

A *Drosophila* sejt-közvetítette immunitása (NK-101730) - Zárójelentés (2012-2016)

(A vonatkozó saját közleményeket [kék](#) színnel kiemeltem.)

A Program keretében tovább jellemeztük a *Drosophila* sejt közvetítette immunitásában résztvevő sejtek és szervek funkcióit és differenciálódásuk szabályozó folyamatait. Immunológiai markereket azonosítottunk és jellemeztünk, genetikai rendszereket építettünk a *Drosophila* vérsejtképző szöveteinek és sejt közvetítette immunitásának a vizsgálatára. Felismertük és bemutattuk a veleszületett immunitás egy eddig ismeretlen sejttypusát, a sok magvú óriás hemocitát, mely mind morfológiai sajátosságait, mind leszármazását tekintve nagyfokú hasonlóságot mutat a gerinces szervezetek egy speciális immunsejtjével. A Program lehetőséget adott továbbá a veleszületett immunitással kapcsolatos legújabb eredmények egyetemi oktatás keretében történő bemutatására és fiatal kutatók posztgraduális képzésére, immunológiai kurzusok tartását biztosította a Szegedi Tudományegyetem és az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont égisze alatt, továbbá B.Sc., M.Sc. és Ph.D. fokozatok szerzését segítette a téma kutatásában részt vevő hallgatók számára.

A rovarok immunrendszerének humorális és sejttes elemei nagyfokú hasonlóságot mutatnak a gerinces szervezetek immunrendszerének veleszületett immunitás moduljával. Ez a hasonlóság részben konvergens evolúció, részben az elemek filogenetikai konzerváltságának eredménye. A veleszületett immunitás vizsgálatában széleskörűen alkalmazott *Drosophila melanogaster* egy olyan modellszervezet, amely immunrendszerének működése párhuzamba állítható a gerincesek veleszületett immunitásának a működésével. Míg a *D. melanogaster* humorális védekezésének elemei és azok szabályozása jól ismert, a sejt közvetítette immunitás kialakulásáról és működéséről jóval kevesebbet tudunk. Laboratóriumunkban, a rovarokban és a gerinces szervezetekben hasonló védekező funkciókat ellátó veleszületett immunválasz sejt közvetítette ágát jellemezzük *Drosophila* modellszervezetben, általunk létrehozott immunológiai és genetikai vizsgálórendszerek kombinálásával.

Eredmények:

i) *Drosophila* vérsejtek azonosítására alkalmas immunológiai markerek jellemzése és genetikai rendszerek létrehozása.

Vérsejt antigének

A tumor szuppresszor mutáns *l(3)mbn-1* lárvákból vérsejteket izoláltunk, majd a fagocita funkciójú plazmatocitákon és a tokképző lamellocitákon kifejeződő antigéneket azonosítottuk. A molekulák szöveti expresszióját és sejttes lokalizációját indirekt immunfluoreszcenciával, a molekulák sejtmembrán, illetve citoplazmás lokalizációját áramlási citometriával, molekulatömegüket Western-blot analízissel határoztuk meg. Az immunprecipitációval izolált fehérjéket tömegspektrometriai analízisnek vetettük alá.

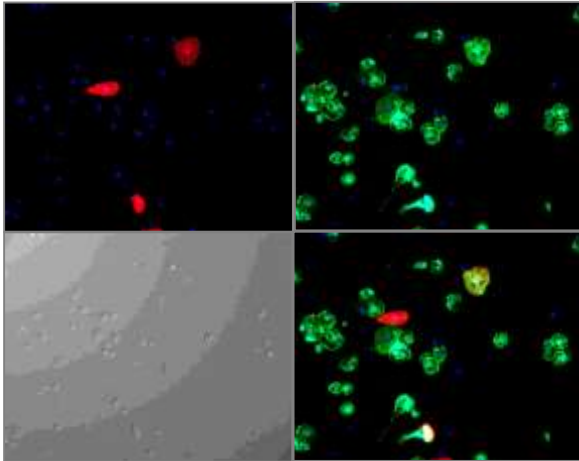
A H21 antigén, a *Drosophila* β PS integrin

A vérsejteken azonosított H21 antigén tömegspektrometriai analízise és RNS interferenciával történő csendesítése során bebizonyosodott, hogy az a korábban azonosított L4 ([Honti és mtsai., 2014](#)) antigénhez hasonlóan a *Drosophila myospheroid* gén által kódolt β PS integrin. A vérsejteken kifejeződő H4 és H6 antigének indirek immunfluoreszcencia analízise a H21 és L4 molekulákhoz nagyon hasonló kifejeződési mintázatot mutatott és *myospheroid* specifikus RNS interferenciával szintén csendesíthető volt. Bár a H4 és H6 antigének molekulatömege Western-blot analízissel nem volt meghatározható, valószínű, hogy ezeket a molekulákat is a *myospheroid* gén kódolja.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a *myospheroid* gén sejt-közvetítette immunválaszban betöltött szerepét. Eredményeink szerint a He-GAL4 meghajtó elemmel vérsejtspecifikusan meghajtott *myospheroid* specifikus RNS interferenciával csendesített utódokban a β PS integrin hiánya sem a parazitoid darazsak elleni tokképzés hatékonyságát sem a plazmatociták fagocitáló képességét nem befolyásolta.

