



Doktori értekezés tézisei

EMÉSZTŐRENDSZERI DISZFUNKCIÓ ÉS  
HUMORÁLIS IMMUNVÁLASZ KAPCSOLATA  
IV-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN MUTÁCIÓKKAL  
*DROSOPHILÁBAN*

**Kiss Márton**

Témavezető: Dr. Mink Mátyás, egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola  
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Genetikai Tanszék  
2016

## Bevezetés

Az extracelluláris mátrix (ECM) a sejten kívüli tér makromolekuláinak rendezett hálózata, amely a sejtek migrációját, fejlődését és túlélését biztosítja, kapcsolatot teremt a sejtek között, szövetté szervezi azokat, és részt vesz a kommunikációban. A többsejtű állati lét szinte elképzelhetetlen lenne nélküle. Az ECM fajoként és szervenként rengeteg különböző molekulából állhat, felépítésében mégis oroszlánrészt vállalnak a kollagén szupercsalád tagjai. Ezeken kívül megtalálhatóak benne a lamininek, a proteoglikánok, a glükózaminoglikánok, a fibronektin, a perlekán, a nidogén és gerincesekben az elasztin is.

Az ECM egy speciális változata a bazális membrán, ami egyfajta határoló funkciót lát el. Szintézise általában az általa elválasztott két térrész sejtjei (pl. epitel, kötőszövet) együttes erőfeszítésének eredménye, muslicában azonban elsősorban a hemociták termelik. A bazális membrán két nagyobb egységre bontható: a bazális laminára, és a retikuláris laminára. A két réteget VII-es típusú kollagén kapcsolja össze.

A kollagén egy nagyon érdekes fehérje (Pauling és mtsai, 1951). A kollagén szupercsaládot kilenc, különböző molekuláris szerkezetű és különböző funkciókat ellátó kollagén család alkotja. A kollagén molekula az N-terminális 7S doménből, a kollagén alegységből és a C-terminális NC1 doménből épül fel. A kollagén trimer összeszerelődése során három kollagén molekula, azaz három fehérjeszál alkot egy protomert. Részletes vizsgálatok kimutatták, hogy a triplahélix összeszerelődését a C-terminális NC1 domén irányítja. Az említett terminális domének feladata az egyes triplahelikális protomerek összekapcsolása. Az így kialakuló hálózat mintázata a drótkerítésre emlékeztet. Az élővilágban legelterjedtebb az  $(A1)_2(A2)$  -  $(A1)_2(A2)$  hálózat.

A *Drosophila melanogaster* IV-es típusú kollagénjeit a *col4a1* és a *col4a2* gén kódolja. A vizsgált törzsek a *col4a1* gén domináns, meleg- vagy hidegérzékeny (dominant temperature sensitive, DTS) alléljeit hordozzák. A mutánsokat etil-metán-szulfonát (EMS) mutagenezissel állították elő. A létrehozott

*l(2)25Ca DTS/CyRoi* (meleg-) és az *l(2)25Ca DCS/CyRoi* (hidegérzékeny) heterozigóták, amik magas, illetve alacsony hőmérsékletre érzékenyek, restriktív körülmények között elpusztulnak. A *DTS/DTS* homozigóták még permisszív körülmények között sem életképesek, embriotétálisak.

A kollagének poszt-transzlációs módosításában a lizin-hidroxilázok, a prolin-hidroxilázok, a lizil-oxidázok, a mátrix-metalloproteázok és a peroxidazin jut fontos szerephez.

A IV-es típusú kollagén betegsége az Alport-szindróma, ami hematuriával jár, tünetei továbbá a vakság és a sükettség. A Goodpasture-szindróma a vese és a tüdő COL4A3 láncának autoimmun betegsége. A HANAC-szindróma „tekervényes” retinális artériák, agyi aneurizmák, a vese szöveteinek abnormális fejlődésére visszavezethető vérvelés, ciszták és izomgörcsök „képében” jelentkezik. A Walker-Warburg-szindróma egy szemfejlődési rendellenességekkel, izomdisztrófiával és idegsejt migrációs problémákkal jelentkező recesszív genetikai betegség. Amennyiben az érfal vérnyomással szembeni ellenállása meggyengül, az a születés körüli

időszakban elszenvedett agyvérzésre és porenkefáliára hajlamosít. X-hez kötött süketiséget okozhat a *COL4A6* gén némelyik mutációja. Az ASD (anterior segment dysgenesis) egy több betegséget magában foglaló megnevezés, aminek tünetei a szemfejlődési rendellenességek okozta zöldhályog és látásvesztés.

