncsaládot alkotják, melyek mindegyike tartalmaz egy rövid CCxGY motívumot, valamint egy szignál peptidet. A *nimród* géncsalád tagjai az általuk kódolt fehérjék doménszerkezeti jellegzetességei alapján három csoportra oszthatóak. A NimA fehérje a Draper fehérjéhez hasonlóan egyetlen NIM doménnel és több EGF doménnel rendelkezik, valamint transzmembrán domént is hordozó sejt felszíni molekula. Az öt NimB típusú fehérje egy-nyolc NIM doménnel rendelkezik és nem tartalmaz transzmembrán domént, így ezek valószínűleg szekretált fehérjék. A négy NimC típusú fehérje kettő-tizenhat NIM domént tartalmaz, valamint közülük három transzmembrán doménnel is rendelkezik. A NimC3 fehérje nem rendelkezik transzmembrán doménnel, ám a génjének a klaszteren belül elfoglalt helye és a többi NimC fehérjéhez való hasonlósága alapján a NimC típusba soroltuk (2. ábra).

A *nimród* géncsalád genomi környezetén kívül található további két NIM domént tartalmazó fehérjét kódoló gén, a *draper* és az *eater*. A Draper fehérje egyetlen NIM domént tartalmaz és tizenöt EGF domént, bár megtalálható benne a *nimród* géncsaládra jellemző szignál peptid, a CCxGY motívum és transzmembrán domén, így doménszerkezete alapján a NimA típusú fehérjék közé tartozik (2. ábra), de mivel a fehérjét kódoló gén nem a *nimród* génklaszter területén található a genomban, így nem soroljuk a Nimród fehérje- és géncsaládba.

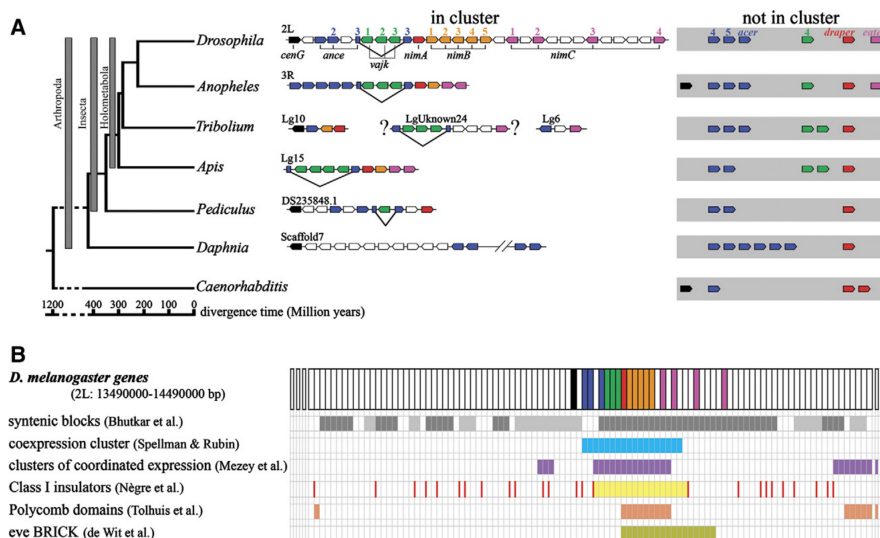
Az Eater fehérje huszonhat NIM domént hordoz, emellett rendelkezik szignál peptiddel, CCxGY motívummal és transzmembrán doménnel, doménszerkezete a NimC fehérjékéhez hasonló (2. ábra), ám mivel az *eater* gén nem a *nimród* génklaszterben található, nem soroljuk a Nimród fehérje- és géncsaládba.



### 3. ábra: A *nimród* géncsalád szerkezete

A *nimA* (kék), *nimB1-5* (zöld), *nimC1-4* (piros) gének a *Drosophila melanogaster* második kromoszómáján helyezkednek el egy 88 kilobázispárnyi genomi szakaszon belül. Ugyanerre a genomi szakaszra térképeződik a korábban általunk azonosított *Hemese* transzmembrán fehérjét kódoló gén is (Kurucz és mtsai., 2003). Az egyes *nimC* gének között egyéb, NIM domént nem hordozó fehérjéket kódoló gének is megtalálhatóak (szürke).

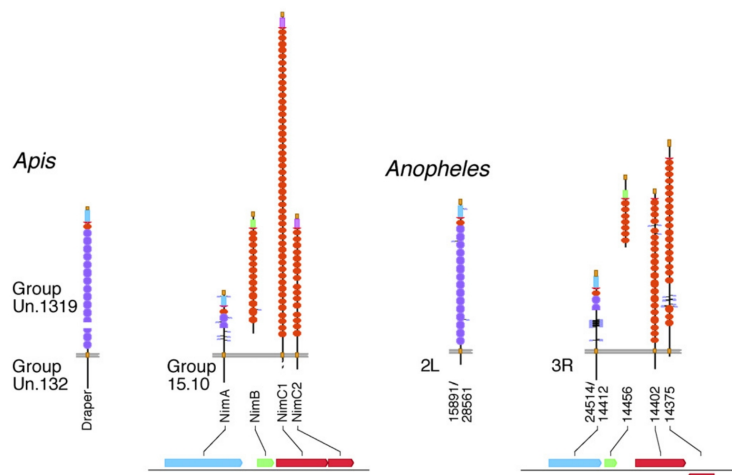
A Nimród fehérje- és géncsalád minden jel szerint önálló egységet alkot: A Nimród fehérjéket kódoló gének egymás közvetlen genomi környezetében találhatóak a *D. melanogaster* második kromoszómáján (3. ábra). Ez a genomi régió tizenkét *Drosophila* faj genomjának összehasonlító elemzése alapján az egyik legnagyobb szintenikus régiót alkotja (Bhuktar és mtsai., 2008), egyes elemzések alapján a *nimród* gének kifejeződése azonos mértékben változik különböző stresszhatásokra és immunindukció hatására, ez azt valószínűsíti, hogy közös szabályozás alatt állhatnak. Számos ízeltlábú genomban megtalálható a *nimród* génklaszter (Somogyi és mtsai., 2010). Az *Anopheles gambiae* maláriaszúnyogban, *Tribolium castaneum* lisztbogárban és az *Apis mellifera* mézelő méhben is egymás közvetlen genomi környezetében találhatóak a NimA, NimB és NimC gének (4. ábra).



#### 4. ábra: A nimród gén család erősen konzervált a teljes átalakulással fejlődő rovarokban

Bár a teljes átalakulással fejlődő rovarok genomjában a génklaszter tagjainak a száma különböző, a nimród génklaszter felépítése azonos: *ance* gének, az egyik *ance* gén intronjában található *vnk* gének, majd a *nimA*, a *nimB* gének és végül a *nimC* gének alkotják. Bár a gének száma az ecetmuslicában (*D. melanogaster*), maláriaszúnyogban (*A. gambiae*) és a mézelő méhben (*A. mellifera*) különböző, ezekben a fajokban az óriási evolúciós távolság ellenére a gének sorrendje erősen konzervált, ami arra utal, hogy valószínűleg szelekciós nyomás hat a klaszter felbomlása ellen (A). A nimród gén család szintenikus régiót alkot és arra vonatkozóan is rendelkezésünkre állnak adatok, hogy az itt található gének közös szabályozás alatt állnak (B) (Somogyi és mtsai., 2010).

A nimród génklaszter szerveződése az ecetmuslicáéhoz hasonló az *Apis mellifera* mézelő méhben és az *Anopheles gambiae* maláriaszúnyogban is. A mézelő méh és a maláriaszúnyog genomjában egyaránt egyetlen *NimA*, egyetlen *NimB* és két *NimC* típusú fehérjét kódoló gén alkotja a nimród klasztert. A klaszteren kívül található egy-egy Draper homológot kódoló gén, ám a nimród klaszteren kívül nem található *NimC* típusú fehérjét kódoló gén (5. ábra).



### 5. ábra: A nimród génklaszter a mézelő méh és a maláriaszúnyog genomjában

Az *Apis mellifera* mézelő méh és a *Anopheles gambiae* maláriaszúnyog nimród génklasztere egyaránt négy nimród gént tartalmaz, egyetlen NimA, egyetlen NimB valamint két NimC típusú fehérjét kódoló gén található egymás közvetlen genomi környezetében. Mindkét genomban egyetlen Draperhez hasonló molekulát kódoló gén található a klaszteren kívül.

A NimB és NimC típusú fehérjéknek nem ismertek gerinces homológjai, ezek a fehérjék valószínűleg a teljes átalakulással fejlődő rovarok közös ősében jelenhettek meg, ám több más gerinces fehérje is a NimA és a Draper fehérjékkel egyező doménszerkezetet mutat. Ilyen az egér Jedi/PEAR1 fehérje és ortológja, az emberi MEGF10 fehérje, melyek N-terminális végükön szignál peptiddel rendelkeznek, egy-egy EMI domént és egy-egy NIM domént tartalmaznak, valamint CCXGY motívummal rendelkeznek. Az egyetlen NIM doménjük mellett számos EGF domént is hordoznak. Ezek a fehérjék valószínűleg a fagocitózis folyamatában játszanak szerepet, hiszen az egér Jedi/PEAR-1 vagy az emberi MEGF10 fehérjét HEK 293 sejtvonalon kifejeztetve a sejtek a kontrollhoz képest több apoptotikus idegsejttörmelékkel kötnek meg a felszínükön, a *jedi* gén RNS inhibícióval történő csendesítése csökkenti a fagocitózis hatékonyságát (Wu és mtsai., 2009), valamint az emberi MEGF10 fehérje HeLa sejtekben kifejeztetve megnöveli a sejtek apoptotikus sejt fagocitáló képességét. Az emberi MEGF10 fehérje a GULP fehérjével alkot heterodimert, ahogy a MEGF10 *C. elegans* ortológja, a CED-1 a GULP ortológjával, a CED-6-tal képez komplexet. Az emberi MEGF10 fehérje képes menteni a *C. elegans* CED-1 fehérje hiányát, így egyértelműen annak ortológjaként jellemezhető (Hamon és mtsai., 2006).

## 2. Célkitűzések

A P1 antigén tömegspektrometriai elemzésének eredményeként kapott peptid egy transzmembrán fehérjét kódoló gént azonosított, amelyet *nimC1* génnek neveztünk el. Funkcióvesztéses és funkcionyeréses vizsgálatokkal kívánjuk bizonyítani, hogy az ellenanyag által felismert P1 antigént valóban a *nimC1* gén kódolja.

Az *in silico* módszerrel azonosított *nimród* génklasztert alkotó *nimród* gének szerepének vizsgálata során meg kívánjuk határozni a *nimród* gének transzkripciós aktivitását. Ezzel kizárhatjuk a további vizsgálatokból azokat az esetlegesen a génklaszterben található pszeudogéneket, amelyekről nem képződik messenger RNS.

Azonosítani kívánjuk a NimC1 fehérje funkcióját. Mivel a NimC1 doménszerkezete hasonló az Eater mintázatfelismerő receptoréhoz, ezért elképzelhető, hogy a NimC1 molekula mintázatfelismerő receptorként működve a mikrobák felismerésében játszik szerepet. Baktériumkötési kísérletekkel kívánjuk megmérni, hogy a NimC1 képes-e a különböző baktérium törzsek sejtjeivel komplexet képezni.

A *nimród* génklasztert alkotó további *nimród* gének immunválaszban betöltött szerepének meghatározásához eukarióta rendszerben rekombináns Nimród fehérjéket állítunk elő és vizsgáljuk azok baktériumkötési kapacitását.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1 Anyagok

**4X Mintapuffer:** 2,6 ml desztillált vízhez adtunk 1 ml 0,5 M TRIS-t (pH=6,8); 2 ml glicerint (87%), 1,6 ml 10 % SDS-t és 1 szemcse brómfenolkéket, majd az oldatot 8 ml-re egészítettük ki desztillált vízzel.

**Alkalikus lízis I. oldat:** 50 mM glükóz; 25 mM Tris-Cl (pH=8.0); 10 mM EDTA (pH=8.0).

**Alkalikus lízis II. oldat:** Minden esetben frissen készítettük. 0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS.

**Alkalikus lízis III. oldat:** 60 ml 5 M Kálium-acetátot és 11,89 ml 96%-os ecetsavat adtunk 28,14 ml desztillált vízhez.

**Ampicillin felhasználása:** 100 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk a por alakú ampicillinből, a, 70%-os etanolban oldva. Ebből a törzsoldatból 1 µl-t használtunk a táptalaj minden egyes milliliteréhez.

**DEPC kezelt H<sub>2</sub>O:** 0,05% dietil-pirokarbonáttal egy éjszakán át kezelt, majd autoklávozott desztillált víz.

**Futtatópuffer:** 0,25 M TRIS, 1,94 M Glicin, 1% SDS.

**Gentamicin felhasználása:** 10 mg/ml törzsoldatot készítettünk a por alakú gentamicinből, desztillált vízben oldva, majd szűréssel csíramentesítettük. A törzsoldatból 140 µl-t használtunk 200 ml LB táptalajhoz.

**Hemocita lízispuffer:** 50 mM TRIS (pH= 7.0), 150 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 0,2% nátrium deoxikolat, 1 mM PMSF és Complete protease inhibitor cocktail (Roche).

**IPTG felhasználása:** 100 mM-os törzsoldatot készítettünk a por alakú IPTG-ből (Fermentas). Egy agarlemezre 40 µl 100 mM-os IPTG oldatot szélesztettünk.

**Kanamycin felhasználása:** 75 mg/ml törzsoldatot készítettünk a por alakú kanamicinből, desztillált vízben oldva, majd szűréssel csíramentesítettük. Ebből a törzsoldatból 33 µl-t használtunk 50 ml LB táptalajhoz.

**LB táptalaj:** 10 g triptont, 5 g élesztőkivonatot, 5g NaCl-t adtunk 1 liter desztillált vízhez, majd az oldat pH-ját 7,0-7,5-re állítottuk be NaOH-val, és autoklávoztuk. Szilárd LB táptalajhoz literenként 20 g Bacto-agart adtunk.

**Lipopoliszaccharid (LPS):** A K12 E. coli törzsből származó lipopoliszaccharid (Invivogen #tlrl-peklps).



**Loading puffer:** 690 µl 87%-os glicerint és 120 µl 0,5 M EDTA-t adtunk 189 µl desztillált vízhez. Az oldathoz brómfenolkék törzsoldatot adtunk, amíg halvány kékeslila színű nem lett. Felhasználáskor 5 µl puffert adtunk 25 µl DNS oldathoz.

**Peptidoglikán (PG):** A K12 *E. coli* törzsből származó peptidoglikán (Invivogen, #tlrl-kipgn).

**Sf9 lízispuffer:** 150 mM NaCl, 40 mM TRIS pH=7,5, 10% glicerint, 0,1% NP40, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF és PIC.

**SOB táptalaj:** 10g triptont, 2,5 g élesztőkivonatot, 0,2922 g NaCl-t, 0,0932 g KCl-t, 500 ml-re kiegészítettük desztillált vízzel, majd autoklávoztuk. Felhasználás előtt hozzáadtunk: 5 ml 1M-os sterilre szűrt glükóz oldatot, 5 ml 1M-os sterilre szűrt MgCl<sub>2</sub> oldatot, 5 ml 1M-os sterilre szűrt MgSO<sub>4</sub> oldatot.

**TB puffer:** 10 mM HEPES-t, 15 mM CaCl<sub>2</sub>-t, 250 mM KCl-t egészítettünk ki 500 ml-re. A kész oldatot pH=6.7-re állítottuk be KOH-dal, majd autoklávoztuk. Felhasználás előtt minden 500 ml-éhez 11 ml 2,5M-os sterilre szűrt MnCl<sub>2</sub> oldatot adtunk.

**Tetraciklin felhasználása:** 10 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk a por alakú tetraciklinből, desztillált vízben oldva, majd szűréssel csíramentesítettük. Ebből a törzsoldatból 150 µl-t használtunk 100 ml LB táptalajhoz.

**TNM-FH insect medium:** (Sigma T1032) Felhasználás előtt minden literét kiegészítettük 0,1 g Streptomocinnal, 0,065 g Penicillinnel valamint 10% marha szérummal és 5 mM glutaminnal.

**"Ultra pure" lipopoliszaccharid (LPS):** A K12 *E. coli* törzsből származó lipopoliszaccharid (Invivogen, # tlrl-pektps).

**X-Gal felhasználása:** 25 mg/ml koncentrációjú X-Gal (Fermentas) oldatot készítettünk dimetil formamidban feloldva a por alakú X-Galt. Ebből az oldatból 40 µl-t szélesztettünk egy 10 cm átmérőjű agarlemezre.

### ***Drosophila melanogaster* törzsek**

**Oregon-R:** Vad típusú törzs.

***l(3)mbn-1* (*lethal (3) malignant blood neoplasm*):** EMS indukált recesszív letális mutáció, a homozigóták a 3. lárvális stádiumban vagy a bábozódáskor pusztulnak el. Az *l(3)mbn-1* gén egy tumor szuppresszor fehérjét kódol, a homozigóta mutáns egyedeknek a vad típusúnál százötvenszer több vérsejtje van (Gateff, 1977). A lárva hemocitái melanizált tumorokat fejlesztenek. A kísérletekhez 3. stádiumú lárvákat használtunk. A törzset TM6 balanszer kromoszómával tartottuk

fenn, a homozigóták az ezen található *Tubby* (Tb) marker alapján különböztethetők meg a heterozigóta lárváktól (Konrad és mtsai., 1994).

***Hml-Gal4.Δ, UAS-2XEGFP; I(3)mbn-1***: Hemocita túltermelő törzs, amelyben ellenanyagainkkal nem mutatható ki a NimC1 fehérje. A törzs egy, a transzgénektől független háttérmutációt tartalmaz a transzgéneket is hordozó második kromoszómáján. A spontán létrejött, vélhetőleg egy mozgékony genetikai elem helyváltoztatásakor keletkezett deléció a *nimC1* gén második exonjának egy szakaszát érinti és leolvasási keret eltolódást okoz. A mutáns génről egy, a vad típusúnál rövidebb RNS molekula íródik át. A második kromoszómán hordozott *hemolectin* meghajtóelem a hemocitákban fejezi ki a GFP fehérjét, így azok zöld fluoreszcenciájuk alapján azonosíthatóak áramlási citometriás mérésekben (Goto és mtsai., 2003).

### **Felhasznált sejtvonalak**

**Schneider-2**: A sejtvonalat Oregon-R, vad típusú *Drosophila melanogaster* törzsből származó embriók szöveteiből alapították. Sejtjei szilárd felülethez tapadnak és egyetlen sejt vastagságú réteget hoznak létre, ám könnyedén lemoshatóak, tripszinkezelés nélkül is. A sejtvonat sejtjeit embrionális makrofág jellegűként írták le, a sejtek nagy mennyiségben fagocitálnak mikrobákat, ezért a fagocitózis vizsgálatában elterjedt modellrendszer a Schneider 2 sejteken végzett *in vitro* fagocitózis vizsgálata. A sejtvonat lényeges tulajdonsága, hogy ellenanyagainkkal nem mutatható ki a NimC1 fehérje kifejeződése a sejtek felszínén.