Az L2 antigén

A lamellocitákban megnyilvánuló L2 antigén tömegspektrometriai analízise során azt az eredményt kaptuk, hogy ez a fehérje az Aktin 57B2 izoforma, Ennek igazolására a GFP-vel jelölt aktin57B2 fehérjét Hemese-GAL4 meghajtóelemmel vérsejtekben túltermeltettük (zöld). Az anti-L2 ellenanyaggal történő indirekt immunfluoreszcencia analízis során azt tapasztaltuk, hogy néhány lamellocita kivételével a zölden fluoreszkáló, aktin57B2 fehérjét túltermelő vérsejtek zöme nem festődött az anti-L2 ellenanyaggal (piros), ami azt mutatja, hogy a tömegspektrometriai analízis eredményét nem tudtuk megerősíteni.



A Nimrod kromoszóma régió, a NimC1 molekulacsalád (NimC1 és Eater), valamint a Vajk fehérjék

A NimC1molekula

Megállapítottuk, hogy a a fagocitózis szabályozásában résztvevő NimC1 molekula baktériumkötő képességgel rendelkezik (Zsámboki és mtsai., 2013). További eredményeink szerint a Gram-negatív *E. coli* baktériumot a vizsgált rekombináns Nimród fehérjék mindegyike, a NimA, NimB1, NimB2 és NimC1 míg a Gram-pozitív *S. epidermidis* baktériumot csak a rekombináns NimB1 képes megkötni. Megállapítottuk, hogy a Nimród fehérjék baktériumkötésének hatékonysága nem áll összefüggésben azok NIM doménjeinek számával. A Nimród fehérjecsalád tagjai a baktériumok elleni immunválaszban fagocitózis receptorként, vagy opszoninként működhetnek és beilleszthetők az EGF-hez hasonló, általunk korábban azonosított NIM domént tartalmazó fagocitózis receptorok sorába. Úgy tűnik, hogy a NimC1 molekulának más általános biológiai szerepe is lehet, mely a „nem-specifikus” szubsztrátok felismeréséhez és a vérsejtek kitapadásához köthető. A NimC1 molekula kifejeződését vizsgálva megállapítottuk, hogy ez a fagocitózis receptorként azonosított transzmembrán receptor (Kurucz és mtsai., *Current Biology*, 2010) egyes esetekben NimB típusú molekulává alakulhat (Honti és mtsai., 2013).

Megfigyeltük, hogy számos olyan *Drosophila* vonal létezik, amelyekben a plazmatocitákon kifejeződő NimC1 molekulát nem ismerik fel az anti-NimC1 ellenanyagok (P1a és P1b), ami számos tumorbiológiával, fejlődésbiológiával és veleszületett immunitással foglalkozó laboratóriumban megnehezíti a fagocitózist és plazmatociták differenciálódásának folyamatait érintő kutatásokat. Az érintett vonalakat megvizsgálva megállapítottuk, hogy ezekben a vonalakban a NimC1 molekula génje delécio(ka)t tartalmaz, ezért nem termelődik kimutatható, vagy működőképes molekula. A gént érintő mutációt azonosítottuk, molekulárisan jellemeztük, valamint rekombinációval előállítottunk egy a NimC1 molekulára nézve pozitív Hml>GFP vonalat, amely hasznos eszközzé válhat a *Drosophila* vérsejtképzését és a fagocitózis folyamatát vizsgáló kutatók számára. Ez, az eddig nem észlelt és általunk publikált (Honti és mtsai. 2013) jelenség lényegesen befolyásolja a fagocitózis folyamatát vizsgáló kutatásokat és az eddigi eredmények egy részének újraértelmezését teszi szükségessé. Ezekhez a vizsgálatokhoz a P1 markerre nézve pozitív Hml>GFP vonalat (Honti és mtsai., 2013) a kutatói közösség rendelkezésére bocsájtottuk.

Az Eater molekula

Az Eater molekula a Nimród molekulacsaládba tartozó transzmembrán fehérje, mely korábbi ismereteink szerint a Gram pozitív baktériumok bekebelezését szabályozza. Kísérleteink igazolták, hogy a molekula - feltehetően egy, a testürege falában elhelyezkedő ligandhoz kapcsolódva - a szesszilis szövet szerkezetét szabályozza (Bretscher és mtsai., 2015). Az Eater fehérjének a szesszilis szövet szerkezetének és a vérsejtek differenciálódásának szabályozásában betöltött szerepét a "Szesszilis szövet mikroanatómiája" fejezetben tárgyaljuk. Az Eater fehérje funkcióinak a vizsgálatához egy, az Eater fehérjét kódoló plazmid konstrukciót állítottunk elő. A rekombináns fehérjét Bakulovírus expressziós rendszerben, Sf9 sejtekben fejeztettük ki. A fehérje az Eater N-terminális 204 aminosavát hordozza, mely magába foglalja a 40 aminosavból álló szignál peptidet, a CCXGY motívumot (Kurucz és mtsai., 2007) és 4 N-terminális NIM domént, melyek szerkezetileg az Eater 28 NIM doménje közül a legnagyobb variabilitást mutatják. A rekombináns fehérjét izoláltuk és vele egereket immunizáltunk. Az egerekből izolált poliklonális savó Western-blot analízise szerint az ellenanyag az Sf9 lizátumokban levő 49 kDa molekulatömegű rekombináns fehérjét, és a vérsejtek lizátumában a 128 kDa Eater fehérjét ismeri fel, és nem reagált az *eater* deléciós mutáns vérsejt-lizátumával. Egerek immunizálását követően mintegy 400 hibridóma sejtvonalat teszteltünk azonban egy sem reagált specifikusan az Eater fehérjével, ezért a további vizsgálatokban a poliklonális savót jellemezzük és használjuk a fehérje kimutatására.

