

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Az adult *Drosophila melanogaster* szesszilis
szövetét kialakító faktorok azonosítása és
jellemzése

Abonyi Csilla

Biológus Msc szakos hallgató

II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezető: Dr. Andó István

Belső konzulens: Dr. Török Tibor

2012

Tartalomjegyzék

Bevezetés:	3
<i>A Drosophila melanogaster</i> , mint modellszervezet	3
<i>A Drosophila melanogaster</i> természetes immunitása	3
<i>A Drosophila melanogaster</i> vérsejt típusai	4
A vérsejtek eredete	5
<i>A Drosophila melanogaster</i> vérsejt- kompartmentumai	6
Előzmények és célkitűzés	9
Anyagok és módszerek	11
<i>Drosophila</i> törzsek	11
Anyagok	12
Módszerek	12
Eredmények	14
Összefoglalás	17
Tervek	18
Irodalom	20
Köszönetnyilvánítás	23
Nyilatkozat	24

Bevezetés

***A Drosophila melanogaster*, mint modellszervezet:**

A *Drosophila melanogaster*, azaz ecetmuslica, számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, melyek az egyik legkedveltebb modellszervezetté tették. Laboratóriumban könnyen fenntartható, rövid az életciklusa, alacsony kromoszómaszámmal rendelkezik (négy pár), egyes mutációk fenotípusa könnyen észrevehető és markerként használható, ami megkönnyíti mutációk izolálását és fenntartását, valamint rendkívül ellenálló a genetikai módosításokkal szemben. Ezen tulajdonságai lehetővé tették, hogy számos, szinte valamennyi génre kiterjedő mutánsgyűjtemények előállítását, amelyek a genetikai analízis alapjául szolgálnak. Mivel az ecetmuslicában könnyen követhetők a fenotipikus változások, egyes mutációk hatásai *in vivo* is tanulmányozhatók. Az *in vivo* vizsgálatok egy újabb szintjét jelentette a GAL4/UAS alapú transzgenikus rendszer létrehozása (Phelps és Brand, 1998), mellyel lehetővé vált a génexpressziós mintázatok követése az élő állatban, valamint a szövetspecifikus mintázatban történő géncsendesítés illetve fehérje-túltermelés.

A *D. melanogaster* védekező rendszere a természetes (veleszületett) immunitás elemeiből épül fel, mely gerinces szervezetekben is hasonló egységekből áll, azonban ez utóbbiaknál az ősi természetes immunitás szoros együttműködésben van a filogenetikailag újabb, kizárólag a gerincesekre jellemző adaptív immunitással. A természetes immunitás elemei erősen konzerváltak (pl.: bekebelezés, antimikrobiális peptid termelés stb.), amely lehetővé teszi, hogy a *D. melanogaster* modellszervezetként használjuk a veleszületett immunitás vizsgálatában, és az eredményekből az egész állatvilágra érvényes következtetéseket vonjunk le.

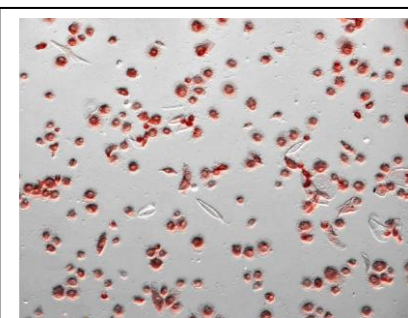
***A Drosophila melanogaster* természetes immunitása:**

A természetes immunitás mechanizmusait két csoportra különíthetjük el. Az első csoportba a humorális elemek tartoznak, mint az antimikrobiális peptid termelés, a melanizációs folyamatok, és a proteolitikus láncreakciók működése (Hultmark, 2003). A másik csoportot a sejt közvetítette immunreakciók képezik. Ide tartozik a bekebelezés és tokképzés folyamata, melyeknek végrehajtó elemei a vérsejtek, azaz a hemociták. A *Drosophila melanogaster*-ben három fajta effektor vérsejt található: a plazmatociták, a kristálysejtek és a lamellociták (Rizki és Rizki, 1980; Brehélin, 1982).

A Drosophila melanogaster véresejt típusai:

Az *ecetmuslica* véresejtjeit kezdetben a morfológiai különbségek, majd funkcionális vizsgálatok alapján kategorizálták. A hemocitákat négy különböző osztályba soroljuk. A kis, kerek sejtek a plazmatociták, a kristály-zárványokat tartalmazó kristálysejtek, a nagy, lapos elongált lamellociták és a hemocita prekursor sejtek (Rizki és Rizki, 1980; Brehélin, 1982). Munkacsoportunk létrehozott egy molekuláris panelt, melynek segítségével a véresejtek génexpressziós mintázatuk alapján különböztethetők meg, és így a különböző differenciáltsági szinten lévő véresejtek is elkülöníthetővé válnak (Kurucz és mts.-i, 2007b).

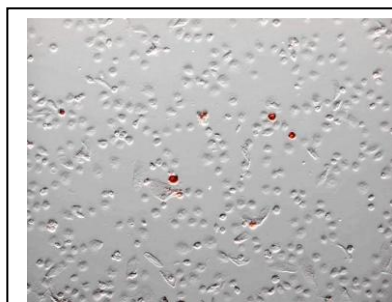
A plazmatociták kicsi, (8-10 μm) szférikus sejtek melyek képesek az apróbb részecskék bekebelezésére (1. ábra). Ezek a sejtek alkotják a hemociták legnagyobb alpopulációját, a véresejteknek több mint 98%-át mind lárvában, mind a felnőtt egyedekben. A bekebelezés mellett a tokképzésben és antimikrobiális fehérjék termelésében is részt vesznek (Brehélin, 1982; Evans és



1. ábra: Plazmatociták

mts.-i, 2003). A plazmatociták felszínén több, a fagocitózisban résztvevő transzmembrán receptor található (Somogyi és mts.-i, 2008), többek között a Nimrod C1 (NimC1), amely utóbbi plazmatocita-specifikus expressziója lehetővé teszi plazmatocita-markerként történő használatát. A NimC1 EGF-szerű ismétléseket (NIM-repeat-eket) tartalmaz, és egy transzmembrán régiója van (Kurucz és mts.-i, 2007a). A NimC1 gén a rovarokban rendkívül konzervált *nimrod* géncsaládba tartozik (Somogyi és mts.-i, 2008), mely egy feltehetően funkcionális egységet képező kromoszómarégiót is meghatároz (Somogyi és mts.-i, 2010). Kiemelkedő jelentőségű az Eater receptor, melynek kifejeződése a véresejtekre korlátozódik, és elsődleges szerepe van a sikeres és hatékony bekebelezésben (Kocks és mts.-i, 2005).