**Sf9**: A sejtvonat *Spodoptera frugiperda* molylepke petefészkeiből származik. A sejtek műanyag Petri-csészében szilárd felülethez tapadnak, ám tripszinkezelés nélkül is lemoshatóak, de rázatott kultúrában szuszpenzióként is fenntarthatóak. Az Sf9 sejtvonat érzékeny az *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis vírus fertőzésére, ezért alkalmas a baculovírus alapú fehérjetermelésre.

### **Baktériumtörzsek**

**OmniMAX2 T1 törzs**: Invitrogen C8540-03

F' {*proAB+* *lacI<sup>q</sup>* *lacZΔM15* *Tn10(TetR)*  $\Delta$ (*ccdAB*)} *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  
 $\phi$ 80(*lacZ*) $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1* *recA1* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* *tonA* *pand*

**DH10Bac**: Invitrogen 10359-016

F<sup>-</sup> *mcr A*  $\Delta$ (*mrr -hsd RMS-mcr BC*)  $\Phi$  80*lac ZΔ M15 Δ lacX74 rec A1 end A1 ara D139 Δ  
(*ara , leu* )7697 *gal U gal K λ- rps L nup G/bMON14272/pMON7124**

**WaaC *E. coli* törzs:** CGSC#11805; JW3596-1 (Baba és mtsai., 2006)

**LacY *E. coli* törzs:** CGSC#11893; JW0334-1 (Baba és mtsai., 2006)

***Escherichia coli*:** SzMC 0582

***Serratia marcescens*:** SzMC 0567

***Xanthomonas campestris*:** SzMC 6181

***Staphylococcus epidermidis*:** SzMC 14531

***Bacillus subtilis*:** SzMC 0209

***Bacillus cereus var. mycoides*:** SZMC 0042

***Micrococcus luteus*:** SzMC 0264

## 3.2 Módszerek

**Plazmid DNS izolálása alkalikus lízissel:** Egy egyedi baktériumtelepet oltottunk le 2 ml antibiotikummal kiegészített LB táptalajba. A baktériumokat 37 °C-on rázatva egy éjszakán át növesztettük. 1,5 ml sejtszuszpenziót centrifugáltunk (13.000 rpm, 1 perc, 4 °C), majd eltávolítottuk a felülúszót. A pellethez 100 µl jéghideg I. oldatot adtunk, majd felszuszpendálásig vortexeltük. Hozzáadtunk 200 µl frissen készített II. oldatot, majd óvatosan összekevertük. Hozzáadtunk 150 µl jéghideg III. oldatot, majd óvatosan összekevertük. Öt percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd centrifugáltuk (13.000 rpm, 1 perc, 4 °C). A felülúszót tiszta Eppendorf-csőbe helyeztük, majd 1 ml etanolt (96%) adtunk hozzá. Vortexeltük és negyven percen át -20 °C-on inkubáltuk, majd centrifugáltuk (13.000 rpm, 20 perc, 4 °C). Eltávolítottuk a felülúszót, majd a DNS pelletet 200 µl etanollal mostuk (70%), centrifugáltuk (13.000 rpm, 5 perc, 4 °C), majd eltávolítottuk a felülúszót. Az üledéket szobahőmérsékleten szárítottuk. A DNS pelletet 30-70 µl TE pufferben oldottuk fel. 1 µl 10 mg/ml RNáz A oldatot adtunk hozzá.

**DNS emésztése restrikciós endonukleáz enzimmel:** 2 µl alkalikus lízissel izolált plazmid DNS oldathoz hozzámértünk 2,5 µl, az emésztésre használt enzimnek megfelelő 10X puffert (Fermentas), 20,3 µl desztillált vizet, valamint 0,2 µl restrikciós endonukleázt (10 U/µl Fermentas). Az oldatot egy órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá az emésztés termékét.

**DNS preparatív emésztése restrikciós endonukleáz enzimmel:** 30 µl alkalikus lízissel izolált plazmid DNS oldathoz hozzámértünk 10 µl 10X puffert (Fermentas), 56 µl desztillált vizet, valamint 4 µl restrikciós endonukleázt (10U/ µl Fermentas). Az oldatot 2,5 órán át 37 °C-on inkubáltuk.

**DNS ligálás:** A ligáz reakciót 20 µl végtérfogatban végeztük, a plazmid és az inszert DNS mennyiségét minden egyes reakció során egyedileg határoztuk meg, az oldatok DNS tartalma alapján, amelyet agaróz gélelektroforézissel határoztunk meg. Példaként 4 µl plazmid DNS oldatot és 3 µl inszert DNS oldatot használó reakciót írunk le: 4 µl plazmid DNS oldat; 3 µl inszert DNS oldat; 2 µl ligáz puffer (10X Fermentas); 1 µl T4 DNS ligáz enzim (1 U/ µl, Fermentas); 10 µl desztillált víz. A reakcióelegyet két órán keresztül 18 °C-on inkubáltuk, majd egy aliquotnyi (100 µl) kompetens sejtet transzformáltunk vele.

Ragadós végekkel rendelkező inszertek ligálásakor egy kontrollreakciót is végeztünk, amelyben az inszertet kivéve minden szükséges összetevő megtalálható volt. Csak azoknak a ligátumoknak a telepeiből dolgoztunk tovább, amelyek az inszert nélküli kontrollreakcióval transzformált kompetens sejteknél legalább kétszer több telepet eredményeztek.

**Plazmid DNS izolálása oldatból:** A plazmid DNS oldatból EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit-tel (Bio Basic inc. BS353) izoláltuk a plazmid DNS-t, követve a gyártó által adott receptet. Az oszlopról 30 µl Eluciós Pufferrel (10 mM TRIS-HCl pH=8,5) eluáltuk a plazmid DNS-t.

**Plazmid DNS izolálása gélből:** A visszaizolálni tervezett DNS-t SybrSafe festékkel kiegészített agaróz gélen (1:10000 hígításban használtuk) választottuk el. Az agaróz gélben a SybrSafe festéket gerjesztő 470 nm hullámhosszú kék fénnel tettük láthatóvá a DNS-t. Pengével kimetsztük a kívánt sávot, a kimetszett géldarabból EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit-tel izoláltuk a DNS-t, követve a gyártó receptjét. Az oszlopról 30 µl Eluciós Pufferrel (10 mM TRIS-HCl pH=8,5) eluáltuk a DNS-t.

**Kompetens sejt transzformálása:** Egy aliquotnyi (100 µl) kompetens sejtet a -80 °C hőmérsékletű hűtőből kiemelve azonnal jégbe helyeztünk, ami húsz perc alatt lassan felolvadt. Megfelelő mennyiségű plazmid DNS-t adtunk hozzá, alkalikus lízissel izolált cirkuláris plazmid DNS-ből 0,1-1 µl-t, ligált plazmid DNS-ből a teljes 20 µl-nyi ligátumot, majd óvatosan felkevertük. Harminc percen át jégen inkubáltuk, majd 45 másodpercre 42 °C vízfürdőbe helyeztük. Három percen át jégen inkubáltuk, majd 900 µl steril folyékony LB táptalajt adtunk hozzá. 37 °C-on inkubáltuk negyvenöt percen át, majd a sejtszuszpenzióból 100 µl-t agarlemezre szélesztettünk. A maradék 900 µl-t centrifugáltuk (13.000 rpm, 1 per, szobahőmérséklet), eltávolítottuk a felülúszót, majd 200 µl LB táptalajban fölvéve a baktériumüledéket, egy agarlemezre szélesztettük. A két agarlemezt egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk.

**DH10Bac kompetens sejt transzformálása:** Egy aliquotnyi (100 µl) kompetens sejtet húsz perc alatt lassan jégen kiolvasztottunk. Minden egyes aliquothoz 30 µl alkalikus lízissel izolált DNS oldatot adtunk, majd harminc percen át jégen inkubáltuk, 45 másodpercre 42 °C vízfürdőbe helyeztük és két percen át jégen inkubáltuk. Hozzáadtunk 900 µl steril LB táptalajt, majd négy órán át 37 °C-on rázattuk. A baktérium szuszpenziót kanamicinnel, tetraciklinnel, gentamicinnel, IPTG-vel, X-Gal-lal kiegészített LB agarlemezre szélesztettük és 48 órán át 37 °C-on inkubáltuk.

**Kompetens sejtek készítése:** Egy egyedi baktériumtelepből indultunk ki, ezt 5 ml, a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB táptalajba oltottuk le. A kultúrát egy éjszakán át rázatva inkubáltuk 37 °C-on. Másnap a kultúrát kettéosztottuk és 250-250 ml SOB táptalajhoz adtuk, majd 18 °C-on 150 rpm-mel rázatva inkubáltuk a kultúrákat, amíg el nem érték a 0,6-0,8-as optikai denzitást, 600 nanométer hullámhosszúságú fényben mérve. A sejtsuszpenziókat steril centrifugacsövekbe töltöttük, majd tíz percen át jégen inkubáltuk. A kultúrákat centrifugáltuk (5000 rpm, 10 perc, 4 °C), eltávolítottuk a felülúszót, majd a baktériumpelleteket 80 ml jéghideg TB pufferben szuszpendáltuk fel. A szuszpenziót tíz percen át jégen inkubáltuk, majd centrifugáltuk (4000 rpm, 10 perc 4 °C). Eltávolítottuk a felülúszót, majd a sejt-pelleteket 20 ml jéghideg TB pufferben szuszpendáltuk el. Lassan, folyamatos keverés mellett hozzáadtunk 7%-nyi végkoncentrációban DMSO-t. A sejtsuszpenziókat tíz percen át jégen inkubáltuk, majd minden Eppendorf-csőbe 100 µl-t mértünk ki belőlük, amelyeket azonnal folyékony nitrogénbe ejtve fagyasztottunk, majd -80 °C-on tároltunk.

**Élő hemociták áramlási citometriás elemzése:** Egy 96 lyukú lemez egy lyukába harmadik stádiumú lárvákból izolált  $2 \times 10^5$  hemocitát helyeztünk, 20 µl tíz százaléknyi marha szérummal kiegészített Schneider táptalajban. Az elsődleges ellenanyagból 50 µl-t mértünk egy mintához majd 45 percen át inkubáltuk jégen. A sejteket háromszor mostuk jéghideg Schneider táptalajban, hozzáadtuk a másodlagos ellenanyagot, 1:100 hígításban FITC jelölt anti-egér immunglobulint (Sigma) vagy 1:1000 hígításban Alexa Fluor 633 jelölt anti-egér immunglobulint (Invitrogen), majd 45 percen át jégen inkubáltuk. A sejteket háromszor mostuk jéghideg Schneider táptalajban, majd a fluoreszcencia intenzitásukat egy FACSCalibur áramlási citométerrel mértük meg.

**Indirekt immunfluoreszcencia:** Harmadik stádiumú lárvákat véreztettünk ki PTU-val kiegészített *Drosophila* Ringer oldatba. A hemocitákat 45 percen át inkubáltuk szobahőn, nedveskamrában, hogy a sejtek kitapadjanak a tárgylemezhez. A kitapadt sejteket 2%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk 12 percen át, majd háromszor mostuk PBS-ben. A mintát 0,1% BSA-t tartalmazó PBS-ben telítettük, 15 percen át. Az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át

inkubáltuk a mintát nedveskamrában, majd háromszor mostuk PBS-ben. Másodlagos ellenanyagként 45 percen át inkubáltuk 0,1% BSA-PBS oldatban 1:300 hígított fluoreszcensen jelölt anti-egér ellenanyagot, az oldatot kiegészítve 1:200 hígításban DAPI DNS festékkel. A tárgylemezeket háromszor mostuk PBS-ben, majd beágyazó médiummal fedtük.

**In vivo fagocitózis:** Egy 96 lyukú lemez egy lyukába harmadik stádiumú lárvákból hemocitákat izoláltunk tízsázaléknyi marha szérummal és PTU-val kiegészített Schneider táptalajba. Tíz percen át szobahőn inkubáltuk a sejteket, majd  $2 \times 10^6$  hővel előlt, FITC-cel fluoreszcensen jelölt baktériumsejtet adtunk hozzá. Húszpercnyi szobahőn inkubálás után a be nem kebelezett baktériumok fluoreszcenciájának kioltására tripánkéket adtunk a sejtszuspenzióhoz, 0,2% végkoncentrációban, majd azonnal megmértük a sejtek fluoreszcencia intenzitását egy FACSCalibur áramlási citométerrel.

**RNS inhibíciós konstrukt készítése:** A *nimCI* gén RNS inhibíciós csendesítéséhez egy dsRNS konstruktot készítettünk (AB186054), amelyben a *nimCI* 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  $w^{1118}$  törzs genomjába. A kiválasztott szakasz, amelyből a kettőszálú RNS kialakul, nem tartalmaz tizenhat bázispárnál hosszabb egyezést egyetlen más *D. melanogaster* génnel sem.

**A NimC1 fehérje kifejeztetése Schneider-2 sejtekben:** Az LP05465 azonosítószámú *nimCI* cDNS klónból indultunk ki, az EcoRI-XhoI emésztéssel kapott inszertet klónoztuk a pMT/V5-HISA vektorba. A vektor ellenőrzésekor azt tapasztaltuk, hogy a cDNS klón két bázispárnyi deléciót tartalmaz a genomi szekvenciához képest az 1564. bázispárnál, aminek hatására a cDNS-ről trunkált NimC1 fehérje íródik át. Hogy ezt a hibát kijavítsuk, a *nimCI* génben található BamHI hasítóhelytől downstream irányban 1,8 kilobázis méretű szakaszt amplifikáltunk polimeráz láncreakcióval genomi DNS templátról, majd ezt a fragmentet klónoztuk a pMT/V5-HIS vektorba. A Schneider-2 sejteket Effectene reagenssel (Quiagen) transzfektáltuk, majd a rekombináns NimC1 kifejeződését réz-szulfát hozzáadásával indukáltuk. A sejteket a réz-szulfát indukció után négy nappal használtuk fel a kísérleteinkhez.

**RNS izolálás:** A Gibco BRL TRIZOL reagensét használtuk RNS izolálásra, pontosan követve a gyártó cég által megadott használati utasítást.  $5-10 \times 10^6$  izolált hemocitához 1 ml TRIZOL reagenst használtunk, majd többszöri pipettázással homogenizáltuk a sejteket. Harmadik stádiumú lárvából 22 egyedet használtunk 1 ml TRIZOL reagenshez. Az egész lárvákat a TRIZOL reagensben

homogenizáltuk, és egy külön tisztítási lépésben centrifugáltuk (12.000 rpm, 10 percig 4 °C), majd a felülúszót használtuk. Öt perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után 0,2 ml kloroformot adtunk hozzá az eredeti TRIZOL reagens minden milliliteréhez. Rövid rázás, és 3 perces szobahőmérsékleten történő inkubálás után centrifugáltuk (12.000 rpm, 15 perc, 4 °C). A vizes fázist Eppendorf-csőbe mérve, az eredeti TRIZOL minden milliliteréhez 0,5 ml izopropil alkoholt adtunk. Tíz perces szobahőmérsékleten történő inkubálás után centrifugáltuk (12.000 rpm, 10 perc, 4 °C). A felülúszót eltávolítottuk az RNS csapadékról. A kapott csapadékot 75%-os etil-alkohollal mostuk, majd centrifugáltuk (7500 rpm, 5 perc, 4 °C) és levegőn szárítottuk, amíg gélállapotúvá nem vált. Az RNS-t DEPC-kezelt desztillált vízben oldottuk.

**Reverz transzkripció:** 5 µg izolált teljes RNS-t tartalmazó oldatból indultunk ki. Az oldathoz 5 µl 0,1 mg/ml koncentrációjú random hexamer primer oldatot mértünk hozzá, majd 10 µl végtérfogatra egészítettük ki DEPC-kezelt desztillált vízzel. A reakcióelegyet 70 °C-on tíz percen át inkubáltuk, majd jégen hűtöttük. Hozzáértünk 10 µl 5X RT puffert (Fermentas), 4 µl 10 mM dNTP keveréket (Fermentas), 20 U RNáz inhibitor (Fermentas), 40 U M-MuLV reverz transzkriptáz enzimet (20 U/µl Fermentas), majd 50 µl végtérfogatra egészítettük ki DEPC kezelt desztillált vízzel. A reakcióelegyet tíz percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd egy órán át 42 °C-on, majd 5 percen át 70 °C-on. A reakció termékét 12,5 µl-nyi aliquotokra osztottuk, majd -20 °C-on tároltuk.

**Polimeráz láncreakció (PCR):** A polimeráz láncreakciókat a MJ Research által gyártott PTC-0200 DNA Engine-en végeztük, olajrétegzés nélkül, a csövek tetejét fűtve. A láncreakció első lépéseként 3 percre 95 °C-ra melegítettük a reakcióelegyet. Maga a láncreakció 3 lépésből állt: 95 °C on 30 másodpercig denaturáltuk a DNS-t (denaturálás), majd 58 °C-on 45 másodpercig engedjük, hogy a primerek megtalálják a komplementer szekvenciákat (annealing), végül 72 °C-on 1 perc 30 másodpercet hagyunk a lánchosszabbítási lépésre (elongáció). Az annealing fázis hőmérsékletét és az elongációs fázis időtartamát az egyes primerpárokhoz igazítottuk.

Egy 25 µl végtérfogatú reakcióhoz 14, 375 µl desztillált vizet, 2,5 µl 10 X PCR puffert (Fermentas), 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>t, 2,5 µl 2mM dNTP keveréket (Fermentas), 1 µl DNS templátot és 0,625 µl Taq polimeráz enzimet (1 U/µl Fermentas), valamint 0,5-0,5 µl 5µmol/l koncentrációjú primert mértünk össze.

**Hemocita lizátum készítése:** A 3. stádiumú lárvák kutikuláját sztereomikroszkóp alatt megsértve, jéghideg 5% marha szérummal kiegészített Schneider-táptalajba csorgattuk

hemolimfájukat. PTU-val előztük meg a vérsejtek melanizálódását, mivel a PTU a fenoloxidáz szubsztrátja, kompetitíven gátolja az enzim működését és ez által a hemolimfa koagulálódását.

Egy mintát  $5 \times 10^6$  hemocitából készítettünk, 400  $\mu$ l hemocita lízispuffer hozzáadásával. A sejteket háromszor szonikáltuk (1 perc), majd minden szonikálás után folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A feltárás után a sejttörmelékét centrifugálással (18.000 x g 10 perc 4 °C) ülepitettük, kísérleteinkben a felülúszót használtuk fel.

**FITC jelölt baktérium készítése:** Tíz milliliternyi baktérium szuszpenzióból ( $OD_{600} = 1,5$ ) centrifugáltunk (4200 x g 20 perc 4 °C), majd háromszor megmostuk PBS-ben és forrásban lévő vízben inaktiváltuk a sejteket (1 óra). A hővel előlt baktériumsejteket 10 ml 0,25 M karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9.0) szuszpendáltuk fel, amelyben ez után cseppenként 100  $\mu$ l DMSO-ban oldott 0,5 mg FITC-et oldottunk fel. A baktérium szuszpenziót egy éjszakán át forgattuk (4 °C), majd nyolcszor mostuk PBS-ben, hosszan vortexelve.