A Vajk fehérjék

Korábban azonosítottunk négy, egymással nagyfokú homológiát mutató gént a *D. melanogaster* 2. kromoszómáján, a vajk géneket, melyek közül három a Nimrod klaszterben helyezkedik el (Somogyi és mtsai., 2010). A gének *in silico* analízisével megmutattuk, hogy az általuk kódolt fehérjék feltehetően a kutikula szerkezetének - a rovarok első, fizikai védelmi vonalának - a felépítésében játszanak szerepet. A kódolt fehérjéket Baculovírus rendszerben termeltettük és velük szemben poliklonális ellenanyagokat állítottunk elő. Megállapítottuk, hogy a Vajk1 and Vajk4 fehérjék az embrió fejlődő kutikulájában és a bábban nyilvánulnak meg. A Vajk1 fehérjét kimutattuk a fiatal adult repülőizmaihoz vezető tracheolák kutikulájában, a Vajk 4 fehérje a test felszínének epitheliális sejtjeiben van jelen. A vajk géntermékek RNSi-vel történő csendesítése során szárny és kutikula fejlődési rendellenességeket mutattunk ki. Eredményeink azt mutatják, hogy a Vajk-1 és a Vajk-4 fehérjék a patogénekkal szembeni első, fizikai védekező vonal, a kutikula felépítésében vesznek részt (Cinege és mtsai., kézirat elkészült).

Egyéb antigének, amelyeket a hemocitákon azonosítottunk

A H18 molekula a hemociták sejtmembránjában lokalizálódik, szöveti expressziójának vizsgálata során kimutattuk, hogy kifejeződik mindhárom vérsejt-kompartimentumban: a keringő és szesszilis vérsejteken, valamint a központi vérképző szervben, a lymph gland-ben, ezen kívül a szívcső mentén elhelyezkedő perikardiális sejtekben is megtalálható. Parazitoid darázssal történő immunindukciót követően expressziós szintjének emelkedését tapasztaltuk. A molekula ömegspektrometriai analízise és RNS interferenciával történő csendesítése alapján megállapítottuk, hogy ez a molekula a Tetraspanin 42Ed, melynek immunválaszban betöltött szerepét még nem írták le, azonban a predikciónk alapján szerepet játszhat szignalizációs komplexek létrehozásában. A 3A5 intracellulárisan a keringő plazmatociták egy alpopulációjának citoplazmájában granulumok formájában kifejeződő molekula, amely egyes szesszilis hemocitákban, a keringő plazmatociták alpopulációjában, és a központi nyirokszerv egyes sejtjeiben is kifejeződik, és jelen van a hemolimfa alvadékban. A molekula expressziója a vérsejt-kompartimentumokban az immunindukció hatására nem változik. Tömegspektrometriai analízise alapján a fehérjét a CG2233 gén kódolja. A molekula kölcsönható partnereinek azonosításra keresztkötő ágensek alkalmazását követően ko-immunoprecipitációt végeztünk, majd a komplexeket Western-blot majd tömegspektrometriai analízisnek vetettünk alá. A komplexekben elsősorban a sérüléseket követően aktiválódó melanizációs kaskád elemei voltak jelen nagy mennyiségben. Ezen kívül a Glutactin, AT19513p, a lárvális szérum fehérje-1 alfa, béta és gamma lánc, a Fondue B izoformája, a gliceralehid-3-foszfát dehidrogenáz-2, a tiolésztert tartalmazó protein II izoformája és a piruvát kináz fehérjéket azonosítottuk. A 42Ed és a CG2233 szerepét RNS interferenciával történő csendesítéssel és deléciós mutánsok létrehozásával és jellemzésével vizsgáljuk.

Genetikai vizsgáló rendszerek létrehozása

atillaMB⁰³⁵³⁹ konverziója

Megkíséreltük az *atillaMB⁰³⁵³⁹ MiET1* elemét - mely eredményeink szerint nem működő *GAL4* gént hordoz - működő *GAL4* gént hordozó *PGawB* elemre *kicserélni*. Az előkísérleteink során kiderült, hogy a *minos* elem csak a testi sejtekben mobilizálható, a csírvonalban nem ugrasztható, ezért a tervezett konstrukt az adott rendszerben nem hozható létre.