A közelmúltban leírtuk, hogy a *col4a1* IV-es típusú kollagén gén kondicionális mutációját hordozó *Drosophila melanogaster* törzsben a sejtek alapmembrántól való elválása azok nagymértékű pusztulását okozza a közös petevezető harántesíkkolt-, valamint a bél simaizomzatában és annak epitélrétegében (Kelemen-Valkony és mtsai, 2011, 2012). Ebből kiindulva feltételeztük, hogy a mutánsban krónikus gyulladás alakul ki, az immunrendszer ebből kifolyólag erősen aktivált állapotban van. A mutáns lárvák bélcsatornájának vizsgálata divertikulumokat mutatott ki, amik környezetében a sejtmagok TUNEL-pozitívak restriktív hőmérsékleten; permisszív körülmények között ez a jelenség nem detektálható.

A többsejtű eukariótákat folyamatos kihívások elé állítja saját rezidens mikroflórájuk. A lehetséges fertőzések leküzdésére a védekezési mechanizmusok széles skáláját fejlesztették ki az élőlények. Az ecetmuslica kizárólag veleszületett immunitással rendelkezik. A patogének elleni harcban a gazdaszervezet első, fizikai védelmi vonalát a külső és belső testfelszínnek epitelsejt rétege jelenti, ami megtalálható többek között a trachea- és a bélrendszerben is. Ezen sejtréteg immunogén hatásra antimikrobiális peptidok és reaktív oxigéngyökök szintézisével válaszol, ami a behatás időtartamával arányosan károsítja az epitéliumot.

## **Módszerek**

A TUNEL-jelölés (Terminal deoxiribonucleotide transferase-mediated dUTP-fluoresceine conjugate nick end labelling) a gyártó (In situ cell death detection kit, Roche) előírásai szerint történt.

A primertervezéshez a Primerfox algoritmusát hívtuk segítségül. A szekvenciák illesztése az NCBI Blast algoritmusával történt.

A háromnapos egyedekből Trizol reagenssel vontuk ki az RNS-t, majd Ambion RNáz-mentes DNÁzzal kezeltük és Qiagen RNeasy oszlopon tisztítottuk. A microarray nyers jeladatait több lépésben szűrtük, majd kétoldalas t-teszttel statisztikai próbának vetettük alá. A génontológiai elemzés a Panther adatbázisának felhasználásával készült, ahol lehetőség nyílt rá, post-hoc teszt elvégzésének közbeiktatásával. A QRT-PCR mérésekhez ugyanazokat az RNS-mintákat használtuk, mint a microarray kísérlet során. Referenciaértéknek az OreR 18°C-os reakciók értékeit tekintettük.

A reaktív oxigéngyökök koncentrációját spektrofotometriásan mértük és a minták fehérjetartalmára normalizáltuk.

A baktériumtörzsek tiszta vonalainak bélből történő izolálása után a 16S RNS-szekvenciák alapján soroltuk be a fajokat a rendszertani kategóriákba, szintén az NCBI adatbázis és annak BLAST algoritmusával segítségével.

A bélfalak határoló funkciójának tüzetesebb vizsgálatához Patent Blue V festéket kevertünk a



táptalajba. A fenti folyamatban a baktériumok szerepének tisztázásához ampicillin és tetraciklin antibiotikumokat, illetve a bélből izolált baktériumtörzsek ismert csíraszámú tenyészeit alkalmaztuk.

## **Eredmények**

Mivel a muslicában a gyulladós állapot az AMP-k szintézisének megemelkedésével jár, feltettük a kérdést, hogy vajon a IV-es típusú kollagén mutánsokban tapasztalható-e hasonló jelenség restriktív hőmérsékleten. Microarray és qPCR kísérleteink igazolták bizonyos AMP gének (*Metchnikowin*, *Diptericin*, *Diptericin B*, *Attacin C*, *Attacin A*, *edin*) túlexpresszióját. A vad típusú kontrollban éppen ellenkező hatást tapasztaltunk, az említett gének kifejeződése csökkent a hősokkot követően, amit tovább erősített az Att-GFP fúziós fehérjét kifejező egyedekkel végzett vizsgálat. Az elvégzett génontológia elemzés és a megváltozott kifejeződésű gének szervspecifikus termelődését összefoglaló táblázatok további betekintést nyújtanak a tárgyalt immunfolyamatok részleteibe.

Kísérleteink során két, gyakran tanulmányozott szabadgyök koncentrációját vizsgáltuk meg. Míg a peroxi-nitrit szintje már permisszív hőmérsékleten is szignifikánsan magasabb volt a mutánsban – ami restriktív körülmények között is emelkedett maradt – addig a vad típusban látszólag csak restriktív hőmérsékleten nő a peroxi-nitrit koncentráció, bár ezen adatok alapján nem szignifikánsan. A  $H_2O_2$  mennyisége a vad típusban a hőmérséklet emelés hatására alig nő, addig a mutánsban szignifikánsan nagyobb a hidrogén-peroxid koncentrációja restriktív hőmérsékleten. Feltételezhető, hogy a peroxi-nitrit megnövekedett koncentrációja a mutánsban hozzájárulhat a 20°C-on nevelkedett egyedek bélflórájának csíraszámában kimutatott csökkenéshez.