**Baktériumkötési esszé:** Egy Eppendorf-csőben centrifugáltuk (11.200 x g, 4 perc, 4 °C) le a FITC-*E. colit* (10  $\mu$ l) vagy a FITC-*S. epidermidist* (5  $\mu$ l) és 400  $\mu$ l hemocita lizátummal egészítettük ki, majd egy éjszakán át 4 °C-on forgattuk. A rekombináns fehérjét termelő SF9 sejtek lizátumából 800  $\mu$ l-t tettünk egy mintára. A baktériumsejteket centrifugálással ülepitettük (11200 x g 4 perc 4 °C) és háromszor mostuk PBS-ben, minden mosási lépéskor harminc másodpercen át vortexelve. A baktériumpellethez 1 ml elsődleges ellenanyagot adtunk, vagy P1a és P1b monoklonális egér ellenanyagok keverékét (Kurucz és mtsai., 2007a), vagy L1a és L1b egér monoklonális ellenanyagok keverékét (Kurucz és mtsai., 2007a, Honti és mtsai., 2009), vagy anti-FLAG egér monoklonális ellenanyagot (1:1000 hígítottuk KRPMI-ben). Fél percnyi vortexelés után a mintát két órán át forgattuk 4 °C-on, majd háromszor mostuk 5% szérummal kiegészített RPMI táptalajban. A baktériumpellethez másodlagos ellenanyagként 1 ml Alexa Fluor 633 fluorokrómmal jelölt anti-egér IgG-t (Invitrogen) (1:600 hígítottuk KRPMI-ben) adtunk, majd 45 percen át forgattuk 4 °C-on. Miután a baktériumpelletet háromszor mostuk 5% szérummal kiegészített RPMI táptalajban és kétszer PBS-ben áramlási citometriával mértük a baktériumsejtek fluoreszcencia intenzitását. A baktériumsejteket az FL-1 csatornán mért FITC (zöld) fluoreszcenciájuk alapján különítettük el a törmeléktől, és a kapuzott sejtpopuláció Alexa Fluor 633 (távoli vörös) fluoreszcencia intenzitását az FL-4 csatornán mértük egy FACSCalibur áramlási citométerrel.

**Statisztikai elemzés:** 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 szórását is. Az áramlási citometriával mért MFI értékeken Student *t*-tesztet végeztünk, a baktériumkötést úgy határoztuk meg, mint ahol a minta MFI értékei szignifikánsan különböznek a kontroll MFI értékeitől, azaz a Student *t*-teszt eredményeként kapott *p* érték alacsonyabb 0,05-nél.

**Kompetíciós baktériumkötési esszé:** A kompetíciós baktériumkötési kísérletekben a hemocita lizátumhoz először a kompetitort adtuk hozzá, majd két órán át 4 °C-on forgattuk, ez után végeztük el vele a baktériumkötési esszét.

**Baktériumlizátum készítése:** Egy minta 24 ml *E. coli* szuszpenzióból ( $OD_{600} = 1,3$ ) ülepitett sejtekből készült, amelyet 1 ml lízisufferben szuszpendáltunk fel, harminc percen át jégen inkubáltunk, majd ötször szonikáltunk (1 perc) és nitrogénben fagyasztottunk, majd centrifugáltunk ( $18000 \times g$  10 perc 4 °C).

**Baktérium lizátum fehérjementesítése fenolkezeléssel:** 250 µl *E. coli* lizátumhoz 250 µl fenolt adtunk, öt percen át vortexeltük, öt percen át szobahőmérsékleten, majd öt percen át jégen inkubáltuk. Lecentrifugáltuk ( $11200 \times g$  2 perc 4 °C) és a 250 µl vizes fázist friss Eppendorf-csőbe helyeztük. A fenolt újabb 250 µl friss lízisufferrel extraháltuk, majd a második vizes fázist összekevertük az elsővel. Az így kapott 500 µl vizes fázist 500 µl fenollal kétszer extraháltuk. A kapott kétszer 500 µl vizes fázist összeöntöttük és 1 ml fenollal kétszer extraháltuk. A kapott 2 ml vizes fázishoz 9,1 ml 96%-os etanolt és 330 µl nátrium-acetátot adtunk, majd két órán át -20 °C-on inkubáltuk. Az oldatot centrifugáltuk ( $11200 \times g$  10 perc 4 °C) és a felülúszót eltávolítottuk. Az üledéket 1 ml -20 °C-os 96% etanollal mostuk, majd 250 µl lízisufferben oldottuk fel (Módosítva Hirschfeld és mtsai., 2000 alapján).

**Baktériumfehérjék emésztése Proteináz K enzimmel:** 250 µl *E. coli* lizátumhoz 1 mM végkoncentrációban Proteináz K enzimet (20 mg/ml, Fermentas) adtunk, majd három órán át 50 °C-on inkubáltuk. A Proteináz K enzimet 4 mM PMSF hozzáadásával gátoltuk, majd a mintát centrifugáltuk ( $18000 \times g$  10 perc 4 °C). A felülúszót használtuk a kompetíciós baktériumkötési esszében.

**FLAG-taget kódoló plazmid készítése:** A FLAG epitópot és az XbaI és NotI restrikciós endonukleázok hasítóhelyét kódoló génszegmentet két oligonukleotidként szintetizáltattuk meg mint 5'-CAATCTAGAGATTACAAAGACGACGACGACAAATAGTAAGCGGCCGCAAC-3' és a reverz komplement szekvenciája. A DNS szakasz 5' és 3' végét is kiegészítettük három-három véletlenszerűen kiválasztott bázissal, amelyek a restrikciós endonukleáz enzimek szubsztrátkötését segítik, ugyanis számos ilyen enzim alacsony hatékonysággal hasít 5' vagy 3' végi szubsztátot.

Mindkét oligonukleotidból 1 nmol végkoncentrációban adtunk 10 µl desztillált vízhez és tíz percen át 95 °C-on inkubáltuk, egy percen át 70 °C-on, 1 percen át 60 °C-on, egy percen át 50 °C-on, két percen át 40 °C-on inkubáltuk, hogy a két egyesszálú DNS szakasz kettősszálú DNS molekulákat hozzon létre. Az oldathoz 0,6 µl NotI (10 U/µl, Fermentas) és 0,6 µl XbaI (10 U/µl, Fermentas) enzimet, valamint 2 µl BamHI puffert (10X, Fermentas) és 6,8 µl desztillált vizet adtunk, majd 37 °C-on inkubáltuk két órán keresztül. A restriktív endonukleáz enzimeket húsz percen át 80 37 °C-on inkubálással inaktívtuk, majd az inszertet egy NotI-XbaI emésztett pBKSII+ vektorba klónoztuk. A telepekből alkalikus lízis sel izoláltuk a DNS-t, amelyeket ApaI és SacI emésztéssel ellenőriztünk, a várt termékeket (102 bp inszert nélküli vektor, 132 bp a FLAG inszertet hordozó vektor) 2% agaróz gélen futtatva különítettük el egymástól. A kapott klónokat T3 és T7 primerek segítségével szekvenálással ellenőriztük, és egy helyes beépülést hordozó plazmidot kiválasztottunk, amelyet pB-FLAG-nek nevezünk el. Az inszert tervezésekor ügyeltünk arra, hogy a FLAG peptid kódoló szakasz és a két STOP kodon a pBluescriptII plazmid klónozóhelyén található β-galaktózidáz α-fragmensét kódoló géntől különböző leolvasási keretbe kerüljön. A β-galaktózidáz gén leolvasási keretében így nem találhatóak STOP kodonok, a plazmidról működőképes β-galaktózidáz fehérje íródik át, a pB-FLAG alkalmas kék-fehér szelekcióra is.

**A rekombináns fehérjéket kódoló baculovírus előállítás:** A Nimród fehérjéket kódoló inszerteket polimeráz láncreakcióval állítottuk elő. A felhasznált primerek tartalmazzák a SalI és az XbaI restriktív endonukleázok hasítóhelyét, valamint a forward primerek egy START (ATG) kodont is:

NimC1 forward: 5'-CAAGTCGACATGATTTGTAACCGATCGCAGG-3'

NimC1 reverse: 5'-CAATCTAGATACCTCGCTGGTTGATGTCTG-3'

NimA forward: 5'-CAAGTCGACATGATACCATTGGGATCAGGACAAAACAG-3'

NimA reverse: 5'-CAATCTAGAGGCCTCACCTCCAACGAATCC-3'

NimB1 forward: 5'-CAAGTCGACATGACGCTGGTGGCATTTCCTG-3'

NimB1 reverse: 5'-CATTCTAGATAGATATCCTTCGCGGCAGTGAC-3'

NimB2 forward: 5'-CAAGTCGACATGAAGACGGCTGGCATCAAGACAC-3'

NimB2 reverse: 5'-CAATCTAGACAAACCGGAAGCGCACTCACAG-3'

Draper forward: 5'-GTTGTCGACATGTTGCCGGTAATCCTCATAGC-3'

Draper reverse: 5'-CAATCTAGAGTCGCACTGGCACTTCTGG-3'

Atila forward: 5'-CAAGTCGACATGCACAGTGCATCGGCCATCAAG-3'

Atila reverse: 5'-CAATCTAGATGCACTGACCGCCACAAAG-3';

Templátként teljes RNS mintából reverz transzkripcióval előállított cDNS mintát használtunk a NimA inszert előállításához. A többi inszert előállításához a következő cDNS plazmidokat használtunk templátként: LP05465 (NimC1), GH07762 (NimB1), HL01444 (NimB2), RE50156 (Atila), IP15264 (Draper). Mindegyik polimeráz láncreakció termékét Sall és XbaI restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztettük, majd a pB-FLAG vektorba klónoztuk. Az inszertek szekvenciáját T3 és T7 primerekkel végzett szekvenálással ellenőriztük.

A FLAG taggel ellátott rekombináns fehérjéket baculovírus expressziós rendszerben fejeztettük ki (Bac-to-Bac, Invitrogen). Az inszerteket a pB-FLAG vektorból pFastBacDual vektorba klónoztuk Sall és NotI restrikciós endonukleázok felhasználásával. 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 találhatóak, a shuttle vektor is tartalmaz Tn7 szignálszekvenciákat egy *lacZ* génben, a DNH10Bac baktériumsejtek pedig kifejezik a szükséges rekombináns 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 azonosíthatóak. A kapott telepek közül a fehér színűekből hetet kiválasztottunk, amelyeket friss 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, amelyekből 2 ml kanamicinnel, tetraciklinnel és gentamicinnel kiegészített LB táptalajba oltottunk le egy-egy kacsnyit, majd ezeket a kultúrákat egy éjszakán át 37 °C-on rázattuk. A baktériumszuszpenziókból alkalikus lízissel izoláltuk a plazmid DNS-t, majd az inszert beépülését az izolált bacmid DNS-en végzett polimeráz láncreakcióval ellenőriztük pUC/M13 forward (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') és reverse (5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3') primerek segítségével. Az inszertet tartalmazó bacmidot hordozó klónokat 60 ml kanamicinnel, tetraciklinnel és gentamicinnel kiegészített folyékony LB táptalajba oltottuk le, majd OD<sub>600</sub> 1,5-ig növesztettük a baktériumkultúrákat. A bacmid DNS-t Qiagen Plasmid MIDI KIT segítségével izoláltuk, majd TE pufferben oldottuk fel.

**Fertőzőképes baculovírus előállítás:** Az izolált vektor DNS-sel *Spodoptera frugiperda* lepke eredetű sejtvonalat (Sf9) transzfektáltunk. Az Sf9 sejtekben kifejeződnek a bacmidon kódolt gének, így ezek a transzfektált sejtek fertőzőképes baculovírus részecskéket hoznak létre, táptalajukat friss Sf9 sejtekre helyezve a felülúszóban található vírusrészecskék fertőzik a lepke sejtvonalat. Hatlyukú lemezen (Orange scientific) 60-70%-os lefedettségig növesztettük az Sf9 lepke sejtvonalt sejtjeit TNM-FH táptalajban. A sejteket háromszor megmostuk szérumentes TNM-FH táptalajban. 1,5 µg bacmid DNS-t 33 µl végtér fogat szérumentes TNM-FH táptalajban feloldva összekevertük 33 µl végtér fogat szérumentes TNM-FH-ban feloldott 12 µl Cellfectin II reagenssel (Invitrogen), majd tizenöt percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A DNS oldathoz 300 µl szérumentes TNM-FH táptalajhoz kevertük, majd a megmosott Sf9 sejtekre helyeztük és 12 órán át himbálva inkubáltuk szobahőmérsékleten. A sejteket megmostuk szérumentes TNM-FH táptalajban, majd friss táptalajt tettünk a lemezekre és 72 órán át 26 °C-on inkubáltuk. A felülúszó tartalmazta a fertőzőképes baculovírus részecskéket, ez a P1 vírus.

**Sf9 sejtek fertőzése és lízise:** Az Sf9 sejteket 15 cm átmérőjű Petri-csészébe oltottuk, majd 50-70%-os befedettségig növesztettük 25 °C-on. A sejt kultúrát P4-es baculovirussal fertőztük, majd 72 órán át 25 °C-on inkubáltuk. Egy Petri-csésze tartalmát 1800 µl Sf9 lízispufferben szuszpendáltuk fel. A mintát háromszor szonikáltuk és fagyasztottuk folyékony nitrogénben, majd centrifugáltuk (18000 x g 10 perc, 4 °C).

**Western blot:** Megfelelő méretű üveglapok közé öntöttük ki először a 10%-os futtatógélt (4 ml akrilamid oldat; 4,5 ml 1M TRIS (pH=8,8); 1,3 ml desztillált víz; 120 µl 10% SDS ; 40 µl 10% APS; 8 µl TEMED), amelynek tetejére butanolt rétegeztünk, majd negyven percen át szobahőmérsékleten inkubálva megvártuk, amíg az akrilamid térhálósodik. A butanol felitatása után elkészítettük az 5%-os gyűjtógélt (1,31 ml akrilamid; 1 ml 1M TRIS (pH=6,8); 6,8 ml desztillált víz; 80 µl 10% SDS; 40 µl 10% APS; 8 µl TEMED), amelybe fésűt illesztettünk. Az akrilamid térhálósodása után a zsebekbe vittük fel a mintáinkat, majd futtatópufferben addig futtattuk a gélt, amíg a mintapufferben található brómfenolkék frontja egy-két milliméterre meg nem közelítette a gél alsó végét.

A gélben található fehérjéket egy éjszakán át blottoltuk át PVDF membránra, majd a membránt tejporban telítettük. Első ellenanyagként a FLAG epitópot felismerő monoklonális egér ellenanyagot használtuk, második ellenanyagként torma peroxidáz enzimmal konjugált egér immunglobulint felismerő poliklonális kecske ellenanyagot használtunk. A torma peroxidáz enzimet ECL Plus reagenssel mutattuk ki (GE Healthcare-Amersham).

**Primertervezés az RT-PCR reakciókhoz:** A templátként szolgáló genomi DNS szakaszok a két primer kapcsolódási pontja között tartalmazznak legalább egy intront, mivel így az RT-PCR végtermékekben különbséget tehetünk a splicingon átesett messenger RNS reverz transzkripciójából származó cDNSről átírt rövidebb, illetve az esetleges genomi DNS szennyezésből származó hosszabb termék között. A kész primereket BLAST elemzésnek vetettük alá, összehasonlítottuk a primerek bázissorrendjeit az ismert *Drosophila* genom szekvenciákkal, annak érdekében hogy kiszűrjük az esetlegesen egynél több helyre is hibridizálni képes, ezáltal fals pozitív eredményekhez vezető primereket. A primerek olvadáspontjait igyekeztünk viszonylag magasra, 50 °C fölé beállítani, mivel az annealing fázisban használt magas hőmérséklet csökkenti a helytelen primerpárosodással kialakuló komplexek stabilitását.

## 2. táblázat: A használt primerek és szekvenciáik

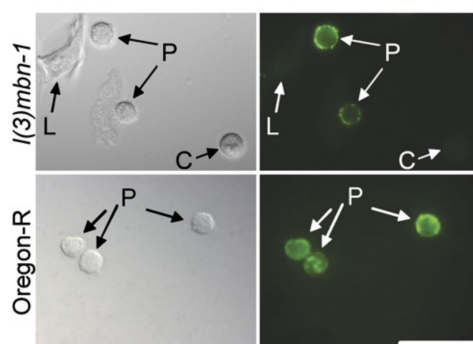
	Annealing hőmérséklet	cDNS termék mérete	Genomi DNS termék mérete	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>RP49</i>	58 °C	316 bp	378 bp	GCATACAGGCCCAAGATCCGT	CAATCTCCTTGCGCTTCTTG
<i>Hemese</i>	56 °C	175 bp	354 bp	TCAAGTGACCGTCGTTTTCC	CCGTTTCACTTGGGGTTGAA
<i>eater</i>	56 °C	431 bp	888 bp	CGGACTCGTATCGGCTCA	CCTGGGTGGTTGGATTCA
<i>nimA</i>	58 °C	572 bp	739 bp	GCAACCGACCAGCAATGAAA	GGCGAAACCACCGAGTAGAG
<i>nimB1</i>	56 °C	1028 bp	1324 bp	GGCGACATAGAGAATACG	GTGTTGAGATGCTGACTGA
<i>nimB2</i>	58 °C	657 bp	735 bp	CTGCTCCGAATACCTGTGTCT	CCTGATGCCGCTCTTGAT
<i>nimB4</i>	58 °C	901 bp	1120 bp	GGTGCTCCTGGTCCTGTT	GGTCGTCGTATTCTTATCGTATC
<i>nimB5</i>	56 °C	778 bp	1050 bp	GCGCATTCGTCTAAGTTT	GCACTGGTTGTTGTCCTT
<i>nimC1</i>	56 °C/58 °C	769 bp	1365 bp	TGGAGTGGTTGGCAGACAAA	ACTGGGTACGCACTTCTTG
<i>nimC2</i>	58 °C	1063 bp	1186 bp	AATGCGAGCCCTTCTGTCCCA	ATCCCCCAATCCAATGCCCA
<i>nimC3</i>	56 °C	573 bp	573 bp	CTGCGGCTGCTGCGTTTAGTG	CCAGCTGCTCGCATCCTTGAATC
<i>nimC4</i>	58 °C	515 bp	515 bp	GGAGACCACCGAGGACAATAC	CCAACGCCAAGGGATGAAC

**A használt programok:** A dolgozat LibreOffice 3.5.7.2-vel készült, az ábrák szerkesztésére a Gimp 2.8 programot használtuk, a rekombináns fehérjéket a DOG 2.0 (Ren és mtsai., 2009) programmal ábráztuk. A DNS szekvenciákat a pDRAW 32 a Serial Cloner 2.6 és a LaserGene DNASTar programmal szerkesztettük.

## 4. Eredmények

### 4.1 A P1 molekula azonosítása

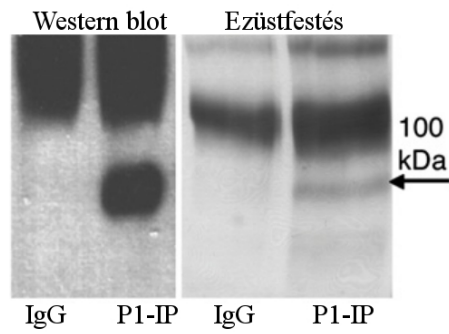
Munkacsoportunkban a *D. melanogaster* hemocitáit felismerő monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő (Kurucz és mtsai., 2007a). A P1a és P1b ellenanyagok western blot analízisben ugyanazon fehérjemolekula két különböző epitópját ismerik fel. A P1 antigén kizárólag a fagocitáló plazmatociták felületén mutatható ki a vad típusú Oregon-R és a hemocita túltermelő *l(3)mbn-1* *Drosophila* törzsekben (Kurucz és mtsai., 2007a) (6. ábra).