A hdc-GAL4 meghajtóelem

Mivel a rendelkezésünkre álló meghajtóelemek a központi nyirokszerv sejtjeinek csupán egy részét jelölik ki, egy olyan meghajtóelemet kívántunk létrehozni, mellyel a teljes vérsejtkompartimentum kijelölhető, és az onnan származó sejtek sorsa követhető. A rendelkezésünkre álló *hdc^{B5}* allélban található P-lacZ elem a teljes központi nyirokszervben aktív, azonban sejtvonalljelölésre nem használható, mivel nem tartalmaz *GAL4* forrást. A P-lacZ elem és egy *GAL4* forrást tartalmazó P{GawB} elem egyidejű mobilizálásával létrehoztunk olyan vonalakat, amelyek enhanszer csapdaként működnek, és a *hdc-lacZ* mintázatának megfelelően fejezik ki a *GAL4* fehérjét. Ezen inszerciók segítségével vizsgálni tudjuk a központi nyirokszerv sejtjeinek sorsát az immunindukciót követően, illetve a metamorfózis során. A *hdc-GAL4* meghajtóelemet a *hdc* gén funkciójának jellemzése során is felhasználtuk, melyet a későbbiek során tárgyalunk.

In vivo vizsgáló rendszer létrehozása szeptikus sérülés által kiváltott immunválasz szabályozásában résztvevő faktorok azonosítására

Nagy áteresztő képességű, reprodukálható módszert fejlesztettünk ki a szeptikus sérülés és a parazitákkal szembeni immunválasz szabályozásában résztvevő faktorok azonosítására. A módszer, amely a természetben is gyakran előforduló sérülést modellezi, alkalmas a szeptikus sérülést követő túlélésben szerepet játszó gének azonosítására *D. melanogaster*-ben. A módszer alkalmazásával egy irányított screen végzettünk, amelyben különböző gének mutáns alléljait hordozó állatok életképességét vizsgáltuk szeptikus fertőzést követően és a módszert ismert jelátviteli utak blokkolásával validáltuk (Kari és mtsai., 2013) és két, eddig az immunválaszban fel nem ismert jelentőségű gént a *raspberry*-t (CG1799) és a *scramblase1*-et (CG32056) azonosítottuk. A *raspberry* mutánsok esetében azt tapasztaltuk, hogy *Bacillus cereus* fertőzést követően szignifikánsan csökkent a túlélő egyedek aránya a kontrollhoz képest, míg *Escherichia coli* és *Serratia marcescens* fertőzést követően a mutánsok életképessége hasonló volt a kontrollhoz. Mivel a *B. cereus*-a *raspberry* mutáns *D. melanogaster* vérsejtjei nem kebelezték be, feltételeztük, hogy az inosine 5'-monofoszfát dehydrogenázt (IMPDH) kódoló gén, a *raspberry*, a sejt közvetítette immunitás általános regulátora is lehet, ezért a *raspberry* szerepét a *Leptopilina boulardi* G486 parazitoid darázsfertőzést követő tokképző reakcióban is megvizsgáltuk (Kari és mtsai., 2016). A darázsfertőzést követően 72 órával a *raspberry* mutánsban szignifikánsan kevesebb volt a részlegesen és a teljesen melanizált darázspeték aránya az *Oregon R* kontrollhoz viszonyítva. A parazitoid darázsfertőzést követő túlélés vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a *raspberry* mutáns esetében kétszer annyi darázs kelt ki a *Drosophila* bábbőréből (82%), mint az *Oregon R* kontrollból (39%). Hasonló eredményeket kaptunk, amikor *Hemese-Gal4 UAS-GFP* meghajtó elemmel vérsejt specifikusan csendesítettük a *raspberry* gént. Mindezekon túlmenően a melanizációs folyamatok gyengék és a vérsejteknek a petéhez tapadása is hiányos. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a gén a sejt közvetítette immunitás általános regulátora (Kari és mtsai., 2016). Juhász Gábor (MTA lendület kutatócsoport, ELTE-SZBK) csoportjával együttműködve jellemeztük a *vps8* mutáció okozta vérsejt fenotípust az ecetmuslica lárvában. Megállapítottuk, hogy a mutáció vérsejtproliferációt és spontán differenciálódást okoz, de funkcionális defektet eredményez a plazmatocitákban; a mutáns lárvákból izolált vérsejtek bekebelezik ugyan a baktériumokat, azonban nem képesek azokat megfelelően lebontani (Lőrincz és mtsai, kézirat, 2016).

ii) A vérsejtképző szövetek szerkezete és a szerveződésüket szabályozó genetikai faktorok

A sejt közvetítette immunválasz során speciális sejtek - a lamellociták - differenciálódnak, melyek részt vesznek a testidegen részecskéknek a saját szövetektől történő elhatárolásában és elpusztításában. Ezeknek a sejteknek a szöveti eredetére valamint előalakjainak a természetére és differenciálódására vonatkozóan több elmélet született, azonban nem létezett az elméletek vizsgálatára/tesztelésére alkalmas kísérleti rendszer. A Projekt keretében a genetikai, immunológiai és fiziológiai módszerek kombinálásával létrehozott vizsgálati rendszer alapkérdések megválaszolását tette lehetővé.