A kristálysejtek mérete és alakja hasonlít a plazmatocitákhoz, azonban citoplazmájukban található zárványok könnyen elkülöníthetővé teszik őket (2. ábra). A zárványokban a fenoloxidáz kaszkád komponensei találhatóak meg, melyek elengedhetetlenek a melanizációs folyamatokban. A kristálysejtek a hemociták legkisebb alpopulációját képezik, kevesebb, mint 1%-ot, mind a

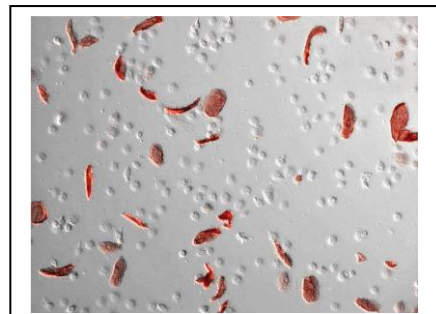


2. ábra: Kristálysejtek

lárvális, mind az adult stádiumban (Rizki és Rizki, 1959; Nappi és mts.-i, 1995). (Ezen sejtek

specifikus markerei a C1 [Tina Trenczek, Giessen, Németország, személyes közlés], C2, C3, C4, C5 [Kurucz és mts.-i, 2007b]).

A lamellociták, melyek a tokképzésben vesznek részt, a legnagyobb immunsejtek *D. melanogaster*-ben, átmérőjük 25-40 μm (Brehélin, 1982)(3. ábra). Ez a sejttípus csak lárvában figyelhető meg, adultban nem fordul elő. Ezek a sejtek immunindukció nélkül csak rendkívül kis számban találhatók meg harmadik stádiumú lárvákban, közvetlenül bábozódás előtt. Immunindukció hatására



3. ábra: Lamellociták

azonban számuk, részben a plazmatociták lamellocitává történő differenciálódásának eredményeként (Honti és mts.-i, 2010), megemlekedik. A folyamat molekuláris háttere alig ismert, az azonban bizonyított, hogy bizonyos fagocitózisra képes, kis, kerek sejtek átalakulnak diszkoidális sejtekké, melyek egy része még képes fagocitálni, illetve a plazmatocitákra jellemző markereket hordoz. Ezekből a differenciálódás végére ellaposodott, elnyúlt vérsejtek keletkeznek, melyek elvesztették bekebelező képességüket, és génexpressziós mintázatuk is a lamellocitákra jellemző (Honti és mts.-i, 2010).

A vérsejtek eredete:

A rovarok vérsejtképzésben szerepet játszó transzkripciós faktorok az evolúció során erősen konzerváltak, az ezeket kódoló gének homológjai megtalálhatók a gerinces szervezetekben, így az emlősökben is. Ezek közé tartozik a GATA transzkripciós faktor családdhoz tartozó *serpent* gén, melynek emlősökben megtalálható homológja a GATA, illetve ezek kofaktora *Drosophilában* a U-shaped, emlősben pedig a Friend of GATA (FOG). A *Serpent* minden embrionális hemocita prekursor sejtben expresszálódik, amelyek később plazmatocitákká és kristálysejtekké differenciálódnak (Fossett és Schulz, review, 2001).

A hemociták a középső csíralemezből, azaz az embrionális mezodermából származnak. Keletkezésük két hullámban történik, két különböző mezoderma szegmensből. Az első vérsejt-populáció a korai embrionális állapotban, már blasztoderma stádiumban determinálódik a feji (prokefalikus) mezodermából. Ebből a mezoderma sávból embrionális makrofágok és kristálysejtek származnak (Holz, 2003). Az embrionális makrofágok egy genetikailag determinált útvonalat járnak be az embrió fejlődése során, mely útvonal mentén a szövetek fejlődése során elpusztuló sejtekből származó apoptotikus törmeléket kebelezik be (Tepass és mts.-i., 1994; Traver és Zon, 2002). A kristálysejtek nem vándorolnak, hanem az

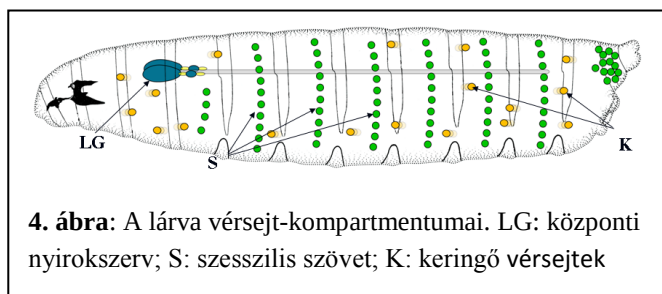
anterior középbél területén maradnak (Lanot és mts.-i., 2001; Lebestky és mts.-i., 2000). A második differenciálódási hullám az embriógenézis vége előtt történik a laterális kardiogén mezodermből, mely sejtpopuláció a központi nyirokszervet fogja felépíteni (Evans, és mts.-i., 2003; Holz és mts.-i., 2003). A különböző mezoderma szegmensekből származó vérsejtek későbbi sorsa nehezen volt követhető (Holz és mts.-i., 2003), azonban napjainkban már rendelkezésre áll egy olyan sejtvonal jelölő rendszer, amely lehetővé teszi a különböző sejtípusok eredetének a meghatározását (Honti és mts.-i., 2010). Az embrionális makrofágokban aktív *croquemort-GAL4* (*crq-GAL4*) és az embrió központi nyirokszervében kifejeződő *Dorothy-GAL4* (*Dot-GAL4*) meghajtóelemek felhasználásával végzett sejtvonaljelölésnek köszönhetően bizonyítást nyert, hogy a központi nyirokszerv a szesszilis szövetből és a keringéstől fizikailag és eredetét tekintve is elkülönült niche-t képez.