**6. ábra: A P1 antigén a plazmatociták sejtmembránjában fejeződik ki**

A P1 fehérjét a vad típusú Oregon-R és az *l(3)mbn-1* hemocita túltermelő mutáns hemocitái is kifejezik. A P1 antigént kizárólag a fagocitózisra képes plazmatociták fejezik ki (P), a nem fagocitáló lamellociták (L) és a kristálysejtek (C) felületén nem mutatható ki. (Kurucz és mtsai., 2007b)

A rendelkezésünkre álló P1a és P1b ellenanyagok keverékével *l(3)mbn-1* hemociták extraktumából immunprecipitálással izoláltuk a 90-100 kDa molekulatömegű P1 antigént, amelyet Western blot elemzéssel azonosítottunk (7. ábra). Az ezüsfestett gélből kivágott mintában MALDI-TOF elemzéssel az SZBK Tömegspektrometriai laboratóriuma egy olyan peptidet (VIPYQHR) azonosított, amely kizárólag a prediktált CG8942 gén termékében található meg, amelyet *nimC1* vagy *nimródC1* génnek neveztünk el, a gén terméke a NimródC1 vagy NimC1 fehérje. (Kurucz és mtsai., 2007b)

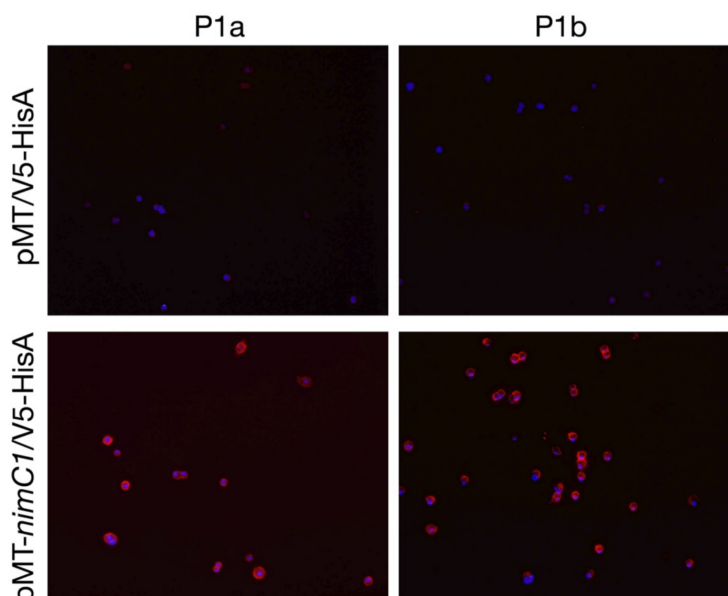


### 7. ábra: A P1 fehérje izolálása

Az *l(3)mbn-1* hemociták lizátumából immunprecipitálással izoláltuk a P1 molekulát, majd az ezüstoffestett gélből kivágott mintában MALDI-TOF elemzést végeztünk. (Kurucz és mtsai., 2007b)

## 4.2 A NimC1 fehérjét kódoló *nimC1* gén azonosítása

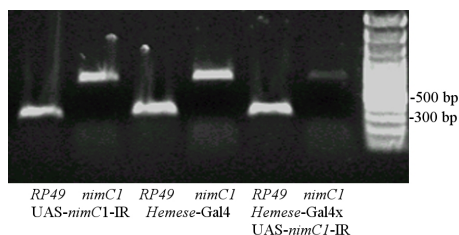
A P1 antigén tömegspektrometriai elemzésének eredményeként azonosítottunk egy peptidet, amely egyetlen prediktált *D. melanogaster* fehérjében található meg. Annak igazolására, hogy az azonosított peptidet tartalmazó fehérje valóban a *nimC1* gén terméke a *nimC1* génterméket rekombináns fehérjeként expresszáltattuk a NimC1 fehérjét ki nem fejező *Drosophila* Schneider-2 sejt vonalban. A *nimC1* gént polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk, majd réz-szulfáttal indukálható promóter mögé klónoztuk a pMT/V5-HIS vektorba. A pMT/V5-HIS-*nimC1* vektorral Schneider-2 sejt vonal sejtjeit transzfektáltuk. Az inszertet nem tartalmazó pMT/V5-HIS vektorral transzfektált Schneider-2 sejtek felszínén ellenanyagainkkal nem mutatható ki a NimC1 fehérje jelenléte, ám a pMT/V5-HIS-*nimC1* vektorral transzfektált sejtek felszínén P1a és P1b ellenanyagaink felismerték a vektorba klónozott *nimC1* génről kifejeződő NimC1 fehérjét (8. ábra).



### **8. ábra: A rekombináns NimC1 fehérje kifejeződése Schneider-2 sejteken**

A pMT/V5-HIS-nimC1 plazmival transzfectált Schneider-2 sejtek felszínén mind a P1a, mind a P1b ellenanyaggal kimutatható a rekombináns NimC1 fehérje, míg az inszertet nem tartalmazó pMT/V5-HIS vektort tartalmazó Schneider-2 sejtek felszínén nem.

A nimC1 gén *in vivo* azonosításához nimC1 funkcióvesztéses mutánst kívántunk előállítani, amelyhez az RNS inhibíció módszerét választottuk. Ehhez egy olyan légytörzset állítottunk elő, amely egy UAS promóterrel kifejezhető konstruktot hordoz a genomjában. A konstrukt a nimC1 gén egy szakaszát tartalmazza fordítottan ismétlődve, így Gal4 forrással meghajtva a beépült transzgenről kettősszálú RNS molekula keletkezik, amely várhatóan RNS inhibícióval csökkenti a nimC1 géntermék mennyiségét. Az UAS-nimC1-IR konstruktot a hemocitákban kifejeződő Hemese-Gal4 konstruktal (Zettervall és mtsai., 2004), mint Gal4 forrással kifejezve csökken a lárvákban szemikvantitatív reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakcióval kimutatható nimC1 RNS mennyisége a szülői törzsekhez, mint kontrollokhhoz viszonyítva (9. ábra).

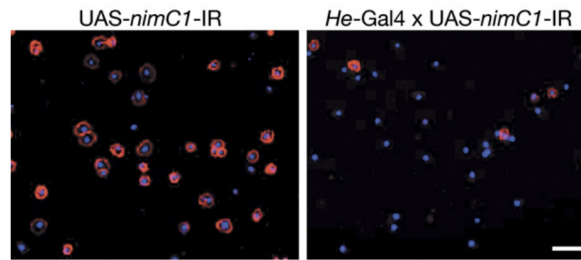


### **9. ábra: A nimC1 RNS relatív mennyiségének változása a nimC1 RNS inhibíció nyomán**

Szemikvantitatív reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakciót végeztünk, a nimC1 géntermék mennyiségének megállapításához. Ahhoz hogy a polimeráz láncreakcióban kapott jel a templáttal arányos mennyiségű legyen, a reakció ciklusszámát huszonötre csökkentettük és a templátot nyolcszorosára hígítottuk. Kontrollként egy minden sejtben kifejeződő, L32 riboszómális fehérjét kódoló rp49 háztartási génre specifikus primerpárt használtunk. Az UAS-nimC1-IR és a Hemese-Gal4 szülői törzsekben az RP49 géntermék mennyisége megegyezik a Hemese-Gal4xUAS-nimC1-IR egyedekben mérttel, ám a nimC1 géntermékből a Hemese-Gal4xUAS-nimC1-IR egyedekben kevesebb található.

Az RNS inhibíció nyomán csökken a hemociták felszínén a NimC1 fehérje mennyisége a szülői törzsekhez, mint kontrollokhhoz képest (10. ábra). E kísérletekkel beláttuk, hogy a P1a és P1b ellenanyagok által felismert P1 antigén a NimC1 fehérje és a NimC1 fehérjét a nimC1 gén kódolja.





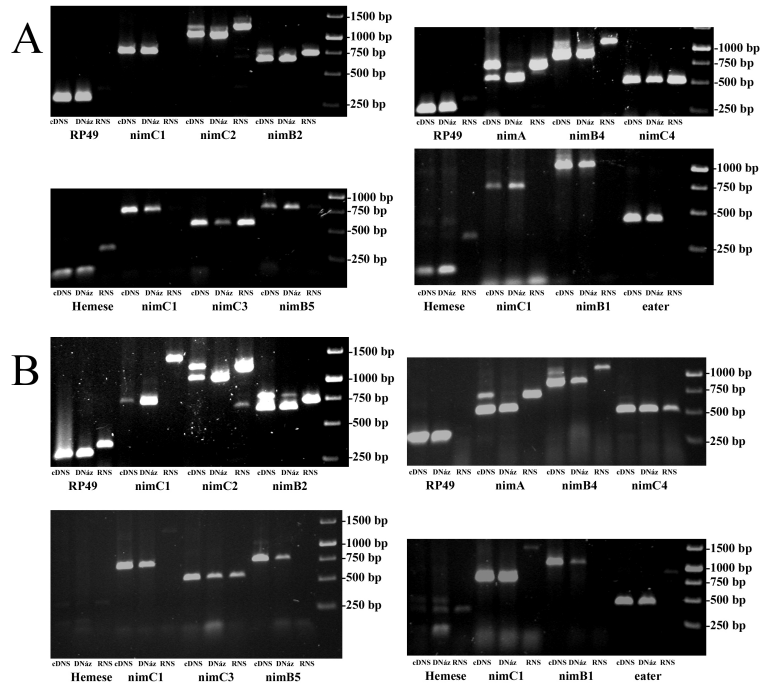
**10. ábra: A NimC1 fehérje mennyisége csökken a hemociták felszínén *nimC1* RNS inhibíció hatására**

Harmadik stádiumú *UAS-nimC1-IR* és *Hemese-Gal4xUAS-nimC1-IR* lárvák hemocitáit izoláltuk, majd indirekt immunfluoreszcenciával tettük láthatóvá a sejt felszínén található *NimC1* molekulát a *P1a* és *P1b* monoklonális ellenanyagaink keverékét, mint elsődleges ellenanyagot és fluoreszcens festékkel jelzett másodlagos ellenanyagot használva. A *nimC1* RNS inhibíció csökkentti a *NimC1* fehérje mennyiségét a hemociták felszínén.

### 4.3 A *nimród* géncsalád tagjainak transzkripciója

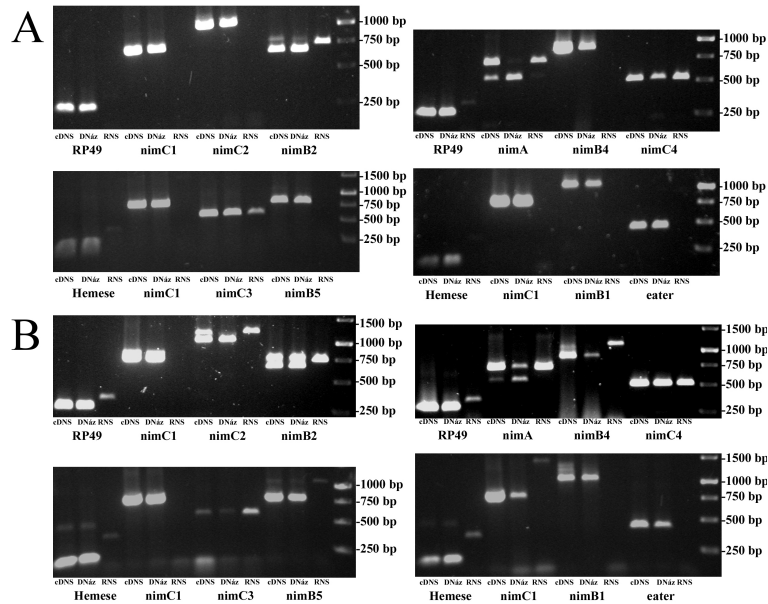
A nem transzlálódó pszeudogének kizárása érdekében az *in silico* azonosított *nimród* génklaszter tagjainak transzkripció szintű kifejeződését vizsgáltuk vad típusú Oregon-R törzs első, második és harmadik stádiumú lárváiban, valamint imágókban, illetve *l(3)mbn-1* lárvák izolált hemocitáiban. Kontrollként a korábban általunk azonosított, a *nimród* géncsalád genomi régiójában található, hemocitákban általánosan kifejeződő *hemese* génre specifikus primerpárt és a minden sejtben kifejeződő L32 riboszómális fehérjét kódoló *rp49* háztartási génre specifikus primerpárt használtuk.

A *nimród* géncsalád tagjainak kifejeződését reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) vizsgáltuk. A fals pozitív eredmények kiszűrésére minden egyes teljes RNS mintából három templátot készítettünk: Az első templát esetében az izolált teljes RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk, ezt neveztük cDNS templátnak. A második templát esetében az izolált teljes RNS-t DNázI enzimmel kezeltük, majd a DNázI enzim inaktiválása után reverz transzkriptáltuk, ezzel a kezeléssel az esetlegesen meglévő genomi DNS szennyezés mennyiségét csökkentettük. Ezt a mintát neveztük DNáz kezelt mintának. A harmadik templát a megfelelően hígított teljes RNS oldat, amelyet negatív kontrollként használtunk. Ezzel a kísérleti elrendezéssel vizsgálhatóak az intront nem tartalmazó *nimC4* és *nimC3* gének is, mivel a DNáz kezelés jelentősen csökkenti az izolált RNS esetleges DNS szennyezettségét.



**11. ábra: A nimród géncsalád tagjainak kifejeződése vad típusú Oregon-R harmadik stádiumú lárvákban és imágókban**

A *nimA*, *nimB1*, *nimB2*, *nimB4*, *nimB5*, *nimC1*, *nimC2*, *nimC3*, *nimC4* és *eater* gének expressziója egyaránt kimutatható vad típusú Oregon-R harmadik stádiumú lárvákban (A) és imágókban (B), míg a kontrollként használt *hemese* gén kizárólag a lárvában fejeződik ki.



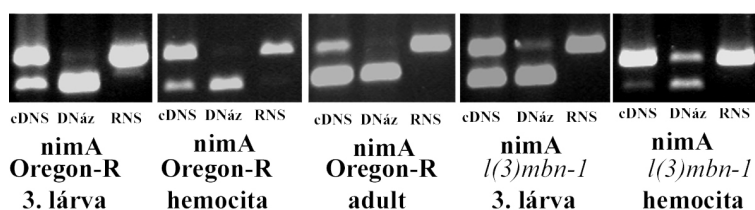
**12. ábra: A nimród géncsalád tagjainak kifejeződése vad típusú Oregon-R és *l(3)mbn-1* hemocita túltermelő mutáns törzsek harmadik stádiumú lárváiból izolált hemocitákban**

A *nimA*, *nimB1*, *nimB2*, *nimB4*, *nimB5*, *nimC1*, *nimC2*, *nimC3*, *nimC4* és *eater* gének expressziója egyaránt kimutatható vad típusú Oregon-R harmadik stádiumú lárvákból (A) valamint a hemocita túltermelő *l(3)mbn-1* törzs lárváiból származó hemocitákban (B).

**3. táblázat: A *nimród* gének kifejeződése a vizsgált fejlődési stádiumokban**

	<i>RP49</i>	<i>Hem</i>	<i>nimC1</i>	<i>nimC2</i>	<i>nimC3</i>	<i>nimC4</i>	<i>nimB1</i>	<i>nimB2</i>	<i>nimB4</i>	<i>nimB5</i>	<i>eater</i>	<i>nimA</i>
Oregon-R lárva	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oregon-R imágó	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oregon-R hemocita	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>l(3)mbn-1</i> 3. lárva	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>l(3)mbn-1</i> hemocita	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Az eredmények összefoglalása a harmadik táblázatban látható. A *nimród* géncsalád tagjai RNS szinten kifejeződnek a vad típusú Oregon-R harmadik stádiumú teljes lárvákban és imágókban (11. ábra), míg a kontrollként használt *hemese* gén a teljes lárvákban kifejeződik, ám nem nyilvánul meg imágókban (11. ábra). A *Hemese* gén transzkripció aktivitása (12. ábra) egybevág a *Hemese* fehérje kifejeződési mintázatával, amely kizárólag a lárva hemocitáin mutatható ki, az imágó hemocitáin nem (Kurucz és mtsai., 2003). A vad típusú Oregon-R hemocitákból készített minták esetén a *nimA* primerpár a genomi DNS-ből származó, nagyobb méretű termék ezekben a mintákban nagyobb mennyiségben van jelen, mint a rövidebb, cDNS-ből származó termék. Ugyanezt a jelenséget tapasztaltuk *l(3)mbn-1* mutáns lárva izolt hemocitáinak vizsgálatakor is, ami a vad típusú, illetve *l(3)mbn-1* mutáns teljes lárva vizsgálatakor nem volt megfigyelhető (13. ábra).

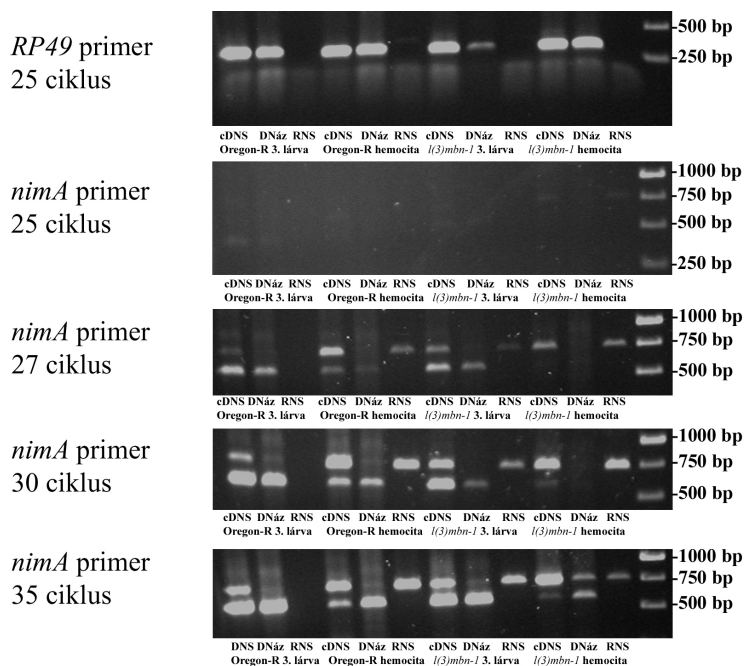


**13. ábra: A *NimA* transzkript a genomi DNS szennyezésből és a cDNS-ből kimutatható aránya**

A teljes lárvákból és imágókból származó mintákban a *NimA* primerpár használatakor a genomi DNS szennyezésből származó PCR termék mennyisége körülbelül azonos a cDNS-ből származó termék mennyiségével, míg a hemocitákból származó mintákban a genomi DNS szennyezésből származó PCR termék nagyobb mennyiségben van jelen, mint a cDNS-ből származó termék.