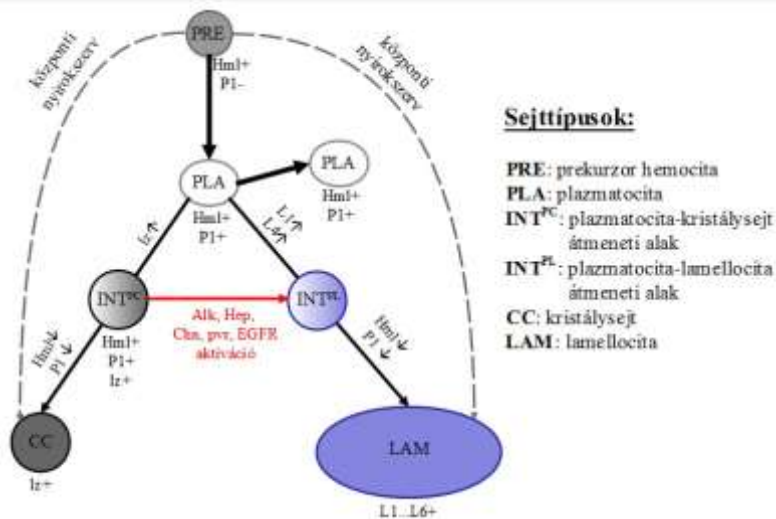
A szesszilis vérsejtképző szövet mikroanatómiája és dinamikája

Újonnan kidolgozott, *in vivo* konfokális videomikroszkópián alapuló módszerünk (Csordás és mtsai, 2014) lehetővé tette a szesszilis szövet élő lárvákban történő vizsgálatát. Megfigyeltük, hogy a szesszilis szövet szerkezete dinamikus, a szesszilis szövet és a keringés között a vérsejtek egy része szabadon cserélődik. Nagyfelbontású konfokális mikroszkópos vizsgálataink rávilágítottak arra, hogy a szesszilis szövet sejtjei immunindukciót követően citonémákat hoznak létre. A citonémák funkciója még nem ismert, jelenlegi elképzelésünk szerint szerepet játszanak a vérsejtek nem-sejtautonóm differenciálódásának szabályozásában. Kimutattuk, hogy az *Eater* fehérje jelenléte feltétlenül szükséges a szesszilis szövet integritásának fenntartásához. Az *eater*, *peroxidazin*, *eater*, *lozenge*, *hemolektin*, *hemese* meghajtóelemekkel történő csendesítésének hatására a szesszilis szövet szerkezete felbomlik, azonban lamellociták nem képződnek. Az *eater* hatása a plazmatocitákban sejt-autonómnak, míg kristálysejtekben nem-sejtautonómnak bizonyult (Bretscher és mtsai, 2015).

A vérsejt kompartmentumok dinamikája és plaszticitása

Korábbi eredményeink (Honti és mtsai., 2010) arra engedtek következtetni, hogy az irodalomban terminálisan differenciálódott effektorsejteknek tekintett fagocita sejtek, a plazmatociták, immunindukciót követően nem fagocitáló lamellocitákká differenciálódhatnak. Mivel szeretnénk volna ezt a folyamatot részletesebben megérteni, a laborunkban alkalmazott, GAL4/UAS vezérelte sejtvonaltjelölő rendszert használtuk fel arra, hogy a kristálysejt-leszármazási vonal plaszticitását vizsgáljuk. Rendszerünk segítségével olyan transzgéneket fejeztettünk ki, amelyeket korábbi vizsgálatok alapján (Zettervall és mtsai., 2004, Stofanko és mtsai., 2010) kapcsolatba hoztak a lamellociták differenciálódásával. Kísérleteinkből kiderült, hogy bár a kristálysejt-leszármazási vonal (melyet a *lozenge*-GAL4 elem segítségével jelöltünk meg) sejtjei a parazitoid darázsfertőzést követően jellemzően nem alakulnak lamellocitákká, a vonalban kifejeztetett transzgének hatására a keringésben immunindukció nélkül is tokképző sejtek jelentek meg. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy a különböző faktorok eltérő módon idézték elő a lamellociták képződését: a *charlatan* és *hemipterous*.*ACT* kifejeztetést követően nagyrészt olyan lamellocitákat figyeltünk meg, melyek a kristálysejt-leszármazási vonal sejtjeiből differenciálódtak, míg az *anaplastic lymphoma kinase*.*ACT* és a *pvr.λ* expresszió a kristálysejt leszármazási vonaltól független lamellocitákat is eredményezett. Mindebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a lamellocita differenciálódás több lépcsőben szabályzott folyamat, mely nem-sejtautonóm és sejtautonóm szignálok integrálásával megy végbe. Mindezek mellett azt is megállapíthatjuk, hogy bár az immunindukciót követően a kristálysejt-leszármazási vonal nem vesz részt a lamellocita differenciálódásban, ez a folyamat megfelelő transzgének segítségével mégis indukálható. Ezt azzal magyarázzuk, hogy a sejtvonaltjelölő rendszerünk a kristálysejt differenciálódás már olyan korai szakaszában bekapcsol, amikor a sejtek még részben a plazmatocitákra jellemző funkcionális és génexpressziós sajátosságokat mutatnak. Ezért lehetséges, hogy az egyes faktorok kifejeztetése ezen a korai ponton képes megváltoztatni ezeknek a sejteknek a sorsát, így azokból nem kristálysejtek, hanem lamellociták jönnek létre. Mivel eredményeink összefüggésbe hozhatóak a kristálysejt differenciálódás korai lépéseivel, szeretnénk volna részletesebben megérteni ezt a folyamatot. A kristálysejtek embrionális eredete tisztázottnak tekinthető (Milchanowski és mtsai., 2004, Bataillé és mtsai., 2005), azonban az elmúlt években Leitao és Sucena (2014) élő állatok videomikroszkópos megfigyelésével kimutatták, hogy ez a sejtípus a lárvális élet során a szesszilis vérsejtképző kompartmentumban *de novo* jön létre, méghozzá plazmatocitákból. Azt viszont továbbra