A lamellocitává történő differenciálódás képességét sokáig a központi nyirokszervben található prekurzor-sejteknek tulajdonították (Crozatier és mts.-i., 2004), azonban munkacsoportunkban elvégzett anatómiai (Márkus és mts.-i., 2009) és genetikai (Honti és mts.-i., 2010) kísérletek egyöntetűen rámutattak, hogy a lamellociták eredhetnek mind a központi nyirokszervből, mind pedig a szesszilis szövetből és keringésből.

A laboratóriumunkban korábban elvégzett kísérletek rávilágítottak, hogy a bábállapot során mind a szesszilis szövet, mind pedig a központi nyirokszerv felbomlik és sejtjei a keringésbe kerülnek, így az adult keringésében jelenlévő hemociták mindkét sejtvonalból származnak.

A *Drosophila melanogaster* vérsejt-kompartmentumai

A *Drosophila melanogaster* lárva vérsejtjei három kompartmentumba szerveződnek (4. ábra). Az első a központi nyirokszerv, mely a szívcső körül helyezkedik el, és négy-hat pár lebeny építi fel (Lanot és mts.-i., 2001).

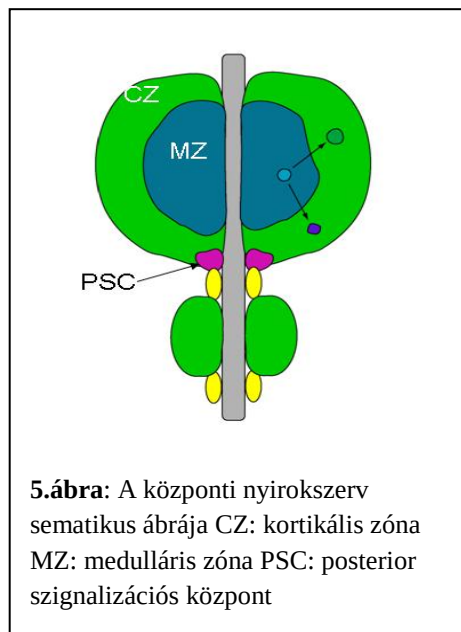


4. ábra: A lárva vérsejt-kompartmentumai. LG: központi nyirokszerv; S: szesszilis szövet; K: keringő vérsejtek

Az elsődleges lebeny 3 funkcionális zónára különíthető el. A belső medulláris zónát differenciálatlan, osztódásra képes prohemociták építik fel. A külső rész a kortikális zóna, melynek sejtjei főleg plazmatociták és kisebb hányaduk kristálysejt. Ennek a lebenynek a poszterior végén található egy kitüntetett régió, a poszterior szignalizációs központ (PSC)(5. ábra), melynek pontos feladata még nem tisztázott, de feltételezik, hogy nyúlványokkal

kapcsolódik a medulláris zónához, és a prohemociták differenciálatlan állapotát tartja fenn a Hedgehog jelátviteli úton keresztül (Mandal és mts.-i, 2007). A központi nyirokszerv a többi vérsejt-kompartmentumtól elszigetelt mikrokörnyezetet alkot.

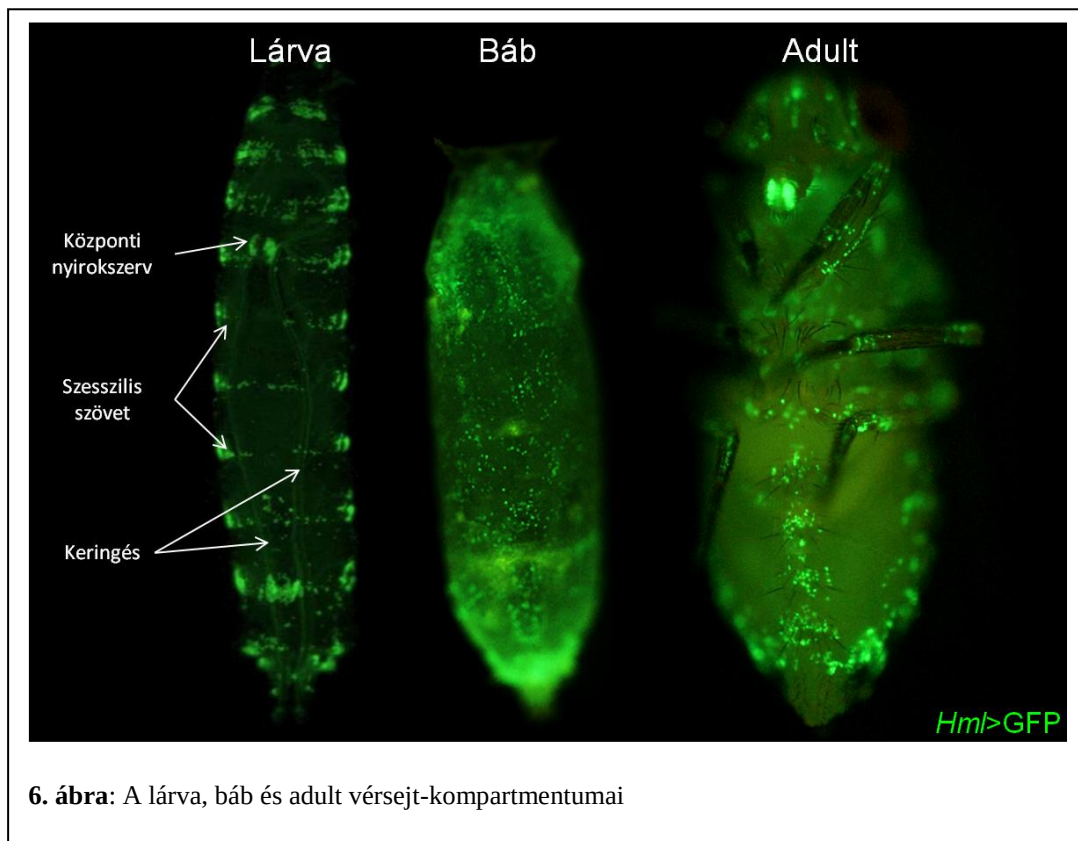
Immunindukció hatására a medulláris zóna mérete csökken, míg a kortikális zóna megnövekszik, mivel a prohemociták gyors differenciálódásnak indulnak. Ezt követően a központi nyirokszerv szerkezete felbomlik, hemociták válnak le a kortikális zónáról, melyek a keringésbe kerülve részt vesznek az immunválasz kialakításában (Sorrentino és mts.-i, 2002). Immunindukció nélkül a bábozódás során szintén felbomlik, és adultban nem alakul ki újra (Holz és mts.-i, 2003).



