

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

PhD téziszfüzet

**Szerző:
Zsámboki János**

**Témavezető:
Dr. Kurucz Éva**

**Biológia doktori iskola
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet
SZTE TTIK**

**2013
Szeged**

1. Bevezetés

A fagocitózis folyamata a törzsfajlás 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 fagocitózis receptorok ligandkötése a 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 folyamatainak molekuláris szintű 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.

Munkacsoportunkban a *D. melanogaster* hemocitáit felismerő monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő. Az első, kizárólag a plazmatocitákra jellemző transzmembrán fehérje a P1, vagy NimC1, amelyet monoklonális ellenanyagok segítségével azonosítottunk. 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, egy géncsaládot (*nimród* géncsalád) alkotva helyezkednek el. A *nimród* gének 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.

2. Célkitűzések

A P1 antigén tömegspektrometriai elemzése során kapott peptid egy transzmembrán fehérjét kódoló gént azonosított, amelyet *nimC1* génnek neveztünk el. Funkcióvesztéses és funkciónyeréses vizsgálatokkal azt kívántuk igazolni, hogy az ellenanyag által felismert P1 antigént valóban a *nimC1* gén kódolja.

Az *in silico* módszerrel azonosított *nimród* génklasztert alkotó *nimród* gének transzkripciós aktivitásának meghatározásával a további funkcionális vizsgálatokból ki kívántuk zárni azokat a génklaszterben esetlegesen előforduló pszeudogéneket, amelyekről nem képződik messenger RNS.

Azonosítani kívántuk a NimC1 fehérje fagocitózisban betöltött funkcióját. Baktériumkötési kísérletekkel kívántuk meghatározni, 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 vizsgáltuk azok baktériumkötési kapacitását.

3. Módszerek

-A *nimród* gének kifejeződését reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk.

-A *nimC1* gén funkcióvesztéses vizsgálataihoz a *nimC1* gén egy szakaszát mindkét orientációban tartalmazó, indukálható promotérral rendelkező UAS-*nimC1*-IR konstruktot állítottunk elő.

-A *nimC1* gén funkciónyeréses vizsgálataihoz a *nimC1* gént indukálható promotérral rendelkező expressziós vektorba klónoztuk, majd *D. melanogaster* eredetű Schneider-2 sejtvonalonban fejeztettük ki.

-A NimC1 fehérje működését *in vitro* baktériumkötési esszével vizsgáltuk, amelyben indirekt immunfluoreszcenciával jelöltük meg, majd áramlási citometriával tettük láthatóvá a távoli vörös tartományban a fluoreszcensen zölden jelölt baktériumsejtekhez kötődő NimC1 fehérjét.

-A Nimród fehérjék baktériumkötésének vizsgálatához a NimC1, NimA, NimB1, NimB2, Draper fehérjéket rekombináns fehérjéket termeltettük meg eukarióta expressziós rendszerben. A rekombináns fehérjéket FLAG taggel láttuk el, így a FLAG epitópot felismerő ellenanyag segítségével végeztük el a baktériumkötési esszét.

4. Eredmények

D. melanogaster-ben azonosítottuk az első fagocita sejt specifikusan megnyilvánuló P1 transzmembrán fehérjét. A P1 antigént monoklonális ellenanyagok segítségével immunprecipitálással izoláltuk, majd tömegspektrometriai elemzéssel egy olyan peptidet azonosítottunk, amely kizárólag a *D. melanogaster* CG8942 prediktált gén termékében található meg és ezt a gént *nimród*-nak (*nimC1*) neveztük el. A *nimC1* gént RNS inhibíció módszerrel csendesítve a fagocita sejteken a P1 molekula drámai csökkenése, továbbá a *nimC1* génnek a P1 fehérjét nem expresszáló Schneider-2 sejtvonalon történő kifejeztetése hatására a sejtek felszínén megjelenő P1 molekula azt jelenti, hogy a P1 antigént valóban a *nimC1* gén kódolja.

A *nimC1* gén szekvenciája alapján a NimC1 fehérje prediktált szerkezete a transzmembrán fehérjékre jellemző, 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 (CxPxCxxxCxNGxCxxPxxCxGxGY). Ezt az új típusú domént NIM doménnek neveztük el.

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 véresejtjeiben szintetizálódik RNS molekula, a *nimA* gén kivételével, amely a harmadik stádiumú lárvák hemocitáiban nem fejeződik ki.