sem lehetett tudni, hogy a központi nyirokszervben létrejövő kristálysejtek erre a differenciálódási útvonalra elkötelezett prohemocitákból, vagy, mint ahogy azt a szesszilis szövetben megfigyelték, plazmatocitákból differenciálódnak. Ennek vizsgálatához sejtvonajelölő rendszerünkkel kijelöltük a plazmatocita-leszármazási vonalat (a *peroxidasin* és *eater* meghajtóelemekkel, Honti és mtsai., 2010), majd a központi nyirokszerv kérgi zónájában indirekt immunfluoreszcencia alkalmazásával differenciálódott kristálysejteket kerestünk. Megállapítottuk, hogy a központi nyirokszervben található kristálysejtek jelentős része a plazmatocita leszármazási vonalból eredeztethető. Saját eredményeink, valamint az irodalomban megtalálható adatokra alapozva megalkottunk egy olyan modellt, amely összefoglalja az ecetmuslica lárvában található sejttypusok eredetét és leszármazási kapcsolatait. (Csordás és mtsai., kézirat)



Korábbi kísérleteink során a lárv szesszilis vérsejtképző szövetét jellemeztük (Márkus és mtsai., 2009, Honti és mtsai., 2010). Ezen vizsgálataink során az is kiderült, hogy a szesszilis kompartmentum igen érzékeny az invazív fizikai behatásokra, a lárvák mikroszkópos vizsgálatokhoz történő preparálása súlyosan rontsolja a szesszilis szövet szerkezetét. Annak érdekében, hogy sérülés mentes szesszilis vérsejtképző kompartmentumban követéses megfigyeléseket végezhesünk egy olyan új módszert fejlesztettünk ki, melynek segítségével a lárvák immobilizálhatók, és konfokális mikroszkóp segítségével vizsgálhatók (Csordás és mtsai., 2014). Ez a rendszer *in vivo* riporterek kifejeződésének követését is lehetővé teszi, amit a laboratóriumunkban azonosított molekuláris markerekkel is kombinálhatunk (Kurucz és mtsai., 2007). A módszer során az *in vivo* riportereket kifejező immobilizált lárvákba a vérsejteket felismerő elsődleges-, és fluorszcensen jelölt másodlagos ellenanyagokból előállított immunkomplexet injektáltunk. Ezzel a technikával élő állatokban párhuzamosan követhető és videomikroszkópiával rögzíthető a vérsejteken kifejeződő *in vivo* riporterek és az immunkomplexszel festett molekuláris markerek. A rendszerünk a jövőben olyan *Drosophila* mutánsok vizsgálatában is hasznos lehet, melyek vérsejt fenotípussal bírnak, valamint olyan rovarfajok vérsejtképző kompartmentumainak felderítésére, amelyekben a transzgenezis még nem megoldott, azonban a vérsejtspecifikus ellenanyagok létrehozása megvalósítható.

A headcase gén szerepe a vérsejtsors szabályozásában

A laboratóriumunkban előállított *hdc-GAL4* driver vonalak (l. fentebb, "A *hdc-GAL4* meghajtóelem" fejezet) közül háromban polimeráz láncreakció, majd az azt követő szekvenálás segítségével megállapítottuk az inszerció pozícióját. Mindhárom beépülés a promóter ATG szekvenciájától 5' irányban 1kB távolságban található. A lárvában a *hdc-GAL4* kifejeződési mintázata megegyezik a *hdc-LacZ* expressziós mintázatával, a központi nyirokszervben kívül nem tapasztaltunk a vérsejteken expressziót. Immunfluoreszcenciás vizsgálataink során azt találtuk, hogy a központi nyirokszervben a *hdc-GAL4* meghajtóelem, valamint a Collier fehérje (a központi nyirokszerv poszterior szignalizációs központjának markere) kifejeződési mintázata átfedést mutat. Meglepő módon, a *hdc* gén *Hml-GAL4*

meghajtó elemmel történő csendesítése mindhárom kompartmentumban szignifikánsan csökkentette a plazmatocita specifikus markert (*Hml>GFP*) kifejező vérsejtek számát. Vérsejt specifikus immunfestéssel kimutattuk, hogy a vérsejtek a kontrollal megegyező számban továbbra is jelen vannak a vérsejtképző kompartmentumokban. A *Hml>hdcRNSi* lárvákban lamellociták differenciálódását nem figyeltük meg. Két, egymástól eltérő kifejeződési mintázatot mutató meghajtóelemmel (*Dot-GAL4* és *Col-GAL4*) elvégeztük a *hdc* gén központi nyirokszerv specifikus csendesítését. Mindkét esetben azt tapasztaltuk, hogy a lárvák keringésében lamellociták jelentek meg. Eredményeink alapján a Hdc fehérje? hatását a központi nyirokszervben, vélhetőleg annak poszterior szignalizációs központjában fejtí ki. Kísérleteink szerint a Hdc szerepet játszhat a vérsejtek sejtautonóm, illetve nem-sejtautonóm differenciálódási folyamatainak szabályozásában, valamint az egyes vérsejt kompartmentumok közötti kommunikációban. A pályázat ezen részében elkezdett munka folytatására - a Hdc vérsejtek differenciálódásában betöltött szerepének részletes vizsgálatára - Honti Viktor OTKA PD pályázatot nyújtott be, melyet időközben elnyert (OTKA PD-115534).