A második kompartmentumot a keringő vérsejtek alkotják. Az ízeltlábúak nyílt keringési rendszerrel rendelkeznek, azaz a hemolimfa szabadon kering a testüregben. Az immunsejtek nagy részét itt is a plazmatociták adják, és a kristálysejtek kisebb százalékban vannak jelen. A keringő vérsejtek száma a lárv fejlődése során folyamatosan növekszik: kezdetben körülbelül 200 sejtből áll, míg késői harmadik (vándorló) stádiumban már több mint 1000 sejt található ebben a kompartmentumban.

A harmadik kompartmentumot a testüreg falára kitapadt vérsejtek alkotják, melyet szesszilis szövetnek nevezünk. A kutikula alatt a sejtek kisebb szigetcsoportokat alkotnak, melyek plazmatocitákból, kristálysejtekből, valamint az eddig használt differenciálódási markereket (Kurucz és mts.-i, 2007b) nem hordozó, prekursor-szerű sejtekből állnak. A szesszilis szövet elrendeződése szabályos sávotzottságot mutat vad típusú lárvában. A lárv poszterior végén egy sejtcsoportosulás, a PHT (posterior hematopoietic tissue) figyelhető meg, melynek jelentősége még ismeretlen. Parazitoid darázs általi immunindukció hatására a kitapadt vérsejtek a keringésbe kerülnek, mely folyamatnak a molekuláris háttere kevésbé ismert (Márkus és mts.-i; 2009, Honti és mts.-i, 2010). A szesszilis szövet immunindukció nélkül a harmadik lárvastádium végén felbomlik, és a bábállapot végén rendeződik újjá (6. ábra). Az adulta jellemző szesszilis szövet anatómiai mintázata azonban alapvetően különbözik a lárvától. A dorzális oldalon elszórtan található a kitapadt sejtek, míg a ventrális oldalon egy hosszanti sávba rendeződtek. Laboratóriumunkban sikerült kimutatni,

hogy az adult szesszilis vérsejtjei is bekebelezik a baktériumokat, valamint BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) beépülésével végzett kísérletekből kiderült, hogy míg a lárva szesszilis szövetében intenzív sejtosztódás zajlik, addig az adult állatban ez nem figyelhető meg. További különbség a lárva és az adult szesszilis szöve között, hogy mechanikai indukció hatására (szúrás steril kapillárisal) a lárva szesszilis szöve mobilizálódik, míg a kifejlett egyedben ez a jelenség nem figyelhető meg (Csordás Gábor, személyes közlés).

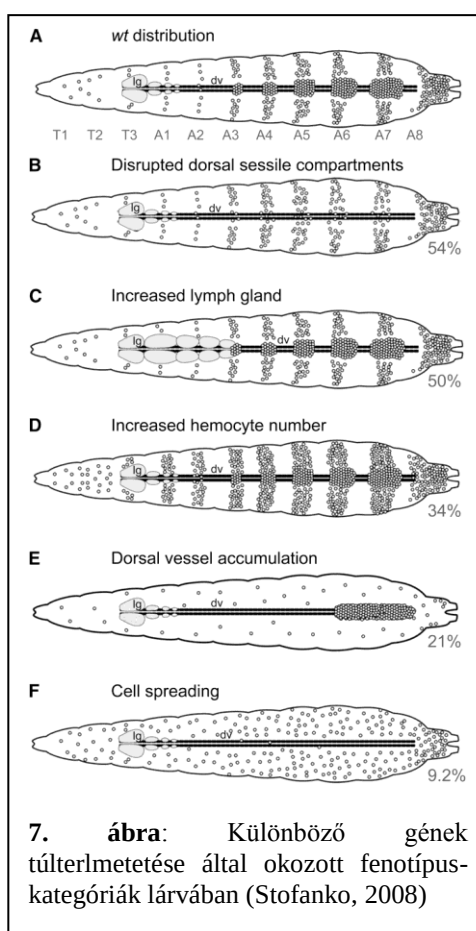


6. ábra: A lárva, báb és adult vérsejt-kompartmentumai

Előzmények és célkitűzés

Az védekező mechanizmusokban szerepet játszó gének azonosításán *D. melanogaster*ben számos kutatócsoport dolgozott (Rorth, 1996; Bellen és mts.-i, 2004; Zettervall és mts.-i, 2004;). Vizsgálatok folynak az evolúció során konzervált homológ gének, a szabályozási mechanizmusok és differenciálódási lépések felderítésére. Munkacsoportom kutatásai nagy részét *D. melanogaster*en végzi. Célunk feltárni és megérteni, hogy hogyan működik ennek a fajnak az immunrendszere, mely területen még számos a megválaszolatlan kérdés.

A *D. melanogaster* lárvájában a vérsejtképző szövetek, sejtek és a védekező mechanizmusok a létező molekuláris, és *in vivo* markereknek köszönhetően, viszonylag jól ismertek. Számos *D. melanogaster* vérsejt-specifikus meghajtóelem létezik (pl.: Hemese, Hemolektin, Peroxidasin), melyeknek segítségével lehetőségünk van egyes géntermékek túltermeltetésére vagy expresszió szintjének és/vagy mintázatának a meghatározására. A kutatócsoportunk által létrehozott sejtvonál-jelölő rendszer alkalmas a vérsejt-vonalak fejlődésének vizsgálatára, és a sejtek további sorsának megfigyelésére (Honti és mts.-i, 2010). A közelmúltban egy genetikai screenben számos, a kompartmentumok szerkezetét szabályozó gént sikerült azonosítani lárvában (Stofanko és mts.-i, 2008). A kísérleteikben *Peroxidasin-GAL4*, *UAS-*



GFP rendszert használtak, hogy túltermeltessenek különböző géneket. A különböző kompartmentumok szerkezetében bekövetkezett fenotípus-változásokat kategóriákba sorolták (7. ábra). Márkus Róbert csoportunknál folytatott kísérletei során derült fény az Eater fagocitózis receptor további szerepére *D. melanogaster* lárvában. Kiderült ugyanis, hogy az Eater RNS interfenciával való csendesítése drasztikus hatással van a lárv szesszilis szövetére. Az RNS interferencia konstruktot a vérsejt-specifikus *Hml-GAL4*

meghajtóelemmel kifejezve megfigyeltük, hogy a szesszilis szövet jellemző mintázata nem alakul ki, azonban a keringésben megemelkedik a vérsejtek száma. Ebből arra következtettünk, hogy az Eater receptor feladata nem csak a bekebelezés, hanem fontos szerepe van a hemociták testüreghez történő tapadásában is.