A fenti a látszólagos ellentmondás feloldására szemikvantitatív RT-PCR-t végeztünk, csökkentve a ciklusszámot. Míg a kontrollként használt RP49 primerekkel már huszonöt ciklusnyi

polimeráz láncreakció látható terméket eredményezett, a *nimA* primerek használatával huszonöt ciklus után nem kaptunk értékelhető mennyiségű terméket, így azokkal huszonhét, harminc és harmincöt ciklusnyi polimeráz láncreakciókat is végeztünk (14. ábra).



**14. ábra: A *NimA* primerpár használatával kapott termékek különböző ciklusszámú PCR reakciókból**

A testi sejtekben általánosan, nagy mennyiségben megtalálható RP49 transzkript már huszonöt PCR ciklus után kimutatható mennyiségű terméket eredményez, míg a *nimA* messenger RNS csak huszonhét ciklus után hoz létre látható mennyiségű terméket. A vad típusú és az *l(3)mbn-1* mutáns teljes lárvákból származó mintákban nagyobb mennyiségű *nimA* transzkript mutatható ki, mint az izolált hemocita mintákban és az *l(3)mbn-1* hemocita mintában kevesebb *nimA* transzkript mutatható ki, mint a vad típusú, Oregon-R hemocitákból származó mintákban.

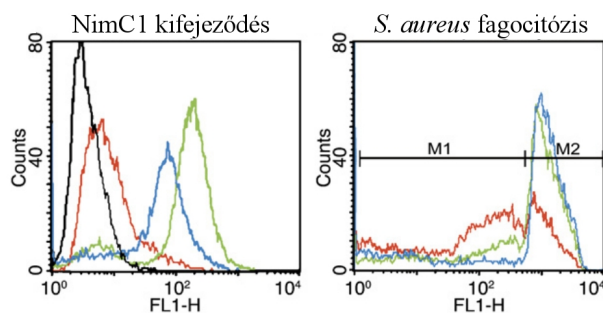
Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy az egyes templátokban eltérő mennyiségű *nimA* cDNS található. Az Oregon-R és az *l(3)mbn-1* egész lárvákból készült mintákban viszonylag nagy mennyiségű *nimA* cDNS található, a reakció során a cDNS-ből származó jel erősebb, mint a genomi DNS-ből származó jel (13. ábra). Az Oregon-R és *l(3)mbn-1* harmadik stádiumú lárvák izolált hemocitáiból származó cDNS mintákban jelentősen kevesebb *nimA* cDNS található, mint az egész lárvákból származó mintákban ám a vad típusú, Oregon-R hemocitákból készült minta több *nimA* cDNS-t tartalmaz, mint az *l(3)mbn-1* hemocitákból készült minta. A kapott eredményeket azzal magyaráztuk, hogy a *nimA* gén nem fejeződik ki hemocitákban, az izolált hemocitákból kapott gyenge jel az állatok kivézetésekor a mintát szennyező egyéb szövetdarabokból származik. Mivel a hemocita mintákat a sejtszámra és az RNS mennyiségére is

normalizáltuk, így ugyanannyi hemocita izolálásához a vad típusú egyedekből körülbelül egy nagyságrenddel többet véreztettünk ki, mint a hemocita túltermelő *l(3)mbn-1* mutáns egyedekből, így a vad típusú lárvákból származó mintában az egyéb szöveti szennyezés is több.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy egy kivétellel a *nimród* géncsalád összes vizsgált tagja kifejeződik a vizsgált mintákban (3. táblázat). A kivétel a *nimA* gén, amely izolált hemocitákban nem mutat transzkripció aktivitást, de a lárva valamely másik szövetében kifejeződik.

#### 4.4 A NimC1 szerepe a fagocitózisban

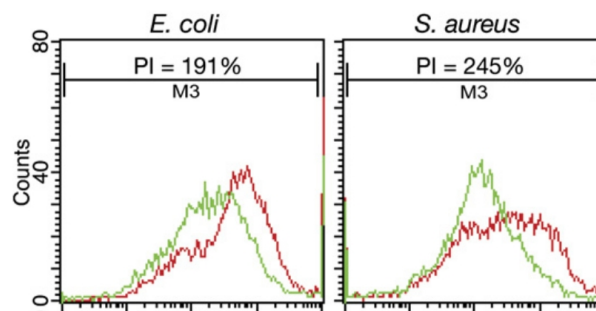
Meg kívántuk vizsgálni, hogy a *D. melanogaster* fagocita sejtjein megnyilvánuló NimC1 fehérje szerepet játszik-e a fagocitózis folyamatában? A NimC1 fehérje immunválaszban betöltött szerepének funkcióvesztéses vizsgálatához a kettőszálú RNS interferenciával géncsendesített *Hemese-Gal4xUAS-nimC1-IR* törzsből hemocitákat izoláltunk. Az élő hemocitákat hővel elölt, fluoreszcensen zölden jelölt *S. aureus* baktériumsejtekkel inkubáltuk, majd a hemociták által bekebelezett baktériumok fluoreszcenciáját a FITC emissziós tartományában áramlási citometriával megmértük. A *Hemese-Gal4xUAS-nimC1-IR* törzs hemocitáin az RNS inhibíció hatására a szülői törzsekhez képest lecsökken a sejtek felszínén kimutatható NimC1 fehérje mennyisége és ezzel párhuzamosan a sejtek *S. aureus* fagocitáló képessége is csökken (15. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy az RNS interferenciával előállított NimC1 funkcióvesztéses mutánsában a fagocitózis hatékonysága a NimC1 fehérje sejtfelszíni megnyilvánulásának mértékétől függ.



**15. ábra: A *nimC1* gén csendesítésének hatására a hemociták felszínén csökken a NimC1 fehérje mennyisége és a sejtek *S. aureus* fagocitáló képesség**

A *nimC1* géncsendesített *Hemese-Gal4xUAS-nimC1-IR* törzs hemocitáit (piros hisztogram) illetve a szülői *Hemese-Gal4* (zöld), és *UAS-nimC1-IR* (kék) törzsekből izolált hemocitákat P1a és P1b elsődleges, majd biotinált anti-egér Streptavidin-Cy3 másodlagos ellenanyaggal festve, áramlási citometriával mérve azt tapasztaltuk, hogy *Hemese-Gal4xUAS-nimC1-IR* törzs hemocitái (piros) kevesebb NimC1 fehérjét fejeznek ki és kevesebb *S. aureus* baktériumot fagocitálnak mint a kontrollként használt szülői törzsek. Negatív kontrollként indifferens ellenanyaggal festett *Hemese-Gal4xUAS-nimC1-IR* hemocitákat (fekete) használtunk.

A NimC1 fehérje fagocitózisban betöltött szerepének funkcionyeréses vizsgálatához a NimC1 molekulát a *Drosophila* Schneider-2 sejtvonalon rekombináns fehérjeként fejeztettük ki. A pMT/V5-HIS-*nimC1* plazmidot Schneider-2 sejtekbe transzfektáltuk, majd a NimC1 fehérje kifejeződését réz-szulfáttal indukáltuk. A NimC1 fehérjét kifejező Schneider-2 sejteket FITC-cel jelölt baktériummal inkubáltuk, majd áramlási citometriával megmértük a fluoreszcencia intenzitásukat. Negatív kontrollként a pMT/V5-HIS-*nimC1* plazmidot hordozó, nem indukált Schneider-2 sejtek szolgálták, amelyek nem fejezik ki sem az endogén, sem a rekombináns NimC1 fehérjét. A nem fagocitált jelölt baktériumok háttérfluoreszcenciáját tripánkék hozzáadásával küszöböltük ki, amely megakadályozza a FITC molekula emisszióját, így ebben a kísérletben csak a sejtek fagoszómáiban található baktériumok fluoreszkáltak. Azt tapasztaltuk, hogy a rekombináns NimC1 fehérjét kifejező Schneider-2 sejtek fluoreszcencia intenzitása magasabb, mint a kontrollként használt sejteké, ebből arra következtettük, hogy a NimC1 fehérje kifejeződése megnöveli mind az *E. coli* mind a *S. aureus* baktériumok fagocitózisának hatékonyságát (16. ábra).



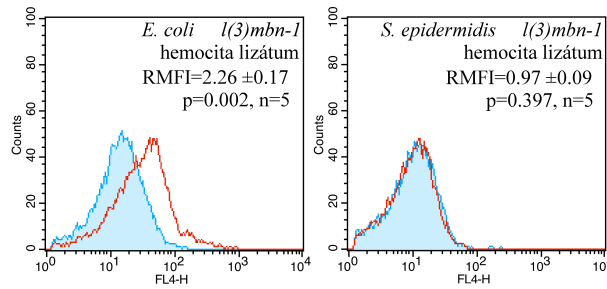
**16. ábra: A NimC1 fehérje kifejeztetése növeli a Schneider-2 sejtek fagocitáló képességét**  
A Schneider-2 sejtek nem fejezik ki a NimC1 fehérjét. A *nimC1* gén Schneider-2 sejtekben, egy indukálható vektor (pMTV5-His) segítségével kifejeztetve fokozza a NimC1 fehérjét kifejező sejtek *E. coli* és *S. aureus* fagocitáló képességét, (piros) az indukálatlan kontrollhoz képest (zöld).

## 4.5 A natív, hemocitákból izolált NimC1 fehérje baktériumkötése

Az előző fejezetben bemutatott kísérletekből nyilvánvalóvá vált, hogy a NimC1 fehérje a fagocitózis folyamatában játszik valamilyen szerepet. Meg kívántuk vizsgálni, hogy a NimC1 hozzájárul-e a fagocitózis első lépéséhez, a mikróbak felismeréséhez és megkötéséhez. A NimC1 fehérje baktériumkötésének vizsgálatához a hemocita túltermelő *l(3)mbn-1* harmadik stádiumú lárvákból hemocitákat izoláltunk, majd ezeket nemionos detergenst (NP-40) tartalmazó lízispufferben szonikálva, majd folyékony nitrogénben fagyasztva NimC1 és a fagocitózis szempontjából indifferens, a tokképző lamellocitákon megnyilvánuló Attila fehérjét (Kurucz és mtsai., 2007b, Honti és mtsai., 2009) is tartalmazó lizátumot állítottunk elő. Ezzel a lizátummal hővel inaktivált, zöld fluoreszcens festékkel (FITC) jelölt baktériumsejteket kezeltünk, majd a

baktériumsejteket megmostuk és a NimC1 fehérjét felismerő P1a és P1b monoklonális ellenanyag (mAb) keverékkel, valamint negatív kontrollként az Atilla fehérjét felismerő L1a, L1b mAb keverékkel festettük. Az egér mAb ellenanyagok jelenlétét a baktériumokon távoli vörös fluoreszcens festékkel (Alexa 633) jelölt poliklonális anti-egér ellenanyaggal mutattuk ki. A mintákat áramlási citometriával mértük, a baktériumsejteket zöld fluoreszcenciájuk alapján azonosítottuk, majd a zölden fluoreszkáló részecskék távoli vörös fluoreszcenciáját határoztuk meg. Amennyiben a hemocita lizátumban található NimC1 fehérje kötődik a baktériumsejtekhez, a zölden fluoreszkáló részecskék távoli vörös fluoreszcenciája megemelkedik.

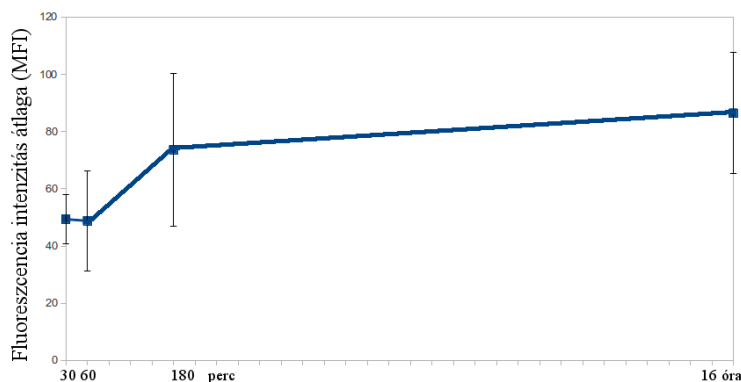
Elsőként a NimC1 fehérje Gram-negatív *E. coli* és Gram-pozitív *S. epidermidis* kötését vizsgáltuk. A baktériumkötés mértékének meghatározására a NimC1 specifikus ellenanyagokkal festett minta fluoreszcencia-intenzitásának számtani közepének (MFI) és az Atilla specifikus ellenanyagokkal festett negatív kontroll fluoreszcencia-intenzitásainak számtani közepének hányadosát választottuk és ezt neveztük relatív fluoreszcencia intenzitásnak (RMFI). A kapott MFI értékeket statisztikai elemzésnek vetettük alá, azokat a kölcsönhatásokat neveztük baktériumkötésnek, ahol a Student *t*-teszt eredménye öt századnál alacsonyabb, azaz a NimC1 ellenanyaggal festett minták MFI értékei szignifikánsan különböznek a kontroll MFI értékektől. Azt tapasztaltuk, hogy a hemocita lizátummal kezelt, NimC1 ellenanyaggal festett *E. coli* baktériumok fluoreszcencia intenzitása a kontrollhoz képest több mint kétszeresére emelkedett és a NimC1 ellenanyaggal festett minták fluoreszcencia intenzitása szignifikánsan különbözött a kontroll fluoreszcencia intenzitásától (RMFI=2,26 ±0,17; p=0,002; n=5). Ebből arra következtettünk, hogy a hemocita lizátumban található NimC1 fehérje a Gram-negatív *E. coli* baktériumsejtek felszínéhez kötődik (17. ábra). A NimC1 fehérje *S. epidermidis* kötését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a baktériumsejtek fluoreszcencia intenzitása nem különbözik szignifikánsan a negatív kontrollétól (RMFI=0,97 ±0,09; p=0,397; n=5), ebből arra következtettünk, hogy a NimC1 nem kötődik Gram-pozitív *S. epidermidis* sejtekhez (17. ábra).



**17. ábra: A NimC1 fehérje kötődése *E. coli* és *S. epidermidis* baktériumokhoz**

A hemocita lizátummal kezelt, NimC1 elsődleges és távoli vörös tartományban fluoreszcensen jelölt anti-egér másodlagos ellenanyaggal festett *E. coli* távoli vörös tartományban mért fluoreszcencia intenzitása magasabb az Atilla elsődleges ellenanyaggal festett negatív kontrollénál, jelezve, hogy a NimC1 fehérje kötődik az *E. coli* baktériumsejtekhez, míg az Atilla fehérje nem. A hemocita lizátummal kezelt *S. epidermidis* MFI értéke közel azonos mindkét ellenanyaggal festve, jelezve, hogy egyik fehérje sem kötődik az *S. epidermidis* sejtekhez.

A NimC1 baktériumkötésének optimális beállításához harminc, hatvan, száznyolcvan percen, valamint egy éjszakán át inkubáltunk *E. coli* sejteket *l(3)mbn-1* hemociták lizátumában, majd az így kezelt mintákat az NimC1 fehérjét felismerő elsődleges ellenanyaggal festettük. Eredményeink szerint a NimC1 festett minta MFI értéke az inkubációs idő növekedése során eljut a telítésig (18. ábra). A továbbiakban minden kísérletben éjszakán át inkubálást alkalmaztunk.



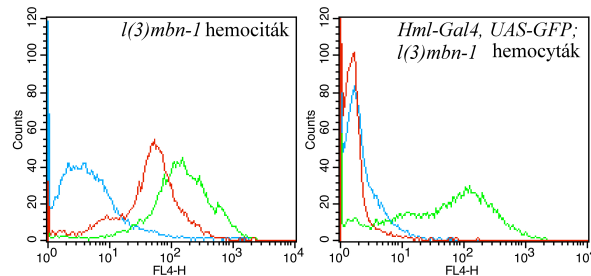
**18. ábra: A NimC1 baktériumkötésének időfüggése**

Hővel előlt, FITC-jelölt *E. coli* baktériumokat inkubáltunk 30, 60, 180 percen és egy éjszakán át hemocita lizátumban. Az ábrán az egyes minták MFI értékét ábrázoltuk.

A NimC1 baktériumkötés negatív kontrolljaként a *Hml-Gal4.Δ, 2XUAS-EGFP; l(3)mbn-1* lárvából származó hemociták lizátumát használtuk. A *Hml-Gal4.Δ, 2XUAS-EGFP; l(3)mbn-1* törzs a második kromoszómáján egy spontán keletkezett háttérmutációt hordoz, amelynek hatására hemocitái felületén a P1a és P1b ellenanyagainkkal nem mutatható ki a NimC1 fehérje jelenléte (19. ábra). A *Hml-Gal4.Δ, 2XUAS-EGFP; l(3)mbn-1* hemociták lizátumával kezelt, NimC1 ellenanyaggal festett minta fluoreszcencia intenzitása hasonló az Atilla kontrolléhoz (RMFI=0,89 ± 0,17; p=0,112; n=4) (20. ábra). Hasonlóan nem mutattunk ki baktérium kötődést abban az esetben,

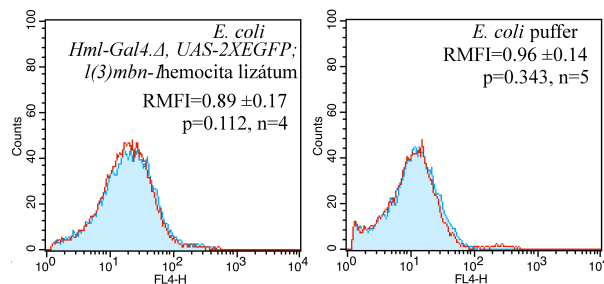


amikor a baktériumokat hemocita lizátum helyett pufferrel kezeltük (RMFI=0,96 ±0,14; p=0,343; n=5) (20. ábra).



**19. ábra: A *Hml-Gal4.Δ*, *2XUAS-EGFP*; *l(3)mbn-1* hemociták nem fejezik ki a *NimC1* fehérjét**

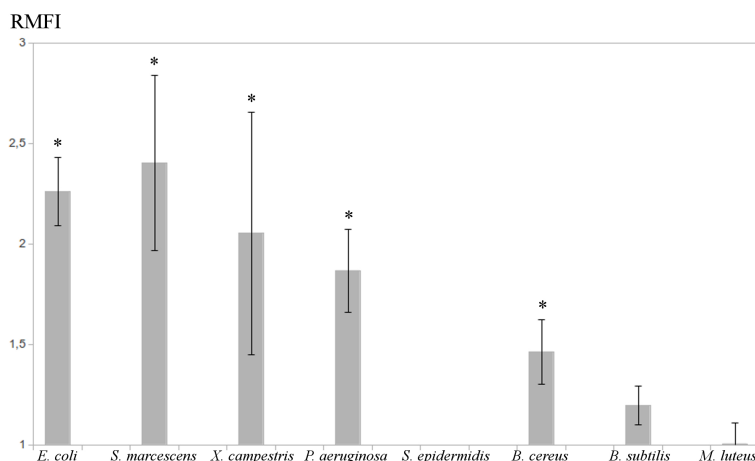
Harmadik stádiumú lárvákból izoláltunk élő hemocitákat *l(3)mbn-1* és a *Hml-Gal4.Δ*, *2XUAS-EGFP*; *l(3)mbn-1* homozigóta egyedekből. A hemocitákat *NimC1* ellenanyaggal festettük (piros), negatív kontrollként az emberi *CD45* fehérjét felismerő T2/48 ellenanyagot (kék), pozitív kontrollként a *D. melanogaster* minden hemocitáján kifejeződő Hemese fehérjét felismerő ellenanyagot (zöld) használtuk. Másodlagos ellenanyagként Alexa 633 fluorokrómval jelölt, távoli vörös tartományban emittáló anti-egér ellenanyagot használtunk. Mindkét törzs hemocitáin kimutatható a Hemese fehérje, a *NimC1* azonban kizárólag az *l(3)mbn-1* hemocitákon fejeződik ki.