A vérsejt kompartmentumok átrendeződése a lárvabáb-adult átalakulás során

A CoREST-tel köcsönható transzkripció faktor, a Charlatan lárvális plazmatocitákban történő túltermelése mind a keringésben, mind a központi nyirokszervben lamellocita differenciálódást indukál. A lamellociták megjelenése és számuknak emelkedése a plazmatocita markerek eltűnésével megerősíti azt a korábbi eredményünket, mely szerint a terminálisan differenciálódottnak gondolt lárvális plazmatociták plaszticitással rendelkeznek, azaz megfelelő indukcióra lamellocitává differenciálódnak (Honti és mtsai., 2010). A Charlatan fehérje *Hml-GAL4* meghajtóelemmel való túltermeltetésének hatására az adult vérsejtjei nem differenciálódtak lamellocitákká, ami arra utal, hogy az adult plazmatocitái terminálisan differenciálódott sejtek, differenciálódási plaszticitást nem mutatnak. Az adult szesszilis kompartmentumban található vérsejtek - a lárvához hasonlóan - anatómiailag rendezett szöveti szerkezetet alkotnak (Honti és mtsai., 2014); a szerkezet fenntartásában az Eater fehérje, a lárvá szesszilis szövetéhez hasonlóan, kitüntetett szerepet játszik. Kísérleteik során azt tapasztaltuk, hogy az *eater* gént *Hml-GAL4* meghajtóelemmel csendesítve, az adult szesszilis szövet szerkezete felbomlott.

iii) A NimC1 transzmembrán receptor mikrobakötő kapacitása

Az ide vonatkozó eredményeket a "NimC1 molekula" bekezdésben, fentebb tárgyaljuk (Zsámboki és mtsai., 2013)

iv) A Drosophila ananassae vérsejtképző szövetének és sejt közvetítette immunitásának a vizsgálata (Márkus és mtsai., 2015)

A *Drosophilidae*-k *ananassae* alacsoportjába tartozó fajokban egy eddig ismeretlen sejtípust azonosítottunk, a sokmagvú óriás hemocitát. A sejtípus jellemzésére *D. ananassae* és *D. bipectinata* vérsejtek alpopulációit felismerő immunológiai reagenseket és *D. ananassae*-ban genetikai rendszereket fejlesztettünk, melyeknek alkalmazását sejtbiológiai módszerekkel kombináltuk (Márkus és mtsai., 2015). Az általunk azonosított sokmagvú óriás sejtek a parazitákkal szemben kialakuló tokképző reakcióban vesznek részt, melynek során a paraziták petéjét beburkolják, környezetüktől izolálják és a parazitát a *D. melanogaster*-re jellemző melenizációs reakció nélkül pusztítják el. Az óriás hemociták esetenként több száz sejtmagot tartalmazó, sejt-sejt fúzió eredményeként *in vivo* létrejövő sejtek, melyek a keringésben és a szesszilis kompartmentumban elhelyezkedő plazmatocitákból differenciálódnak. A baktériumok bekebelezésében nem vesznek részt, eddig megismert kizárólagos funkciójuk a paraziták eliminálása. Bár a lamellociták és a sokmagvú óriássejtek morfológiai jellemzői lényegesen eltérnek egymástól, funkciójuk hasonló, mely feltehetően a különböző földrajzi régiókban kialakuló gazdaparazita kölcsönhatás konvergens evolúciójának az eredménye. A sokmagvú óriás hemocita morfológiai jellemzőit és eredetét tekintve nagyfokú hasonlóságot mutat az emlősök sokmagvú óriássejtjével, melyek szintén makrofágok szinciciumaként jön létre a krónikus gyulladások egyik formája, a granulomaképződés során.

A Projekt keretében azonosított markerek, a fejlesztett reagensek és Drosophila törzsek használata széleskörűen elterjedt a Drosophila immunitásának a vizsgálatában, és minden olyan kísérleti rendszerben, ahol a vérsejtek reakciói (szövetformálódás, tumor képződés, stb...) szerepet játszanak. Eddig több mint 1500 kísérleti mintát, köztük a laboratóriumunkban előállított Drosophila törzseket bocsátottunk a kutató-közösség rendelkezésére.

v) Oktatás, ismeretterjesztés, egyéb eredmények, pályázatok

B.Sc. fokozatot szerzett: Abonyi Csilla, Kovalcsik Olga

M.Sc. fokozatot szerzett: Csordás Gábor, Varga Gergely, Gábor Erika, Lerner Zita

Ph.D. fokozatot szerzett: Zsámboki János, Csordás Gábor

Ph.D. dolgozat védeése előtt áll: Kari Beáta

Gábor Erika Ph.D. hallgató:

Könyvfejezet:

Gábor Erika, Török Tibor, Csordás Gábor, Zsámboki János, Kurucz Éva, Andó István (2013): A házi méh (*Apis mellifera*) immunitása, Tudomány a vidék mindennapjaiban, ISBN: 978-963-306-245-6, p. 29.-34.