A szesszilis szövetet sokáig csak lárvában sikerült azonosítani (Lanot és mts.-i, 2001), azonban munkacsoportunknak sikerült adult állatokban is igazolni jelenlétét. A *D. melanogaster* adultjában így két vérsejt-kompartmentum figyelhető meg: a szesszilis szövet és a keringés. Eddig még nem voltak ismereteink arról, hogy miként szerveződik újjá a szesszilis szövet, és hogy milyen faktorok, gének befolyásolják annak szerkezetét. Kísérleteim középpontjában az adult szesszilis szövet vizsgálata áll. Céljaim között szerepelt, egy olyan genetikai rendszer létrehozása, amely alkalmas az adult szesszilis szövetének szerkezetét befolyásoló gének azonosítására, és a fenotípus kialakításában játszott szerepüknek a vizsgálatára. További kísérleteinkben pedig az Eater receptor adultban betöltött szerepét vizsgáljuk.

Anyagok és módszerek

***Drosophila* törzsek:**

Hml>GFP: (*hemolentinΔGAL4*, *UAS-GFP*): ebben a vonalban a vérsejtek a hemolentin-reguláló elem vezérlésével fejezik ki a riporter-fehérjét.

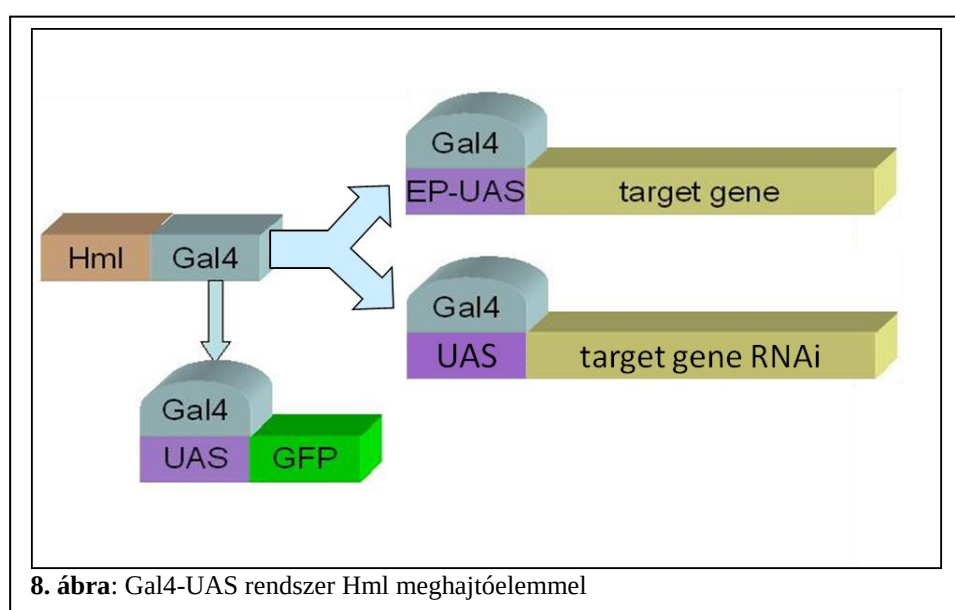
w; *Hml>GFP*; *l(3)mbn-1/TM3SerGFP*

w; *SM6b/Sp*; *CxD/TM3*

További törzsek: Bloomington *Drosophila* Stock Centerből származó különböző P{EP}(EP) és P{EPgy2}(EY) transzpozon inszerciókat tartalmazó törzsek:

1. $y^1 w^{67c23}$; P{EPgy2}CR31044^{EY03350}
2. $y^1 w^{67c23}$; P{EPgy2}CG10585^{EY00037}
3. $y^1 w^{67c23}$; P{EPgy2}CG12316^{EY07889}
4. $y^1 w^{67c23}$; P{EPgy2}CG11226^{EY16243}

Homozigóta vonalakat hozunk létre, melyekben megtalálható a vérsejt-specifikus *Hml-Gal4* meghajtóelem *UAS-GFP* riporter génnel kapcsolva, illetve a vizsgálni kívánt gént túltermelni képes transzgén (EP elem), melyet a meghajtóelemünkkel túltermeltetünk, avagy csendesítünk. A rendszerben lévő GFP riporter gén segítségével megfigyelhetjük a szesszilis szövetben bekövetkező változásokat (8. ábra).



Eddig vizsgált törzsek:

1. w; *Hml>GFP*; + → kontroll törzs
2. CG31044
3. CG10585
4. CG12316
5. CG11226
6. Hop^{tum}
7. w; *Hml>GFP*; *eaterRNSi/TM3SerGFP*

Anyagok:

Drosophila Ringer oldat: 7,5g NaCl, 0,35g KCl, 0,21g CaCl₂, 1000ml dH₂O, pH 7,0

PBS: 0,13M NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄, pH 7,4

Fedő médium: 3,6 ml 1M Tris (pH 8,6), 9 ml glicerol, 26,4 ml dH₂O

PTU: 1-fenil-2-tiourea (Sigma)

DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenylindole (3mg/ml) (Sigma)

Módszerek:

Élő állat vizsgálata (in vivo):

Leica fluoreszcens sztereo-mikroszkóp segítségével, GFP szűrőn át figyeltük meg a lárva illetve az adult szesszilis szövetének felépítését, és digitális felvételeket készítettünk a QCapture programmal.