**20. ábra: Baktériumkötési negatív kontroll kísérletek**

A *Hml-Gal4.Δ*, *2XUAS-EGFP*; *l(3)mbn-1* hemociták lizátumával és pufferrel inkubált *E. coli* sejteken nem mutatható ki a *NimC1* fehérje jelenléte.

Megvizsgáltuk a *NimC1* fehérje különböző baktériumtörzsekhez kötődését és azt tapasztaltuk, hogy a *NimC1* fehérje az *E. coli*-hoz hasonlóan kötődik a Gram-negatív *S. marcescens* (RMFI=2,403 ±0,436; p=0,0002; n=4), *Xanthomonas campestris* (RMFI=2,053 ±0,603; p=0,01; n=4), *Pseudomonas aeruginosa* (RMFI=1,867 ±0,206; p=0,003; n=4) baktériumtörzsekhez. Az *E. coli* esetében megfigyeltnél alacsonyabb RMFI értékkel, ám szignifikánsan kötődik a *NimC1* molekula a Gram-pozitív *B. cereus* var. *mycoides* szervezethez (RMFI=1,463 ±0,161; p=0,028; n=4). A *NimC1* molekula nem kötődik Gram-pozitív *M. luteus* (RMFI=1,005 ±0,104; p=0,493; n=4) és *B. subtilis* (RMFI=1,195 ±0,096; p=0,13; n=4) baktériumokhoz (21. ábra).

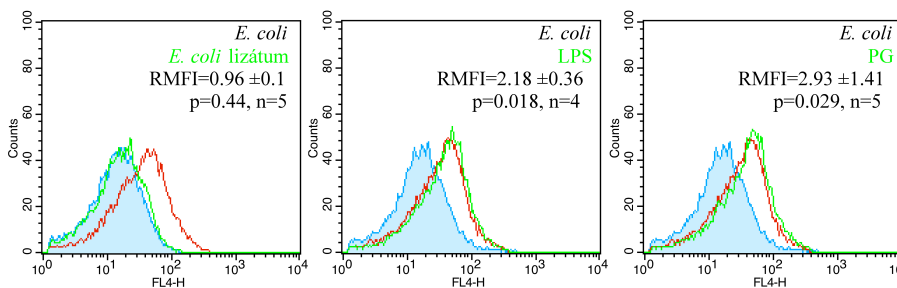


**21. ábra: A NimC1 kötődése különböző baktériumtörzsekhez**

A NimC1 fehérje különböző baktériumokhoz való kötődését összehasonlítva, a csillaggal jelölt Gram-negatív *E. coli*, *S. marcescens*, *X. campestris* *P. aeruginosa* és a Gram-pozitív *B. cereus* mutat szignifikáns NimC1 kötést.

**4.6 A NimC1 fehérje ligandjának vizsgálata**

Miután beláttuk, hogy a NimC1 fehérje kötődik az *E. coli* baktériumhoz, meg kívántuk vizsgálni, mi az a ligand, amelyet felismer a baktérium felületén. Elsőként *E. coli* lizátumot készítettünk, amit hemocita lizátummal előinkubálva azt tapasztaltuk, hogy a baktérium lizátum csökkentette a NimC1 kötődését a hővel előlt baktériumsejtekhez, jelezve, hogy az *E. coli* lizátum valamely alkotóeleme kompetál a NimC1 kötőhelyekért. A NimC1 fehérje ligandjának meghatározásához peptidoglikánnal (PG) és lipopoliszacchariddal (LPS) előinkubált hemocita lizátummal végeztünk kompetíciós baktériumkötési kísérleteket, ám azt tapasztaltuk, hogy sem a PG sem az LPS jelenléte sem csökkenti a NimC1 baktériumkötési kapacitását (22. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy egyik sem ligandja a NimC1-nek, hiszen nem kompetálnak a molekula kötőhelyeiért.

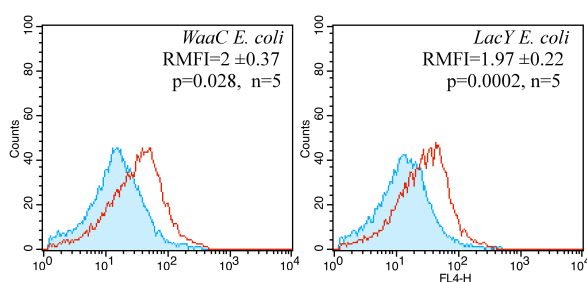


**22. ábra: A NimC1 baktériumkötésének kompetíciós vizsgálata E. coli lizátum, lipopoliszaccharid vagy peptidoglikán jelenlétében**

Az ábrákon piros hisztogram jelöli a hemocita lizátummal kezelt NimC1 ellenanyaggal festett baktériumsejtek távoli vörös fluoreszcenciáját, a kontrollhoz viszonyítva (kék). *E. coli* lizátum hozzáadása gátolja a NimC1 baktériumkötését (A, zöld), ám a hemocita lizátumhoz 200 µg/ml LPS

(B, zöld) vagy 153 µg/ml PG (C, zöld) hozzáadása nem csökkenti a NimC1 ellenanyaggal festett *E. coli* sejtek távoli vörös fluoreszcenciáját.

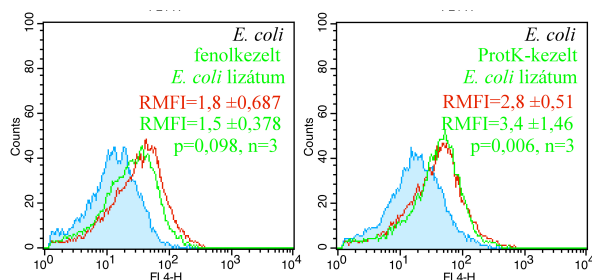
Az LPS molekulát, mint lehetséges NimC1 ligandot egy másik módszerrel is megvizsgáltuk, mivel nem lehet kizárni, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható LPS az izolálás során valamilyen kémiai módosításon esik át, amelynek nyomán már nem képes kötődni hozzá a NimC1 molekula. Az LPS molekula felépítésében központi szerepet játszik a hidrofób Lipid A molekula, amelyhez hidrofil oligoszaccharidok kapcsolódnak kovalens kötésekkel. A cukormolekulák a Lipid A sorozatos, különböző membránkötött glikoziltransferáz enzimek által katalizált glikozilációjával épülnek föl. Az egyes glikozilációs lépéseket katalizáló enzimek ismertek, funkcióvesztéses mutánsaik hozzáférhetőek. Megvizsgáltuk a NimC1 molekula kötődését a *WaaC* mutáns *E. coli* törzshöz, amely a sejt falában található Lipid A molekulát egyetlen 3-deoxi-D-manno-okt-2-uloszonsav glikozilálja, így ez a baktériumtörzs a vad típusúhoz képest csonkolt LPS molekulát épít be a sejt falába. Mivel a *WaaC* törzset inszerciós mutagenézissel hozták létre, egy kanamicin rezisztanciagént tartalmazó kazettát építve a vad típusú *WaaC* gén helyére, szükséges volt az eddig használt vad típusú *E. coli* törzs mellett egy újabb kontroll alkalmazása. Ahhoz, hogy kiküszöbölhessük a kanamicin rezisztancia esetleges kísérleti eredményt torzító hatásait, negatív kontrollként használtuk az ugyanebből a törzsgyűjteményből származó *LacY* törzset, amely ugyanezt a kanamicin rezisztanciagént hordozza a laktóz-permeáz enzimet kódoló *LacY* génjében, így vad típusú LPS molekulát épít a sejt falába (Chen és Coleman, 1993; Heinrichs és mtsai., 1998; Qimron és mtsai., 2006). Eredményeink szerint a nimC1 molekula mindkét *E. coli* törzshöz hasonlóan kötődik (23. ábra), valószínűsítve, hogy az LPS valóban nem a NimC1 receptor ligandja.



### 23. ábra: NimC1 kötődése vad típusú, *WaaC* és *LacY* mutáns *E. coli* törzsekhez

A trunkált LPS molekulát kifejező *WaaC* baktériumtörzshöz és az azonos módszerrel létrehozott *LacY* mutánshoz hasonlóan kötődik a NimC1 molekula, valószínűsítve, hogy az LPS nem ligandja a NimC1 receptornak. Piros hisztogramok jelölik a NimC1, kék a kontroll ellenanyaggal festett mintákat.

A NimC1 ligand kémiai természetének meghatározásához fenolprecipitálással és Proteináz K emésztéssel eltávolítottuk a fehérjéket az *E. coli* lizátumból, majd a fehérjementesített lizátummal gátoltuk a NimC1 baktériumkötését. Azt tapasztaltuk, hogy mind a fenolprecipitált mind a Proteináz K kezelt *E. coli* lizátum kevésbé gátolja a NimC1 baktériumkötését (24. ábra) mint a kezeletlen, amiből arra következtettünk, hogy a fenolprecipitálás és a Proteináz K emésztés egyaránt eltávolítja az baktérium lizátumból a NimC1 ligandját, ami a ligand fehérje-természetére utal.



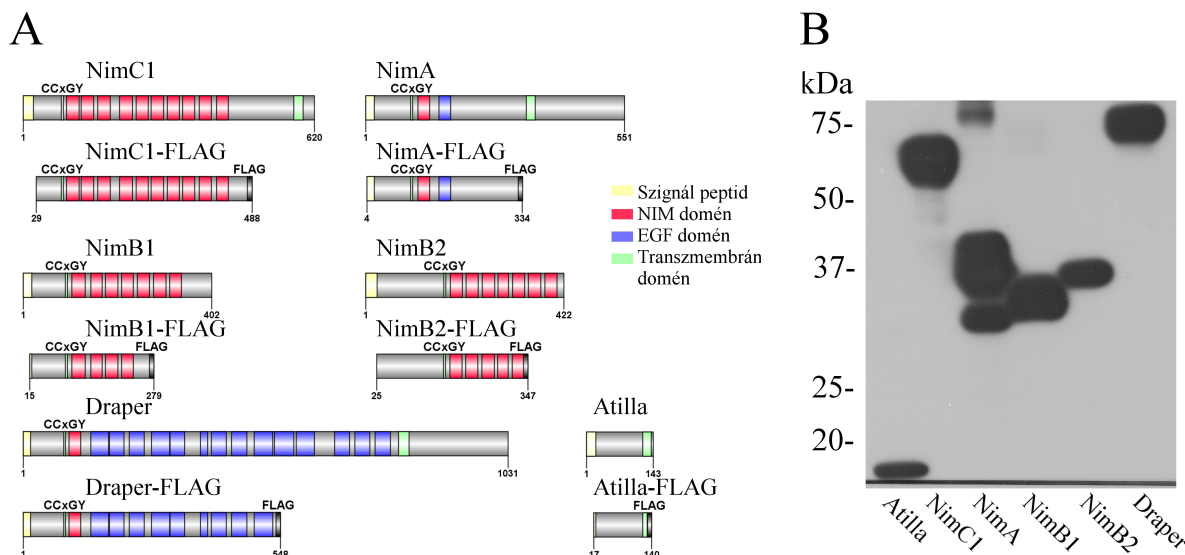
**24. ábra: A fehérjék eltávolítása megszünteti az *E. coli* lizátum kompetícióját a NimC1 kötőhelyekért**

A kezeletlen hemocita lizátumból származó NimC1 molekula baktériumkötése látható a piros hisztogramokon, a negatív kontrollhoz viszonyítva (kék). A fenolprecipitált (zöld) és a Proteináz K enzimmel kezelt (zöld) baktérium lizátum kevésbé gátolja a NimC1 baktériumkötését, jelezve, hogy a NimC1 ligandja fehérjetermészetű.

## 4.7 A rekombináns Nimród fehérjék baktériumkötése

Mivel a Nimród fehérjék közül egyedül a NimC1 fehérjét felismerő ellenanyagokkal rendelkeztek, további Nimród fehérjék baktériumkötésének vizsgálatához a NimC1, NimA, NimB1, NimB2 fehérjék FLAG epitóppal ellátott extracelluláris doménjeit rekombináns fehérjeként termeltettük meg így ezen fehérjék baktériumkötését anti-FLAG ellenanyag segítségével ugyanabban a kísérleti rendszerben vizsgálhattuk, mint a NimC1 fehérjéét. Negatív kontrollként az Atila fehérje FLAG epitóppal ellátott extracelluláris doménjét fejeztettük ki, pozitív kontrollként pedig a már korábban baktériumkötő fehérjeként leírt Draper fehérje FLAG epitóppal kiegészített extracelluláris doménje szolgált. A fehérjék kifejeztetésére a baculovírus alapú Bac-to-Bac expressziós rendszert választottuk.

A lepke sejtek lizátumában a rekombináns fehérjék jelenlétét anti-FLAG ellenanyag segítségével western blot analízissel mutattuk ki (25. ábra). Méréseink alapján a rekombináns Nimród fehérjék molekulatömege kissé nagyobbak bizonyult az aminosav-szekvenciájuk alapján számított molekulatömegnél, amit feltehetőleg poszt-transzlációs módosítások okozhatnak, legvalószínűbben a fehérjék glikozilációja, amire a szekvenciákban található prediktált glikozilációs helyek jelenléte is utal.



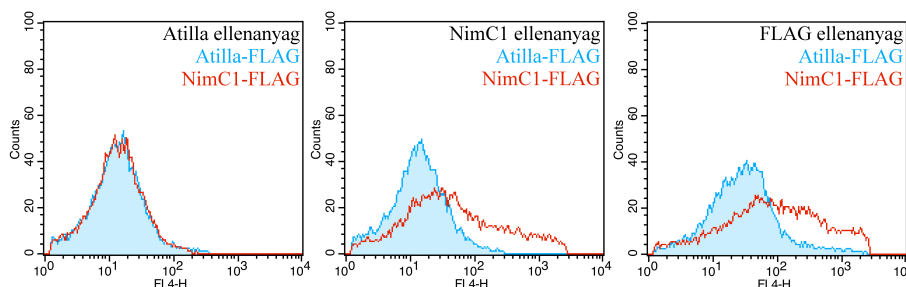
**25. ábra: A kifejeztetett fehérjék és western blot elemzésük**

Az A oldalon a rekombináns Nimród fehérjék doménszerkezete látható. Sárgával jelöltük a szignál peptideket, pirossal a NIM doméneket, kékkel az EGF doméneket, zölddel a transzmembrán doméneket, feketével a FLAG epitópokat. Az ábra B oldalán a kifejeztetett rekombináns fehérjék Western blot elemzése látható, a rekombináns fehérjék aminosavszekvenciája alapján számított molekulatömege közel azonos a western blot során mért molekulatömegükkel. Atilla (mért molekulatömeg: 15 kDa; számított molekulatömeg: 13,6 kDa); NimC1 (mért molekulatömeg: 52-60 kDa; számított molekulatömeg: 50,4 kDa); NimA (mért molekulatömeg: 32, 35-42, 65 kDa; számított molekulatömeg: 36,3 kDa); NimB1 (mért molekulatömeg: 30-39 kDa; számított molekulatömeg: 30,1 kDa); NimB2 (mért molekulatömeg: 34-37 kDa; számított molekulatömeg: 35,3 kDa); Draper (mért molekulatömeg: 60-80 kDa; számított molekulatömeg: 59,5 kDa);

A rekombináns fehérjék baktériumkötő képességét a hemocitákból származó NimC1 fehérjéhez hasonlóan vizsgáltuk. A fehérjéket kifejező lepke sejtek lizátumával hővel előlt, FITC-jelölt baktériumsejteket kezeltünk, majd a baktériumokat a FLAG epitópot specifikusan felismerő, egér IgG elsődleges ellenanyaggal és az egér ellenanyagot specifikusan felismerő, a távoli vörös tartományban fluoreszkáló Alexa 633 fluorokrómval jelölt másodlagos ellenanyaggal festettük, majd a baktériumok távoli vörös fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával mértük. A NimA, NimB1, NimB2, NimC1 és Draper fehérjéket kifejező Sf9 sejtek lizátumával *E. coli* és *S. epidermidis* baktériumokat kezeltünk, majd az áramlási citometriás méréssel kapott MFI értékekből

kiszámítottuk az egyes minták RMFI értékeit, az Atilla fehérjét termelő Sf9 sejt-lizátummal kezelt baktériumokhoz, mint negatív kontrollhoz viszonyítva.

Az *E. coli* baktériumsejteket a rekombináns NimC1 fehérjét kifejező Sf9 sejtek lizátumával illetve a rekombináns Atilla fehérjét kifejező Sf9 sejtek lizátumával kezeltünk, majd az Atilla, a NimC1, illetve az anti-FLAG ellenanyaggal festettük. A hat minta összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy a rekombináns NimC1 fehérjével kezelt baktériumsejtek fluoreszcencia intenzitása mind az anti-NimC1 mind az anti-FLAG ellenanyaggal festve magasabb a kontrollénál, míg a rekombináns Atilla fehérjével kezelt sejtek fluoreszcencia intenzitása az ellenanyagokkal festve alacsony maradt (26. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a rekombináns NimC1 fehérje a hemocitákból származó natív NimC1 fehérjéhez hasonlóan kötődik az *E. coli* sejtekhez és ez a kötődés mind a NimC1 fehérjét felismerő ellenanyagokkal mind a FLAG-taget felismerő ellenanyaggal kimutatható.

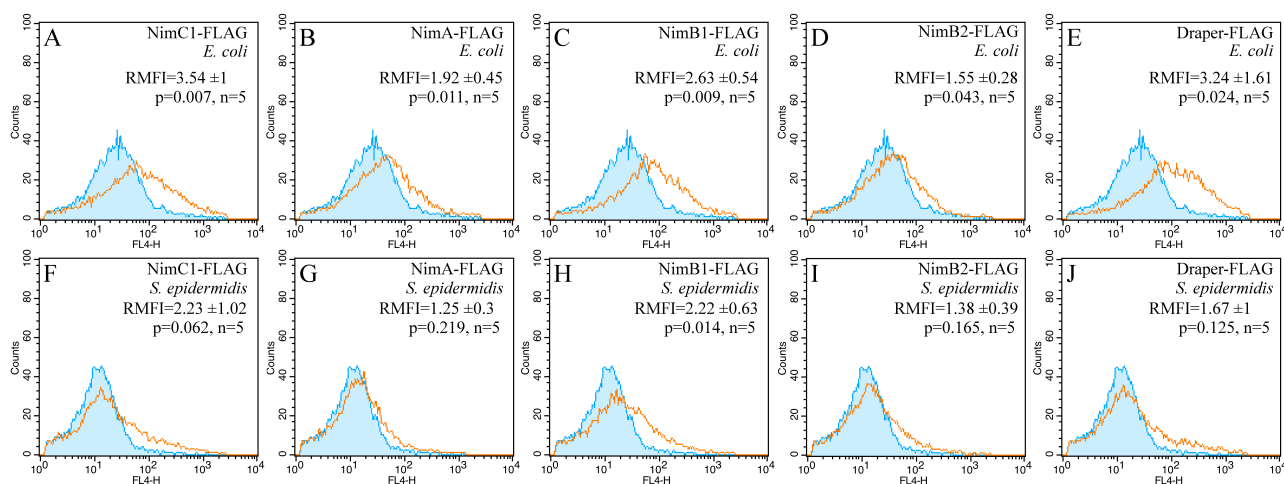


**26. ábra: A rekombináns NimC1 fehérje baktériumkötése anti-NimC1 és anti-FLAG ellenanyaggal is kimutatható**

A rekombináns NimC1 fehérjét kifejező Sf9 sejtek lizátumával FITC jelölt *E. coli* baktériumsejteket kezeltünk. A baktériumokat a NimC1 fehérjét felismerő és a FLAG epitópot felismerő ellenanyaggal valamint negatív kontrollként Atilla fehérjét felismerő ellenanyaggal festettük.