Kurzusok:

2013/14 I.: A veleszületett immunitás

2013/14 II.: A rovarok immunitása

Tanulmányút:

Umea University, Department of Molecular Biology, Dan Hultmark Research Group

Uppsala University, Department of Medical Biochemistry and Microbiology

Honeybee Research Group, Swedish University of Agricultural Sciences

Folyóiratban megjelent absztrakt:

Erika Gábor, János Zsámboki, Gyöngyi Cinege, Tibor Török, Gábor Csordás, Viktor Honti, Éva Kurucz, István Andó (2015): Molecular definition of hemocyte subsets in the honey bee (*Apis mellifera*), Immunológiai Szemle, VII. évfolyam 3.szám, ISSN 2061-0203

Erika Gábor, Tibor Török, János Zsámboki, Gyöngyi Cinege, Gábor Csordás, Viktor Honti, Éva Kurucz, István Andó (2014): Spring, summer, autumn winter: Seasonal changes in hemocyte number and type in the honey bee, Immunológiai Szemle, VI.évfolyam 3.-4. szám, ISSN: 2061-0203

Erika Gábor, Tibor Török, Gábor Csordás, Viktor Honti, Éva Kurucz, István Andó (2013): Molecular and functional heterogeneity of honey bee hemocytes, Immunológiai Szemle, V.évfolyam 3. szám, ISSN: 2061-0203

Gábor Erika, Török Tibor, Csordás Gábor, Honti Viktor, Kurucz Éva, Andó István (2012): A házi méh vérsejtjeinek heterogenitása, Immunológiai Szemle, IV.évfolyam 3. szám ISSN: 2061-0203

Előadások, díjak:

SZTE TTK BTCS TDK Immunológia szekció, 2012 Szeged, **(II. helyezés)**
XXXI. OTDK Biológia szekció, 2013 Szeged, **(I. helyezés)**
Tudomány a vidék mindennapjaiban konferencia, 2013 Hódmezővásárhely
Magyar Immunológiai Társaság 43. vándorgyűlése, 2014 Velence
Magyar Immunológiai Társaság 43. vándorgyűlése, 2015 Velence (angol nyelvű)
Sófi József Tudományos Ösztöndíj Konferencia, 2015 Szeged
Sófi József Tudományos Ösztöndíj Konferencia, 2016 Szeged

Posztterek:

Magyar Immunológiai Társaság 41. vándorgyűlése, Debrecen 2012
Magyar Immunológiai Társaság 42. vándorgyűlése, Pécs 2013 (angol nyelvű)
Magyar Immunológiai Társaság 43. vándorgyűlése, Velence 2014 (angol nyelvű)
MTA-SZBK Straub-napok, Szeged 2012
MTA-SZBK Straub-napok, Szeged 2013 (angol nyelvű)
MTA-SZBK Straub-napok, Szeged 2014 (angol nyelvű)
MTA-SZBK Straub-napok, Szeged 2015 (angol nyelvű)

Honti Viktor tudományos munkatárs

Kurzus: "Immunitás - veleszületett immunitás" (2013 ősz)
Kurzus: "A rovarok immunitása" (2014 tavasz)
Két oktatási segédanyag: <1> *In vivo* sejtvonal jelölés transzgenikus sejtvonal jelölő rendszer felhasználásával *Drosophila melanogaster*-ben, <2> A *Drosophila melanogaster* vérsejtjeinek leszármazási vonalai
Középiskolás Élettudományi Kutatótábor (2013)
Ismeretterjesztő előadás a Magyar Biológiai Társaság Szegedi Csoportjának ülésén (2013. november 7.)
Hogyan keletkeznek az ecetmuslica vérsejtjei? Egy modellállat - újabb szerepben
ÉLET ÉS TUDOMÁNY 69:(47) pp. 1488-1490. (2014)
Kutatók éjszakája - "Az ecetmuslica és az ember vére" 2014 és 2015 szeptember
Straub napok, Kiváló előadó díj (2013)
Magyar Zoltán Posztdoktori Ösztöndíj (2013)
OTKA PD pályázat, elnyert támogatás (2015)
Előadások: MAGE (2015), MBKE (2014), EDRC (2015), MIT (2013, 2014, 2015), Ceske Budejovice (2015)

Varga Gergely Ph.D. hallgató

2012. Magyar Immunológiai Társaság 41. vándorgyűlése, Debrecen – Absztrakt pályázat 1. díj
2012. TDK Genetika és molekuláris biológia szekció 2. díj + közönségdíj
2013. XXXI. OTDK Genetika tagozat 1. díj + JTEPress különdíj
2013. Eötvös József Hallgatói Ösztöndíj elnyerése – záró beszámoló kiváló minősítéssel
2014. Sófi József Ösztöndíj Konferencia – részvétel (PhD kategória)
2015. Sófi József Ösztöndíj Konferencia – 3. helyezés (PhD kategória)
2015. Magyar Immunológiai Társaság 44. vándorgyűlése, Velence – Absztrakt pályázat 1. díj
2016. Sófi József Ösztöndíj Konferencia – 2. helyezés (PhD kategória)