A NimC1 fehérje vizsgálatát funkcióvesztéses és funkciónyereses 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 funkciónyeresi vizsgálathoz a NimC1 fehérjét nem expresszáló *D. melanogaster* eredetű Schneider-2 sejtvonalon túltermeltettük a NimC1-t. 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 NimC1 fehérje fagocitózisban betöltött funkcióját baktériumkötési kísérletekkel vizsgáltuk. Eredményeink 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 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, viszont a fehérjementesített *E. coli* lizátum nem gátolta a NimC1 baktériumkötését, így arra következtettünk, hogy az *E. coli* sejteken megnyilvánuló, a NimC1-t kötő molekula fehérje természetű.

A *nimród* géncsalád által kódolt további fehérjék baktériumkötési képességét is megvizsgáltuk. A NimA, NimB1, NimB2 és NimC1 extracelluláris doménjét FLAG epitóppal ellátott rekombináns fehérjeként fejeztettük ki baculovírus expressziós rendszerben. Eredményeink szerint a rekombináns NimA, NimB1, NimB2, NimC1, hasonlóan a pozitív kontrollként használt Draper molekulához kötődtek az *E. coli* baktériumhoz, azonban a *S. epidermidis* baktériumsejteket kizárólag a NimB1 köti.

5. Összefoglalás

- Azonosítottuk a NimC1 fehérjét, mint a P1 antigént.
- Megvizsgáltuk a nimród génklaszter tagjainak kifejeződését. A *nimB* és *nimC* gének kifejeződnek hemocitákban, a *nimA* gén a lárva valamely más szövetében fejeződik ki, hemocitákban nem.
- A NimC1 fehérje szerepet játszik a baktériumok fagocitózisában.
- A NimC1 fehérje baktériumsejtekhez kötődik.
- A NimC1 fehérje ligandja fehérjetermészetű.
- A rekombináns NimA, NimB1, NimB2, NimC1 és Draper fehérjék kötődnek Gram-negatív *E. coli* baktériumokhoz, ám Gram-pozitív *S. epidermidis* baktériumokhoz kizárólag a NimB2.

6. Közlemények

A dolgozat alapját képező közlemények:

Zsámboki János, Csordás Gábor, Honti Viktor, Pintér Lajos, Bajusz Izabella, Galgóczy László, Andó István, Kurucz Éva (2013) *Drosophila* Nimrod proteins bind bacteria. Central European Journal of Biology. 8: 633-645

Kurucz Éva, Márkus Róbert, Zsámboki János, Folkl-Medzihradzky Katalin, Darula Zsuzsanna, Vilmos Péter, Udvardy Andor, Krausz Ildikó, Lukacsovich Tamás, Gateff Elisabeth, Zettervall Carl-Johan, Hultmark Dan, Andó István (2007) Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila melanogaster*. Current Biology. 17: 1-6

Egyéb közlemények:

Andó István, Laurinyecz Barbara, Nagy István, Márkus Róbert, Florentina Rus, Váczi Balázs, Zsámboki János, Fehér László, Elisabeth Gateff, Dan Hultmark, Kurucz Éva (2003) Ősi örökségünk: a veleszületett immunitás A *Drosophila* sejtes immunitása. Magyar Immunológia 4: 39-46.

Andó István, Laurinyecz Barbara, Márkus Róbert, Florentina Rus, Váczi Balázs, Zsámboki János, Kurucz Éva (2004) Ősi örökségünk, a veleszületett immunitás: A *Drosophila* sejtes immunitása; Magyar Tudomány. 111: 1080-1089.

Kurucz Éva, Váczi Balázs, Márkus Róbert, Laurinyecz Barbara, Vilmos Péter, Zsámboki János, Csorba Kinga, Gateff Elisabeth, Hultmark Dan, Andó István (2007) Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. Acta Biologica Hungarica. 58: 95-111

Somogyi Kálmán, Sipos Botond, Péntes Zsolt, Kurucz Éva, Zsámboki János, Hultmark Dan, Andó István (2008) Evolution of genes and repeats in the Nimrod superfamily. Molecular Biology and Evolution 25: 2337-47

7. 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. Főrizs Annának, testvéremnek, Dr. Zsámboki Annának, feleségemnek, Németh Erikának és kisfiamnak, Zsámboki Botondnak.

8. Felelős szerzői nyilatkozat

Alulírott, mint felelős szerző nyilatkozom, hogy a következő tanulmányban

Kurucz Éva, Márkus Róbert, Zsámboki János, Folkl-Medzihradzsky Katalin, Darula Zsuzsanna, Vilmos Péter, Udvardy Andor, Krausz Ildikó, Lukacsovich Tamás, Gateff Elisabeth, Zettervall Carl-Johan, Hultmark Dan, Andó István (2007) Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*. 17: 1-6

szereplő és közösen publikált eredményekben Zsámboki János jelölt szerepe meghatározó fontosságú. A publikált eredményeket eddig más nem használta fokozatszerzésre és a jövőben sem adok ki ki hasonló tartalmú nyilatkozatot.

.....
Dr. Andó István