A továbbiakban a Draper, NimB1, NimB2, NimA rekombináns fehérjék baktériumkötését is megvizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy a NimA, NimB1, NimB2 NimC1 és Draper fehérjék szignifikánsan kötődnek az *E. coli* baktériumokhoz (27. ábra). A NimC1, a Draper és a NimB1 fehérjék esetében magasabb RMFI értékeket mértünk, míg a NimA és a NimB2 esetében alacsonyabbakat. A Gram-pozitív *S. epidermidis* baktériumsejtekhez a vizsgált rekombináns fehérjék közül egyedül a NimB1 kötődött szignifikánsan. A kísérleteink alapján a rekombináns NimC1 fehérje (RMFI=3,539 ±1,021; p=0,007; n=5) a pozitív kontrollként használt Draperhez (RMFI=3,224 ±1,61; p=0,024; n=5) hasonló komplexet alakít ki *E. coli* baktériumokkal, ám a kötés RMFI értéke magasabb, mint a natív, hemocitákból származó NimC1 fehérjéé (RMFI=2,256 ±0,166; p=0,002; n=5). Ebből arra következtethetünk, hogy a baktériumkötés hatékonysága nem

egyenesen arányos a fehérjemolekula NIM doménjeinek a számával, hiszen a rekombináns NimC1 a natív fehérjéhez hasonlóan tíz NIM domént tartalmaz, míg a Draper fehérje számos EGF doménje mellett csupán egyetlen NIM doménnel rendelkezik. Bár a rekombináns NimB1 fehérje négy NIM domént hordoz, mégis a NimC1-hez hasonló RMFI értékkel köti az *E. coli* (RMFI=2,639 ±0,554; p=0,009; n=5) és a vizsgált Nimród fehérjék közül kizárólag a NimB1 köti a *S. epidermidis* baktériumsejteket (RMFI=2,23 ±0,613; p=0,013; n=5). A másik NimB típusú fehérje, az öt NIM doménnel rendelkező NimB2 a legalacsonyabb RMFI értékkel köti az *E. coli* baktériumokat (RMFI=1,552 ±0,277; p=0,043; n=5), a *S. epidermidis* sejteket pedig egyáltalán nem (RMFI=1,382 ±0,391; p=0,165; n=5). A NimB típusú fehérjék különböző ligandokat is felismerhetnek, ami feltehetően azért van mert a génekklaszter kialakulásakor az egyetlen *nimB* gén duplikációi során létrejött *nimB* gének funkciói is elkülönültek egymástól.



### 27. ábra: A rekombináns Nimród fehérjék baktériumkötése

A hisztogramok az egyes rekombináns fehérjéket kifejező Sf9 sejtizátumokkal kezelt FITC-jelölt *E. coli* (A-E) és a FITC-jelölt *S. epidermidis* (F-J) baktériumsejtek fluoreszcencia intenzitását mutatják a távoli vörös tartományban. A rekombináns NimC1 (A, F okkersárga), NimA (B, G okkersárga), NimB1 (C, H okkersárga), NimB2 (D, I okkersárga), Draper (E, J okkersárga) fehérjékhez a FLAG epitóp taggal kiegészített rekombináns Atilla fehérjét kifejező Sf9 sejtek lizátuma szolgált negatív kontrollként (A-J kék).

## 5. Az eredmények megbeszélése

A dolgozatban közölt vizsgálatokkal a munkacsoportunk által azonosított Nimród fehérje- és géncsalád tagjainak a fagocitózisban betöltött szerepét kívántuk megismerni. Megvizsgáltuk a *nimród* gének kifejeződését az *ecetmuslica* egyedfejlődése során. Reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakcióval mértük az egyes *nimród* gének kifejeződését. Azt tapasztaltuk, hogy a *nimA*, *nimB* és *nimC* gének az első, második és harmadik lárvastádiumban, valamint az imágókban is kifejeződnek, azonban az izolált hemocitákban kizárólag a *nimB* és *nimC* gének mutattak transzkripciós aktivitást, a *nimA* gén a lárva valamely másik szövetében fejeződik ki, hemocitákban nem nyilvánul meg.

Mivel az *ecetmuslica* genom öt *NimB* és négy *NimC* típusú receptort kódol, valamint a *NimC* típusú, ám a klaszteren kívül található *Eater* molekulát, feltételezhető, hogy ezen fehérjék legalább részben átfedő működésűek ezért, egy-egy *NimB* vagy *NimC* fehérje hiánya nem okoz nagy mértékű fenotípusos változást, így a hagyományos funkcióvesztéses mutánsok létrehozásán alapuló genetikai analízis ebben az esetben nem kecsegtetett sikerrel.

Irodalmi adatokból ismert, hogy a fagocitózis receptorok általában jelátviteli folyamatokban is részt vesznek, nagyrészt RNS inhibícióval létrehozott funkcióvesztéses mutánsaik pleiotróp fenotípust mutattak. A *Draper* fehérjéről, amelyet eredetileg apoptotikus sejtek receptoraként írtak le (Manaka és mtsai., 2004; Kuraishi és mtsai., 2009; MacDonald és mtsai., 2006) később azt is belátták, hogy baktériumok fagocitózisában (Hashimoto és mtsai., 2009; Cutteli és mtsai., 2008), az axonfejlődésben (Awasaki és mtsai., 2006), az autofágiában is szerepet játszik (McPhee és Baehrecke, 2010), azaz egyetlen fehérje hiánya számos különböző folyamatot érinthet. A *nimród* génklaszter által kódolt fehérjék receptor funkciójának tanulmányozására a fehérjék baktériumokkal létrehozott kölcsönhatásainak *in vitro* vizsgálata különösen alkalmas, mert egyszerre kizárja ki az esetleges átfedő működésű fehérjékből és a funkcióvesztéses mutánsok pleiotróp fenotípusaiból eredő bizonytalanságot.



Eredményeink szerint a NimC1 fehérje szerepet játszik a fagocitózis folyamatában, hiszen hiányában csökken a hemociták fagocitáló képessége és a NimC1 receptort ki nem fejező S2 sejtvonalon túltermeltetése növeli a fagocitózis hatékonyságát (Kurucz és mtsai., 2007). Annak megválaszolására, hogy a NimC1 fehérje a fagocitózis folyamatában receptorként funkcionál elsőként a hemociták által kifejezett NimC1 fehérje kölcsönhatását vizsgáltuk különböző Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal. A NimC1 fehérje baktériumsejtekkel kialakított kölcsönhatását indirekt immunfluoreszcenciás festődést követő áramlási citometriával mutattuk ki. Eredményeink szerint a NimC1 fehérje a Gram-negatív *E. coli*, *S. marcescens*, *X. campestris* és *P. aeruginosa*, illetve a Gram-pozitív *Bacillus cereus* var. *mycoides* baktériumokhoz kötődik, míg a Gram-pozitív *S. epidermidis*, *M. luteus* és *B. subtilis* baktériumokat nem köti. Eredményeink szerint a NimC1 fehérje egyaránt kötődik az erősen patogén *S. marcescens* és a *P. aeruginosa* baktériumokhoz melyek septicus sérülés esetén a *D. melanogaster* egyedek túlnyomó többségét egy napon belül elpusztítják (Lemaitre és Hoffmann 2007), és a gazdaszervezet számára veszélytelen *E. coli*-hoz.

Meglepőnek tűnhet, hogy a NimC1 a vizsgált Gram-negatív szervezeteket hasonlóan köti, míg a vizsgált Gram-pozitív szervezeteket különbözőképpen, ám a két mikróbacsoport Gram festés alapján történő elkülönítése nem eredményez homogén csoportokat, nem jelenthető ki egyértelműen, hogy a minden Gram-pozitív baktérium sejtfaala azonos szerkezetű és összetételű. Például ismert, hogy a Gram-negatív szervezetek peptidoglikánjában általában diamínopimelinsavat tartalmazó tetrapeptid keresztköti az N-acetil-glükózaminból és N-acetil-muraminsavból álló cukormolekulákat, míg a Gram-pozitív szervezetekben L-lizin tartalmú tetrapeptidek találhatóak meg. Ám ismert, hogy a *B. cereus* és a *B. subtilis* szervezetek, bár a Gram festés alapján Gram-pozitívnak számítanak, a peptidoglikánjukban diamínopimelinsavat tartalmazó peptidek találhatóak, így ebből a szempontból jobban hasonlítanak a Gram-negatív szervezetekre, mint a Gram-pozitív *S. epidermidisre* (Reith és Mayer 2011).

A NimC1 molekula ligandjának azonosítása érdekében baktériumsejteken kompetíciós kísérleteket végeztünk. Eredményeink szerint a hemocita lizátumhoz adott *E. coli* lizátum gátolja a NimC1 baktériumkötését, ám a baktérium falának két fő komponense, a peptidoglikán és a lipopoliszaccharid nem kompetál a NimC1 kötőhelyével, ami azt mutatja, hogy ezek a molekulák nem ligandjai a NimC1 fehérjének. A fehérjementesített baktérium lizátummal végzett kompetíciós kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy az nem gátolja a NimC1 baktériumkötését, amiből arra következtettünk, hogy a NimC1 ligandja fehérjetermészetű. Ez nem meglepő, hiszen a Draper

molekula egyik ligandja szintén egy fehérjemolekula, a Pretaporter, amely a sejtek felszínén az apoptózis során jelenik meg, míg az életképes sejtek felületén nem nyilvánul meg (Kuraishi és mtsai., 2009). Bár *D. melanogaster*-ben nem írtak még le olyan fagocitózis receptort, amely bakteriális fehérjét ismerne fel, gerincesekben több mintázatfelismerő receptort is ismerünk amelyek mikrobákból származó fehérje ligandot ismernek föl. Például az emberi TLR-2 receptor ligandja két, az *E. coli* sejtfalába integrálódó lipoprotein, a Lip 19 és a Lip12 (Lee és mtsai., 2002). Az emberi TLR-5 ligandja a bakteriális Flagellin (Gewirtz és mtsai., 2001), a TLR-4 fehérje egyik ligandja az *E. coli* FimH fehérjéje, amely a baktérium fimbriumainak alkotóeleme (Mossmann és mtsai., 2008), míg az emberi TLR-11 és TLR-12 receptorok a *Toxoplasma gondii* Profilin fehérjéjét ismerik fel (Koblansky és mtsai., 2013; Yarovinsky és mtsai., 2005).

A hemociták által kifejezett NimC1 molekula baktérium kötését a fehérjét specifikusan felismerő két monoklonális ellenanyag keverékével mutattuk ki. Mivel a NimA, NimB1-5 és NimC2-4 fehérjéket felismerő ellenanyagokkal nem rendelkezünk, e fehérjék baktériumkötési képességének vizsgálatához rekombináns fehérjeként fejeztettük ki a NimA, NimB1, NimB2, NimC1 és kontrollként a Draper fehérjék extracelluláris doménjét melyet egy FLAG epitóp taggal egészítettük ki. A FLAG epitópot specifikusan felismerő ellenanyag segítségével határoztuk meg a rekombináns fehérjék baktériumkötő képességét. Elsőként összehasonlítottuk a rekombináns NimC1 baktériumkötő képességét a NimC1 fehérjét felismerő P1a, P1b ellenanyagunk és a FLAG epitópot felismerő ellenanyag alkalmazásával. Azt találtuk, hogy a két rendszerben hasonló a rekombináns NimC1 *E. coli* baktériumhoz kötése, ezért a rekombináns fehérjék baktériumkötésének FLAG epitóp segítségével történő meghatározása megbízható mérőrendszernek bizonyult. Meghatároztuk a NimA, NimB1, NimB2 és a Draper fehérjék baktériumkötési képességét is, és azt tapasztaltuk, hogy mindegyik vizsgált fehérje kötődik *E. coli* baktériumokhoz, míg *S. epidermidis* baktériumsejtekhez kizárólag a NimB1 fehérje kötődött.

Ezekkel a vizsgálatainkkal kibővítettük az eddig ismert *Drosophila melanogaster* fagocitózis receptorok körét és a harmadik táblázatban újra összefoglaltuk a mikrobák felismerésében szerepet játszó ecetmuslica fehérjéket.

**3. táblázat: Az egyes *Drosophila melanogaster* fagocitózis receptorok ismert ligandjai (NA=nincs adat)**

Receptor	Gram-negatív baktérium	Gram-pozitív baktérium	gomba	apoptotikus sejt
dSR-CI	+	+	NA	NA
PGRP-LC	+	-	NA	NA
MCR/TEP6	-	NA	+	NA
TEPII	+	-	-	NA
TEPIII	-	+	-	NA
Peste	+	+	NA	NA
Croquemort	+	+	NA	+
Dscam	+	NA	NA	NA
NPC2a, 2e, 2h	+?	+?	NA	NA
NimC4/Simu	NA	NA	NA	+
Draper	+	+	NA	+
Eater	+	+	NA	NA
NimA	+	-	NA	NA
NimB1	+	+	NA	NA
NimB2	+	-	NA	NA
NimC1	+	-	NA	NA

Rekombináns fehérjék előállításával *in vitro* körülmények között vizsgáltuk meg a Nimród fehérjecsalád kiválasztott tagjainak baktériumkötési képességét. Eredményeink szerint a Nimród fehérje- és géncsalád tagjai a fagocitózisban receptor funkcióval bírnak. A transzmembrán doménnel rendelkező NimC fehérjék valószínűleg fagocitózis receptorként működnek, a mikrobák érzékelésében és a sejthez rögzítésében játszanak szerepet. A transzmembrán doménnel nem rendelkező NimB fehérjék a hemolimfában oldott opszoninként működhetnek, a mikrobák felszínéhez kötődve segítik azok bekebelezését.

Az általunk vizsgált Nimród fehérjék minden bizonnyal kisebb affinitással kötődnek az *E. coli* baktériumokhoz, mint az Eater fehérje, amelynek a baktériumkötéséről részletes adatokkal rendelkezünk (Kocks és Chung 2011). Ennek a magyarázata az lehet, hogy evolúciósan előnyösnek bizonyulhat, ha egy szervezet több alacsony affinitású receptorral ismeri fel a baktériumsejteket, mivel a ligand, ez esetben a baktérium, a gazdaszervezetnél jóval gyorsabban szaporodik. Amennyiben egyetlen receptor felelős a mikroba felismeréséért, könnyebben szaporodnak el olyan mutánsok, amelyek a receptor ligandjának egy eltérő változatát fejezik ki, így könnyen elkerülhetik

a gazdaszervezet immunválaszát. Amennyiben a mikróbát több különböző, kis affinitású receptorfehérje ismeri fel, egyetlen fehérje ligandjának megváltozása nem juttatja döntő előnyhöz a baktériumot a gazdaszervezettel szemben és ezeknek a mutánsoknak az életképessége kevésbé különbözik a vad típusú egyedekétől, ezért egy ilyen mutáció sokkal nehezebben rögzül a populációban. Ez lehet a magyarázata annak, hogy miért kódol a *D. melanogaster* genom öt *nimB* és négy *nimC* gént, az *eater* mellett, hiszen könnyen lehetséges, hogy az evolúció folyamán előnyösebb, ha a szervezet a kórokozókat több alacsony affinitású receptorral ismeri fel, mintha egyetlen magas affinitású receptorral szál szembe a gazdaszervezetet veszélyeztető mikroorganizmusokkal.

## **6. Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kurucz Évának, munkacsoportunk vezetőjének Dr. Andó Istvánnak, munkatársaimnak, Dr. Bajusz Izabellának, Pintér Lajosnak, Dr. Márkus Róbertnek, Dr. Lukacsovich Tamásnak, Dr. Cinege Gyöngyinek, Dr. Honti Viktornak, Csordás Gábornak, Váczi Balázsnak, Dr. Laurinyecz Barbarának, Kari Beátának. Köszönöm a munkáját a házivédés opponenseinek Dr. Jankovics Ferencnek és Dr. Vizler Csabának. Tanácsaival, iránymutatásaival rengeteget segített Dr. Udvardy Andor, Dr. Mihály József, Dr. Sipos László, Dr. Gyurkovics Henrik, Dr. Blaszó Péter és a Genetikai Intézet közösségének minden tagja.

Köszönöm a támogatásukat, gondoskodásukat szüleimnek, Dr. Zsámboki Jánosnak és Dr. Fórizs Annának, testvéremnek, Dr. Zsámboki Annának, feleségemnek, Németh Erikának és kisfiamnak, Zsámboki Botondnak.

## 7. Hivatkozott közlemények

- Asha H, Nagy I, Kovács G, Stetson D, Andó I, Dearolf CR (2003) Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* 163(1), 203-15.
- 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(6), 855-67.
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2,1-11
- Bhutkar, A., Schaeffer, S.W., Russo, S.M., Xu, M., Smith, T.F. and Gelbart, W.M., (2008) Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 *Drosophila* genomes. *Genetics* 179, 1657-1680.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S., 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294, 1351-1362.
- 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.
- Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nuñez G, Inohara N (2003) An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature Immunology* 4(7), 702-7.
- Chen L, 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. *Journal of Bacteriology* 175(9), 2534-40.
- Chung YA, Kocks C (2011) Recognition of pathogenic microbes by the *Drosophila* phagocytic pattern recognition receptor Eater. *Journal of Biological Chemistry* 286(30), 26524-32.
- Cuttell, L, Vaughan A, Silva E, Escaron CJ, Lavine M, Van Goethem E, Eid JP, Quirin M, Franc NC (2008) Undertaker, a *Drosophila* junctophilin, links Draper-mediated phagocytosis and calcium homeostasis. *Cell* 135:524-534.
- Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U (2003) Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell.* 5:673-90.

Gateff E., Malignant neoplasms of the hematopoietic system in three mutants of *Drosophila melanogaster*. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1977 52:81-3.

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

Goto, A., Kadowaki, T., Kitagawa, Y., 2003. *Drosophila* hemolymph gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev. Biol.* 264, 582-591.

Hamon Y, Trompier D, Ma Z, Venegas V, Pophillat M, et al (2006) Cooperation between Engulfment Receptors: The Case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS ONE* 1(1): e120. doi:10.1371/journal.pone.0000120

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(11), 7451-60

Haskins KA, Russell JF, Gaddis N, Dressman HK, Aballay A (2008) Unfolded protein response genes regulated by CED-1 are required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Developmental cell* 15(1), 87-97.