A bélflóra összetételének vizsgálata az *Acetobacter cerevisiae* és a *Lactobacillus plantarum* jelenlétét igazolta, melyek CFU értékei restriktív körülmények között csökkentek a vad típusban és a mutánsban egyaránt.

Az ampicillin és tetraciklin antibiotikumok keverékét tartalmazó táptalajon nevelt egyedek élettartama törzstől függetlenül hosszabb maximális élettartammal jellemezhető, bár a mutációt hordozó *DTS-L3/CyRoi* törzs féléletideje rövidebb volt alacsony hőmérsékleten, míg 29°C-on egyértelműen javult az állatok túlélése.

A mutáns élettartama erősen lecsökkent 29°C-on. Az izolált bélbaktériumok tenyészetének orális adminisztrációjára – szájon át történő etetésére – a vad típusú és a mutáns állatok egyaránt érzékenyek, jelentősen csökkent az élethosszuk. Alacsonyabb csíraszám mellett jelentősen javult a kísérleti populációk maximális túlélése, ami egy felső tűrőképességi küszöbérték meglétére utalhat.

A mutáns COL4A1 jelenléte a – normál esetben öregedés során megfigyelhető – SMURF fenotípus megjelenéséhez és intesztinális diszfunkcióhoz vezetett restriktív hőmérsékleten, fiatal egyedekben, ami jelentősen csökkentette élettartamukat.

A *col4a1* mutánsokban a megnövelt hőmérséklet hatására az AMP-k kifejeződése és a reaktív oxigén gyökök szintje igen nagymértékben megemelkedett, továbbá jelentős sejtpusztulás volt megfigyelhető, kapcsolatot teremtve ezáltal a IV-es típusú kollagén génjeit érintő mutációk, valamint az intesztinális diszfunkció és az AMP túlexpresszió között, jelezve a COL4A1 fehérje immunfolyamatokra kifejtett közvetett hatását.

A mátrix–integrin–intracelluláris struktúrfehérje vonal bármely eleme, vagy azok fiziológiás működésében szerepet játszó protein hibás működése a mutánsainkban megfigyelhetőhöz hasonló tünetek megjelenéséhez vezethet.

## Hivatkozott irodalom

Pauling, L., Corey, R., 1951. The Structure of Fibrous Proteins of the Collagen-Gelatin Group. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 37, 272–281.

Kelemen-Valkony, I., Kiss, M., Csiha, J., Kiss, A., Bircher, U., Szidonya, J., Maróy, P., Juhász, G., Komonyi, O., Csiszár, K., Mink, M., 2012. *Drosophila* basement membrane collagen col4a1 mutations cause severe myopathy. *Matrix Biol.* 31, 29–37.

Kelemen-Valkony, I., Kiss, M., Csiszar, K., Mink, M., 2011. Inherited Myopathies, in: *Muscular System - Anatomy, Functions and Injuries.* Nova Publishers Inc., pp. 1–40.

## **A dolgozathoz kapcsolódó publikációk**

### Könyvfejezet

Ildikó Kelemen-Valkony, Márton Kiss, Katalin Csiszár, Mátyás Mink: Inherited Myopathies. In: Myopathies: New Research. Eds: Howard S. Washington and Chris E. Castillo Jimenez, Nova Publishers, 2012, ISBN: 978-1-62257-372-1.

### Folyóiratban megjelent cikk

Márton Kiss, András Attila Kiss, Monika Radics, Nikoletta Popovics, Edit Hermes, Katalin Csiszár, Mátyás Mink: *Drosophila* type IV collagen mutation

associates with immune system activation and intestinal dysfunction; *Matrix Biology*, January 2016. 49:120-131. IF(2015): 4,47

Kelemen-Valkony, I., Kiss, M., Csiha, J., Kiss, A., Bircher, U., Szidonya, J., Maróy, P., Juhász, G., Komonyi, O., Csiszár, K., Mink, M.: *Drosophila* basement membrane collagen *col4a1* mutations cause severe myopathy; *Matrix Biology*, Volume 31, Issue 1, January 2012, Pages 29-37; IF(2012): 3,19

### Folyóiratban megjelent előadás kivonat

Márton Kiss, Ildikó Kelemen-Valkony, Brigitta Kiss, Katalin Csiszár, Mátyás Mink: Muscle dystrophy is triggered by type IV collagen alleles affecting integrin binding sites directly or indirectly in *Drosophila*. *Acta Biochimica Polonica*, 2012, IF (2012): 1,185

Mátyás Mink, Judit Csiha, Orbán Komonyi, Márton Kiss, Ildikó Kelemen-Valkony, Katalin Csiszár: Dominant *col4a1* *Drosophila* mutants as potential models for

mammalian/human Col4a1/COL4A1 lesions /Folia  
Medica Cassoviensia, Tomus 66, No. 1, Suppl. 1, 2011/

Összesített impakt faktor: 8,845