Kutikula-preparátumok készítése és keringő vérsejtek izolálása:

A felnőtt állatok szesszilis szövetét a potroh kutikulájának feltárásával is megvizsgáltuk. Éterrel altatott felnőtt egyedek potrohának poszterior végén kis bemetszést ejtettünk. Az állat torába szúrt üveg kapillárison keresztül Ringer-oldatot folytattunk keresztül az állat testüregében, izolálva ezzel a keringő vérsejteket.

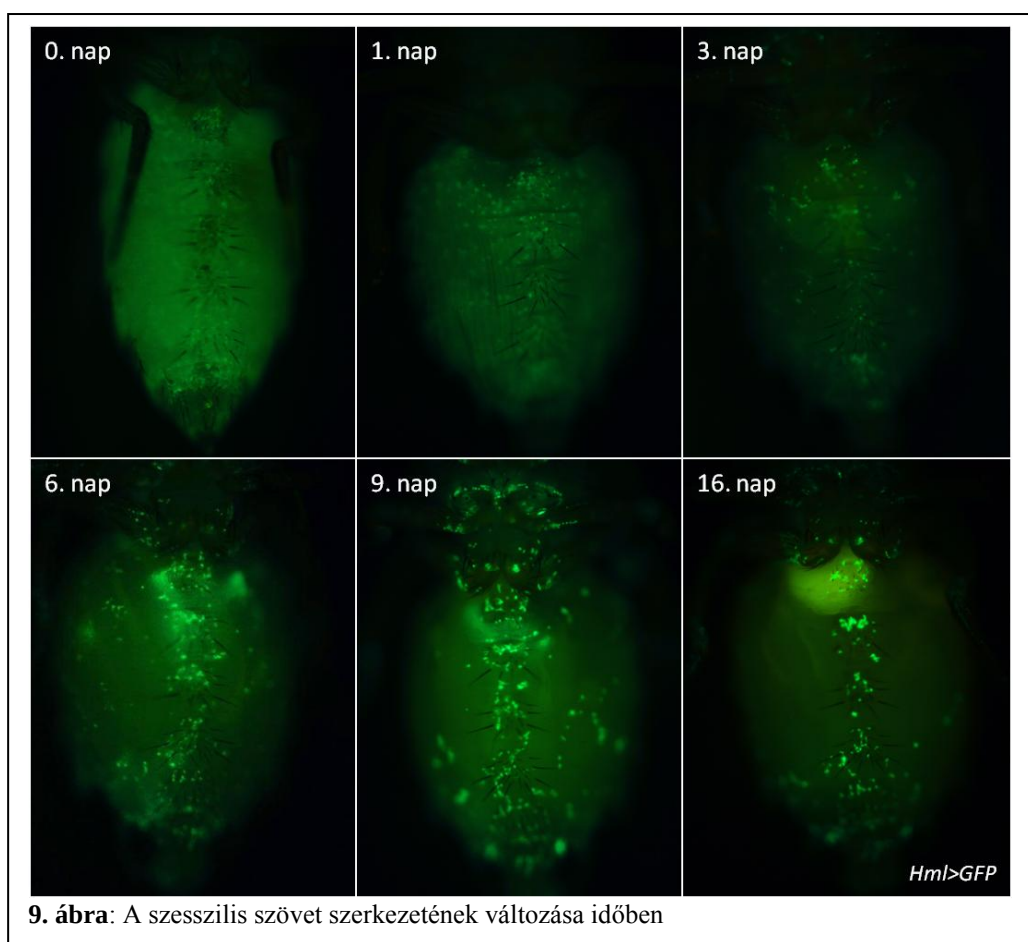
Az innen származó mintához 5 µl PTU-t tartalmazó Ringer-oldatot adtunk, a melanizációs folyamatok megakadályozása végett. Az immunsejteket 45 percig tapasztottuk mikroszkópos tárgylemezre nedveskamrában. A mintákat 2%-os paraformaldehiddel fixáltuk 12 percen keresztül. Az első mosást PBS-sel végeztük 5 percig, a másodikat DAPI-t tartalmazó PBS-sel 10 percig, majd ismét PBS-sel mostuk 5 percig. A mintákat ezt követően Fluoromount fedőmédiummal fedtük.

A keringő vérsejtek eltávolítása után az állat potrohának dorzális oldalán hosszanti vágást végeztünk, a kutikulát óvatosan széthajtogattuk és minutia-tűk segítségével rögzítettük. A szesszilis szövetet az ovárium, a zsírtest, és bélrendszer) eltávolításával tettük láthatóvá. A preparálást *Drosophila* Ringer oldatban végeztük. A szétnyitott kutikulát 2%-os paraformaldehiddel 12 percen át fixáltuk. A mintát ezután a vérsejtpreparátumokkal megegyező módon mostuk. A preparátumokat tárgylemezre helyeztük, és fedő-médiummal rögzítettük, és konfokális mikroszkóppal vizsgáltunk. A minták képét digitális felvételek formájában rögzítettük.

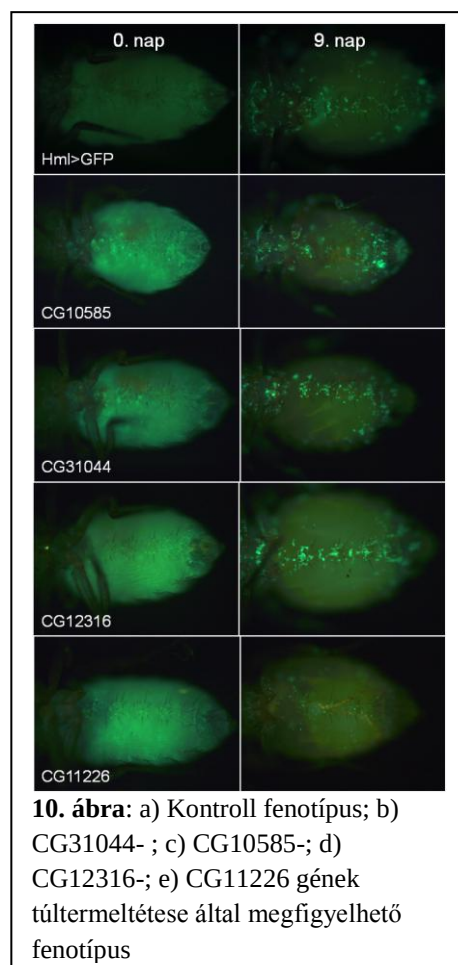
Eredmények

Élő állat vizsgálata:

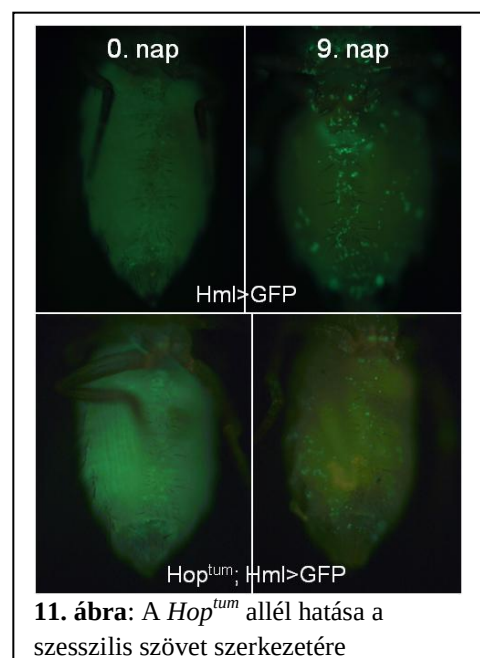
Az eddigi megfigyelések alapján az adultban a szesszilis szövet mintázatát a hátoldalon szétszórtan kitapadt, míg a hasi oldalon középen, hosszanti sávba rendeződött vérsejtek alkotják. Részletes vizsgálataink során azonban megfigyeltük, hogy ez a minta egyedenként jelentős eltérést mutathat. Ezért megvizsgáltuk, hogy a mintázatot mennyire befolyásolja a vizsgált állatok kora. Megfigyeléseinkből kiderült, hogy a kifejlett állat szesszilis szövetének szerkezete az életkorral dinamikusan változik (9. ábra). A fiatal (0-2 nap) adultokra jellemző a tipikus mintázat (a hasi hosszanti sáv és háti diffúz elrendeződés), azonban nehezen vizsgálható az erős autofluoreszcencia miatt. Később (2-6 nap) ez a mintázat a hasi oldalon is szétszórt eloszlást mutat. A következő napokban (6-9. nap) fokozatosan helyreáll a hasi oldal mintázata, és ismét megfigyelhető a kezdeti fenotípus, azonban jobban észlelhető, mert ekkora a kutikula autofluoreszcenciája megszűnik. Így vizsgálatainkat 9 napos vagy annál idősebb állatokon végeztük.



A *CG31044*; *CG10585*; *CG12316* és *CG11226* gének expressziójának emelése lárvában különböző fenotípusokat eredményezett. A *CG31044* és *CG10585* gén fokozott kifejeződése a lárv szesszilis szövet szerkezetének felbomlásához vezetett (7.B ábra), és az utóbbi esetén csökkent vérsejtszámot is észleltek. A *CG11226* és *CG12316* gének túltermeltetése esetén a testüreg falához kitapadt vérsejtek száma megemelkedett (7.D ábra)(Stofanko és mts.-i, 2008). Vizsgálatink során azonban nem tapasztaltunk változást az adult szesszilis szövet szerkezetében. Megfigyelhető volt az állatokban a szesszilis szövet átrendeződése, és a 9. napra kialakult a jellemző szesszilis szövet mintázat (10. ábra). Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a lárv és adult szesszilis szövet szerkezetének kialakításában különböző faktorok játszanak szerepet.

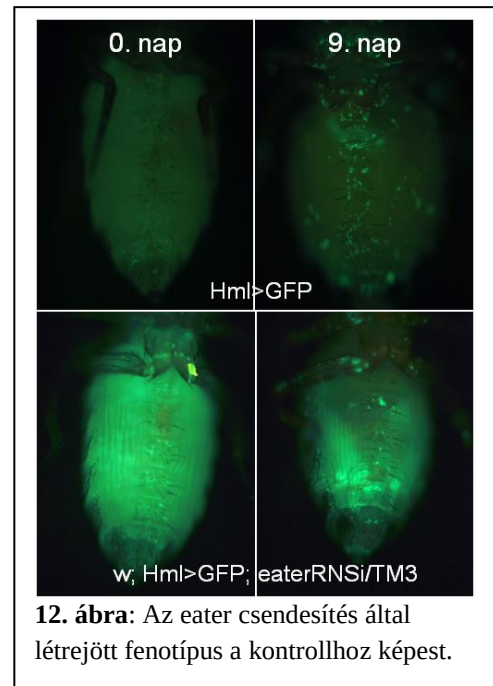


A *Hop^{tum}*; *Hml>GFP* genotípusú lárvákban a keringő vérsejtszám sokszorosára emelkedik, ám a szesszilis szövet szerkezete megegyezik a kontroll lárváéval (*Hml>GFP*). A kifejlett egyedek szesszilis szövetére azonban az a jellemző, hogy a kitapadt vérsejtek száma drasztikusan csökkent, ezért nincs megfigyelhető mintázata (11. ábra). Ebből arra következtetünk, hogy a *Hop^{tum}* allél által okozott JAK/STAT aktivációjának emelése, eddig ismeretlen okból, gátolja adultban a vérsejteknek a testüreg falához történő kitapadását.