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(2), 221-232

Herboso L., Talamillo A., Pérez C., Barrio R., 2011. Expression of the Scavenger Receptor Class B type I (SR-BI) family in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 603-611

Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ (2000) Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *Journal of Immunology* 165(2), 618-22.

Honti V, Kurucz E, Csordás G, Laurinyecz B, Márkus R, Andó I (2009) In vivo detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunology Letters* 126(1-2), 83-4.

Jin X, Ha TS, Smith DP. 2008. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *PNAS* 105:10996-1001.

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.* 38:119-30.

Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., Stehle, T., Hoffmann, J.A., Reichhart, J., Ferrandon, D., Rämét, M., Ezekowitz, R.A.B., 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., Edström, J.E., 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.

Kuan S, Rust K, Crouch E (1992) Interactions of Surfactant Protein D with Bacterial Lipopolysaccharides. *The Journal of Clinical Investigation* 90, 97-106

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(24), 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(3), 498-509.

Kurucz E, Váci 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 Biologica Hungarica* 58 Suppl, 95-111

Kurucz E, Zettervall CJ, Sinka R, Vilmos P, Pivarsci A, Ekengren S, Hegedüs Z, Ando I, Hultmark D (2003) Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *PNAS* 100(5), 2622-7.

Kurucz, E., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradzky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E., Zettervall, C.J., Hultmark, D., Andó, I., (2007b) Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr. Biol.* 17, 649-54.

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, Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.* 25:697-743.



MacDonald JM, Beach MG, Porpiglia E, Sheehan AE, Watts RJ, Freeman MR (2006) The *Drosophila* cell corpse engulfment receptor Draper mediates glial clearance of severed axons. *Neuron* 50(6), 869-81.

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.

Markovic I, Pulyaeva H, Sokoloff A, Chernomordik LV (1998) Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates. *Journal of Cell Biology* 143(5), 1155-66.

McPhee CK, Baehrecke EH (2010) The engulfment receptor Draper is required for autophagy during cell death. *Autophagy*. 6(8), 1192-3.

Means TK, Mylonakis E, Tampakakis E, Colvin RA, Seung E, Puckett L, Tai MF, Stewart CR, Pukkila-Worley R, Hickman SE, Moore KJ, Calderwood SB, Hacohen N, Luster AD, El Khoury J (2009) Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *The Journal of Experimental medicine* 206(3), 637-53.

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.

Pak WL, Shino S, Leung HT. 2012. PDA (prolonged depolarizing afterpotential)-defective mutants: the story of nina's and ina's--pinta and santa maria, too. *J Neurogenet.* 26:216-37.

Pearson A., Lux A., Krieger M., 1995. Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 92: 4056-4060

Peiser L., Mukhopadhyay S., Gordon S., 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Op. Immun.* 14, 123-128.

Qimron U, Marintcheva B, Tabor S, Richardson CC (2006) Genomewide screens for *Escherichia coli* genes affecting growth of T7 bacteriophage. *PNAS* 103(50), 19039-44.

Reit J, Mayer C (2011) Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92:1-11

Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y, Yao X. 2008. DOG 1.0: Illustrator of Protein Domain Structures. *Cell Research* 19:271-273.

Shi, X.Z., Zhong, X., Yu, X.Q., 2012. *Drosophila melanogaster* NPC2 proteins bind bacterial cell wall components and may function in immune signal pathways. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 545-56.

Somogyi, K, Sipos B, Péntzes Z, Andó I (2010) A conserved gene cluster as a putative functional unit in insect innate immunity. *FEBS Letters* 584, 4375-4378

Somogyi, K., Sipos, B., Péntzes, Z., Kurucz, E., Zsámboki, J., Hultmark, D., Andó, I., 2008. Evolution of genes and repeats in the Nimrod superfamily. *Molecular Biology and Evolution* 25, 2337-2347.

Stroschein-Stevenson, S.L., Foley, E., O'Farrell, P.H., Johnson, A.D., 2006. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol.* 4, e4

Stuart, L.M., Deng, J., Silver, J.M., Takahashi, K., Tseng, A.A., Hennessy, E.J., Ezekowitz, R.A., Moore, K.J., 2005a. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* 170, 477-485.

Stuart, L.M., Ezekowitz, R.A., 2005b. Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity* 22, 539-550.

Stuart, L.M., Ezekowitz, R.A., 2008. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol.* 2, 131-141.

Voolstra O, Kiefer C, Hoehne M, Welsch R, Vogt K, von Lintig J. 2006. The *Drosophila* class B scavenger receptor NinaD-I is a cell surface receptor mediating carotenoid transport for visual chromophore synthesis. *Biochemistry.* 45:13429-37.

Watson, F.L., Püttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I., Schmucker, D., 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* 309, 1874-1878.

Werner T, Liu G, Kang L, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D (2000) A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 97: 13772-13777

Williams MJ (2007) *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol.* 178:4711-6.

Wu HH, Bellmunt E, Scheib JL, Venegas V, Burkert C, Reichardt LF, Zhou Z, Fariñas I, Carter BD (2009) Glial precursors clear sensory neuron corpses during development via Jedi-1, an engulfment receptor. *Nature Neuroscience* 12(12), 1534-41

Wu HH, Bellmunt E, Scheib JL, Venegas V, Burkert C, Reichardt LF, Zhou Z, Fariñas I, Carter BD. Glial precursors clear sensory neuron corpses during development via Jedi-1, an engulfment receptor. *Nat Neurosci.* 2009 12:1534-41.

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*. 308:1626-9.

Yu X, Lu N, Zhou Z (2008) Phagocytic receptor CED-1 initiates a signaling pathway for degrading engulfed apoptotic cells. *PLOS biology* 6(3), e61

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

Zhou Z, Hartwig E, Horvitz HR (2001) CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104(1), 43-56.

## 8. Magyar nyelvű összefoglaló

A fagocitózis folyamata a törzsfejlődés során már az egysejtűekben kialakult, ahol a táplálkozást szolgálja, többsejtű szervezetekben az egyedfejlődés során történő szöveti átrendeződésekben, valamint a kórokozó mikroorganizmusok elleni védekezésben játszik kulcsszerepet. A fagociták, a veleszületett immunválasz végrehajtó sejtjei, sejt felszíni receptoraik segítségével érzékelik a környezetükben megjelenő testidegen, illetve megváltozott saját struktúrákat. A receptorok ligand-kötése a fagocita sejtekben olyan jelátviteli utakat aktivál, melynek során az aktin sejt váz átrendeződésével a mikroorganizmusokat körülölelő pszeudopódiumok képződnek, majd az így bekebelezett részecskéket a fagoszómákban a hidrolitikus enzimek lebontják.

A fagocitózis molekuláris folyamatainak vizsgálatához a *Drosophila melanogaster*-t választottuk modellszervezetnek, mivel az ecetmuslica kizárólag a veleszületett immunitás folyamataival biztosítja szervezete homeosztázisát. A *Drosophila* fagocita sejtjei, a plazmatociták az egyedfejlődés során már az embrióban kialakulnak, itt elsősorban az apoptózissal elpusztuló sejtek eltávolításában, ezen keresztül az idegrendszer fejlődésében játszanak szerepet. A plazmatociták a lárvális és a felnőtt egyedekben az immunvédekezést szolgálva, a szervezetbe jutó testidegen mikroorganizmusok felismerését és bekebelezését végzik.

Korábban a *Drosophila melanogaster* fagocita sejtjein egy transzmembrán fehérjét azonosítottunk, melynek kódoló génjét *nimród*-nak (*nimC1*) neveztük el. A *nimC1* gén szekvenciája alapján prediktált fehérje a transzmembrán fehérjékre jellemző szerkezetű, szingál peptiddel, extracelluláris, transzmembrán és intracelluláris régiókkal rendelkezik. A NimC1 fehérje extracelluláris régiójában egy új típusú EGF-receptor domént azonosítottunk, mely az állatvilágban általánosan elterjedt EGF-receptor doménhez képest szigorúbb konszenzusszekvenciával írható le (CxPxCxxxCxNGxCxxPxxCxCxxGY). Ezt az új típusú domént NIM doménnek neveztük el.

A NimC1 fehérje funkciójának vizsgálatát funkcióvesztéses és funkciónyeréses genetikai tesztekben végeztük el. A funkcióvesztéses vizsgálatokban RNS inhibíció módszerrel csökkentettük a NimC1 fehérje kifejeződését, és ezzel együtt a hemociták *Staphylococcus aureus* baktérium fagocitózisának jelentős csökkenését tapasztaltuk. A funkciónyerési vizsgálathoz a NimC1 fehérjét a NimC1 fehérjét nem expresszáló *Drosophila melanogaster* eredetű Schneider-2 sejt vonalban túltermeltettük. A NimC1 molekulának a Schneider-2 sejtek plazmamembránjában történő

megjelenésével egyidejűleg azt tapasztaltuk, hogy a *S. aureus* és *E. coli* baktériumokat fagocitáló képességük is megnövekedett.

A *Drosophila melanogaster* genomjában további tizenegy olyan gént azonosítottunk, amelyek a NimC1 fehérjéhez hasonló szerkezetű fehérjéket kódolnak. A NimC1 szerkezeti homológok mindegyike tartalmaz legalább egy NIM domént, valamint az N-terminális NIM domént megelőző CCxGY motívumot. A NimC1 homológokat kódoló gének a *Drosophila melanogaster* második kromoszómáján, a *nimC1* gén közvetlen genomi környezetében, géncsaládot (*nimród* géncsalád) alkotva helyezkednek el. A *nimród* géncsalád által kódolt fehérjéket szerkezetük alapján három kategóriába soroltuk. A NimA fehérje egyetlen NIM domént tartalmazó transzmembrán molekula. A NimB típusú fehérjék transzmembrán régióval nem rendelkező, 1-7 NIM domént tartalmazó molekulák, a NimC típusú fehérjék 2-16 NIM domént tartalmazó transzmembrán fehérjék.

Az *ecetmuslica* genom további NIM doménnel rendelkező fehérjéket is kódol: Az embrionális makrofágok apoptózisában szerepet játszó Draper fehérjét, valamint a fagocita sejtek baktérium kötésében résztvevő Eater molekulát.

A *nimród* géncsalád kifejeződését reverz transzkripcióhoz kapcsolt polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy, a *nimA*, *nimB1*, *nimB2*, *nimB3*, *nimB4*, *nimB5*, *nimC1*, *nimC2*, *nimC3* és *nimC4* génekről mindhárom lárva stádiumban az imágókban, valamint a harmadik stádiumú lárvák vérsejtjeiben szintetizálódik RNS molekula, a *nimA* gén kivételével, amely a harmadik stádiumú lárvák hemocitáiban nem fejeződik ki.

A NimC1 fehérje funkcióját baktériumkötési kísérletekkel vizsgáltuk. Hővel előlt baktériumsejteket fluorescein isothiocyanate-tal (FITC) jelöltük, majd a NimC1 fehérjét kifejező hemociták lizátumával kezeltük. A FITC-el jelzett baktériumokhoz kötődő NimC1 molekulát indirekt immunfluoreszcencia módszerrel távoli vörös tartományban emittáló fluoreszcens festékkel megjelöltük és áramlási citometriával vizsgáltuk. Eredményeink szerint a NimC1 specifikus ellenanyaggal festett *Escherichia coli* baktériumok fluoreszcencia intenzitása a távoli vörös tartományban több mint kétszeresére emelkedett a kontrollként használt immunglobulin izotípus kontroll ellenanyaggal festett baktériumsejtekéhez képest, ami azt jelenti, hogy a NimC1 fehérje kötődik az *E. coli* baktériumsejtekhez. Vizsgálataink szerint a NimC1 fehérje az *E. coli* baktériumon kívül kötődik még a *Serratia marcescens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negatív és a *Bacillus cereus* var. *mycoides* Gram-pozitív baktériumokhoz, viszont a Gram-pozitív *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* és *Bacillus subtilis* baktériumokat nem köti.

Az *E. coli* baktériumsejteken a NimC1 fehérjét kötő molekulát kompetíciós kísérletekkel kívántuk azonosítani. A NimC1 molekulát kifejező hemociták lizátumához adott lipopoliszaccharid és peptidoglikán nem befolyásolja a NimC1 fehérjének az *E. coli* baktériumhoz történő kötődését, így ezek a molekulák nem lehetnek a NimC1 receptor ligandjai.

További vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az *E. coli* sejtekből készült lizátum valamely komponense erősen gátolja a NimC1 molekulának az *E. coli* sejtekhez történő kötődését. Mivel a fenolprecipitálással illetve Proteináz K enzimkezeléssel fehérjementesített *E. coli* lizátum már nem gátolta a NimC1 baktériumkötését, ebből a kísérletből arra következtettünk, hogy az *E. coli* sejteken megnyilvánuló, NimC1-t kötő molekula fehérje természetű.

A *nimród* géncsalád által kódolt fehérjék közül a NimA, NimB1, NimB2 és NimC1 fehérjék extracelluláris doménjét FLAG epitóppal ellátott rekombináns fehérjeként fejeztettük ki baculovírus expressziós rendszerben. A rekombináns fehérjéket termelő Sf9 lepke sejt vonal lizátumával baktériumkötési kísérletet végeztünk, elsődleges ellenanyagként a FLAG epitópot felismerő monoklonális ellenanyagot használtunk, majd a baktériumsejtek fluoreszcenciájának intenzitását áramlási citometriával határoztuk meg. Pozitív kontrollként a *D. melanogaster* Draper molekulát, negatív kontrollként egy, a hemocitákon kifejeződő, NIM domént nem tartalmazó fehérjét, az Atilla molekulát fejeztettük ki. Eredményeink szerint a rekombináns NimA, NimB1, NimB2, NimC1, és Draper molekulák kötődtek *E. coli* baktériumokhoz, azonban a *S. epidermidis* baktériumsejtekhez kizárólag a NimB1 kötődött.

## 9. Summary

The process of phagocytosis has evolved early in life, in unicellular eukaryotic organisms, where it is utilized for feeding. In multicellular organisms the main immune function of phagocytosis is the defence against pathogenic microbes and the elimination of apoptotic cells during histological reorganizations through ontogenesis. Professional phagocytes, the effector cells of the innate immune response sense the foreign or altered self particles appearing in their environment by their cell surface receptors. The ligand binding of these receptors induces signal transduction pathways which reorganize the actin cytoskeleton, and the cell grows pseudopodia, to engulf the target particle, which is lysed in the hydrolytic enzymes of the phagosome.

We chose *Drosophila melanogaster* to study the molecular processes of phagocytosis, because the fruit fly relies only on innate immune processes to maintain its homeostasis. The phagocytes of *Drosophila*, the plasmatocytes differentiate early in ontogenesis, in the embryo, where their main function is the elimination of apoptotic cells in the developing nervous system. Plasmatocytes recognize and engulf foreign particles in the larva and in the adult.

Previously we have identified a transmembrane protein on the plasmatocytes of *D. melanogaster*, which we named Nimród and its coding gene *nimród* (*nimC1*). Inferring from the sequence of the gene the predicted NimC1 protein shows a domain structure typical of a transmembrane protein, harboring a signal peptide, extracellular, transmembrane and intracellular regions. In the extracellular domain of NimC1 we identified a new subclass of the EGF-receptor domain, which can be characterized with the consensus sequence CxPxCxxxCxNGxCxxPxxCx CxxGY, we dubbed NIM domain.

We studied the function of the NimC1 protein in loss-of-function and gain-of-function genetic tests. In the loss-of-function studies we inhibited the expression of NimC1 by RNAi, and by decreasing the amount of NimC1 on the surface of hemocytes, their *Staphylococcus aureus* phagocytic capacity also decreased. For the gain-of-function studies we expressed the NimC1 protein in the Schneider-2 cell line which does not express NimC1. The occurrence of NimC1 in the membrane of Schneider-2 cells the *S. aureus* and *Escherichia coli* phagocytic capacity of the cells increased.

We identified eleven genes in the *D. melanogaster* genome coding proteins with similar domain structure. All eleven proteins harbor at least one NIM domain, and a CCxGY motif preceding the first NIM domain. Nine from these eleven genes are located in the direct genomic

vicinity of the *nimC1* gene, constituting the *nimród* gene family located on the second chromosome. The proteins encoded by the *nimród* gene family can be divided into three different types. The NimA protein harbors a single NIM domain and a transmembrane domain. The NimB-type proteins harbor 1-7 NIM domains, but lack a transmembrane domain, and the NimC-type proteins harbor 2-16 NIM domains and a transmembrane domain. The fruit fly genome encodes two NIM domain containing proteins, the Draper which plays a role in the phagocytosis of apoptotic cells and the Eater protein involved in bacterium binding.

We studied the expression of the *nimród* gene family by reverse transcription coupled polymerase chain reaction. We found that the *nimA*, *nimB1*, *nimB2*, *nimB3*, *nimB4*, *nimB5*, *nimC1*, *nimC2*, *nimC3* and *nimC4* genes are transcribed in all three larval stages and in the imago. In the isolated hemocytes of third instar larvae *nimB1*, *nimB2*, *nimB3*, *nimB4*, *nimB5*, *nimC1*, *nimC2*, *nimC3* and *nimC4* genes show transcriptional activity, while *nimA* is not expressed.

To study the function of the NimC1 protein we conducted bacterium binding experiments. Heat inactivated, fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled bacterial cells were incubated in the lysate of hemocytes expressing NimC1. The NimC1 molecule forming a complex with the labelled bacterial cells were stained by indirect immunofluorescence in the far-red spectrum and measured by flow cytometry. According to our results the far-red fluorescence of the *E. coli* cells treated with hemocyte lysate and stained with NimC1-specific antibodies increased more than twofold compared to the control particles stained with isotype specific control antibodies, showing that the NimC1 protein binds *E. coli* bacteria. The NimC1 protein binds *Serratia marcescens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negative and the *Bacillus cereus* var. *mycoides* Gram-positive bacteria, while does not show binding to Gram-positive *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis*.

We intended to identify the ligand of NimC1 on bacterial cells by competition experiments. We supplemented the lysate of NimC1 expressing hemocytes with lipopolysaccharide and peptidoglycan, neither of which competed for NimC1 binding, showing that neither of them serves as the ligand of NimC1.

In our experiments we found that the lysate of *E. coli* cells effectively inhibits NimC1 binding. As the phenol precipitated and Proteinase K degraded protein-free *E. coli* lysates do not inhibit NimC1 binding, we concluded that the ligand of NimC1 is a protein.

We expressed the extracellular domains of NimA, NimB1, NimB2 and NimC1 in a baculovirus-based eukaryotic expression system as recombinant proteins with a FLAG epitope tag.



We conducted bacterium binding experiments with the lysate of the lepidopteran Sf9 cell line expressing the recombinant proteins, using the monoclonal antibody recognising the FLAG epitope as the primary antibody, and measured the fluorescence intensity of the bacteria with flow cytometry. As a positive control, we expressed the Draper protein, as a negative control, we expressed the Atila protein, which is expressed on the non-phagocytic lamellocytes and does not contain NIM domains. According to our results the recombinant NimA, NimB1, NimB2, NimC1, and Draper bind *E. coli* bacteria, while only NimB1 bound *S. epidermidis*.