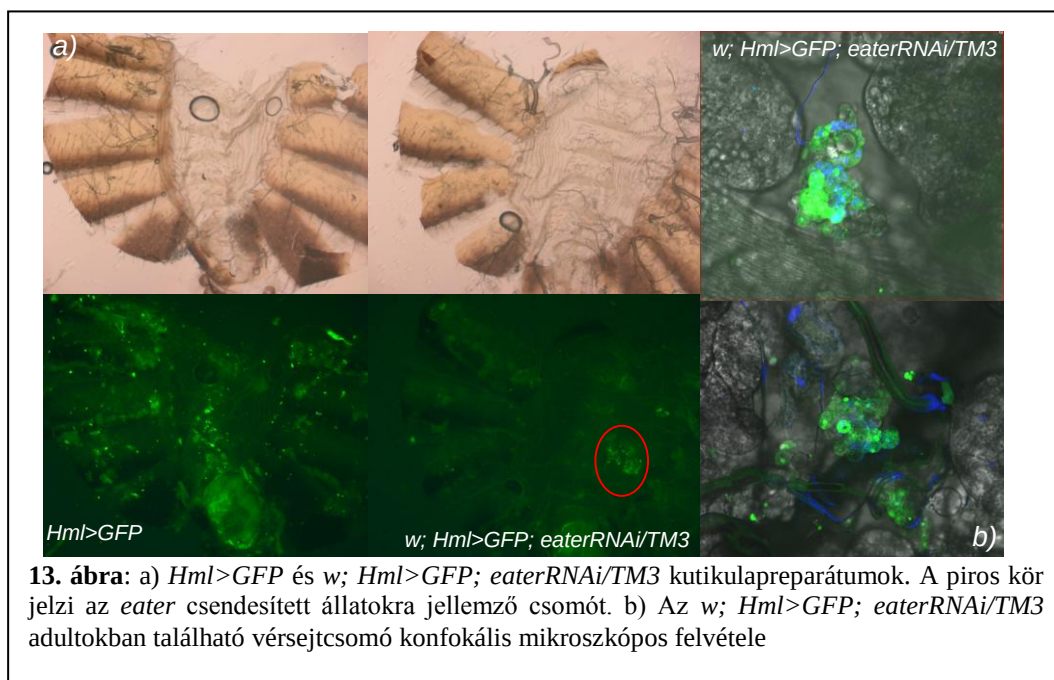


Az *eater* gén RNS interferenciával történő csendesítése (*Hml-GAL4*, *UAS-GFP*; *UAS-eaterRNAi/TM3*) mind lárvában, mind adultban a szesszilis szövet mintázatának felbomlását eredményezi: a kifejlett állat testüregének falán csak elvétve figyelhetők meg kitapadt

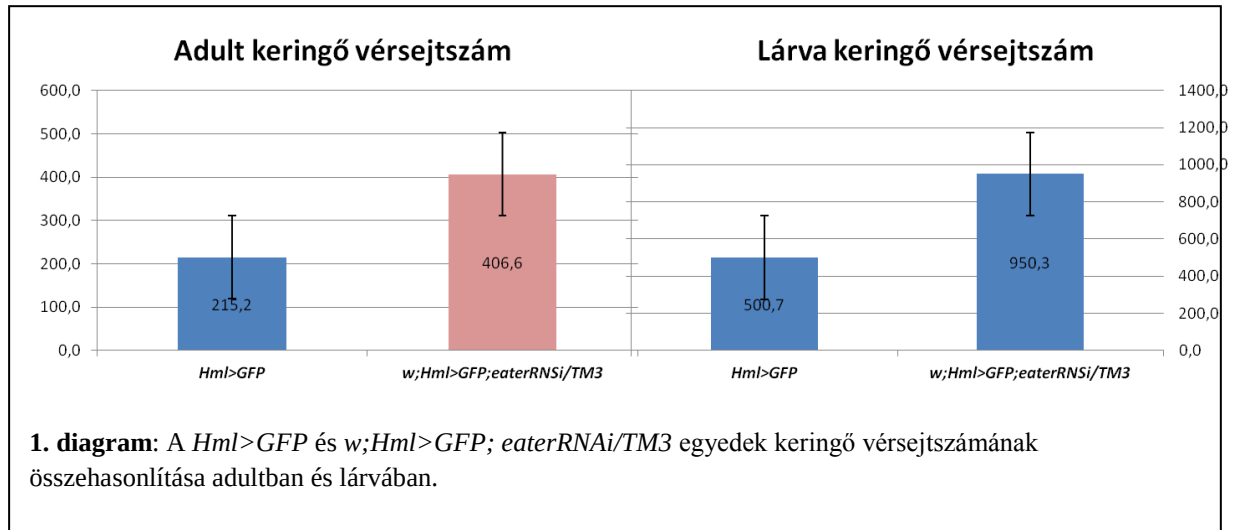
vérsejtek (12. ábra). A kutikulapreparátum és az izolált keringő vérsejtek vizsgálata során figyeltünk meg vérsejtekből álló aggregátumokat (13.a ábra). A konfokális mikroszkópos analízis során láttuk, hogy az immunsejtek egymáshoz, és egyéb szövetekhez tapadva, vérsejtcsomókat alkotnak, amely a kontroll állatra nem jellemző (13.b ábra). Az izolált keringő vérsejtek statisztikai elemzése során kiderült, hogy 2-3x több keringő vérsejt található az *eater* csendesített adultokban a kontrollhoz képest (1. diagram). Ez a tapasztalat egyezik a korábbi lárvában tett megfigyelésekkel (Márkus R., személyes közlés).



12. ábra: Az *eater* csendesítés által létrejött fenotípus a kontrollhoz képest.



13. ábra: a) *Hml>GFP* és *w; Hml>GFP; eaterRNAi/TM3* kutikulapreparátumok. A piros kör jelzi az *eater* csendesített állatokra jellemző csomót. b) Az *w; Hml>GFP; eaterRNAi/TM3* adultokban található vérsejtcsomó konfokális mikroszkópos felvétele



Összefoglalás

D. melanogaster a veleszületett immunitás megismerésének közkedvelt vizsgálati alanya. Eddig szerzett ismereteink nagyobb része lárvában zajló folyamatokra irányul, míg az adult szesszilis szövetéről szinte semmilyen ismerettel nem rendelkezünk. Nem túl régi megfigyelés az, hogy az adult is rendelkezik szesszilis szövettel, viszont a két vérsejtkompartimentum között számos különböző tulajdonság figyelhető meg. A lárva szesszilis szigeteinek vérsejtjei képesek osztódásra, melyek immunindukciót követően a keringésbe kerülnek, és részt vesznek az effektor sejt populáció kialakításában az immunreakció során. Ezzel ellentétben az adult szesszilis szövetében nem figyelhető meg sejtosztódás, és sem immunindukció, sem egyéb mechanikai hatásra nem válnak vérsejtjei a testüreg faláról.

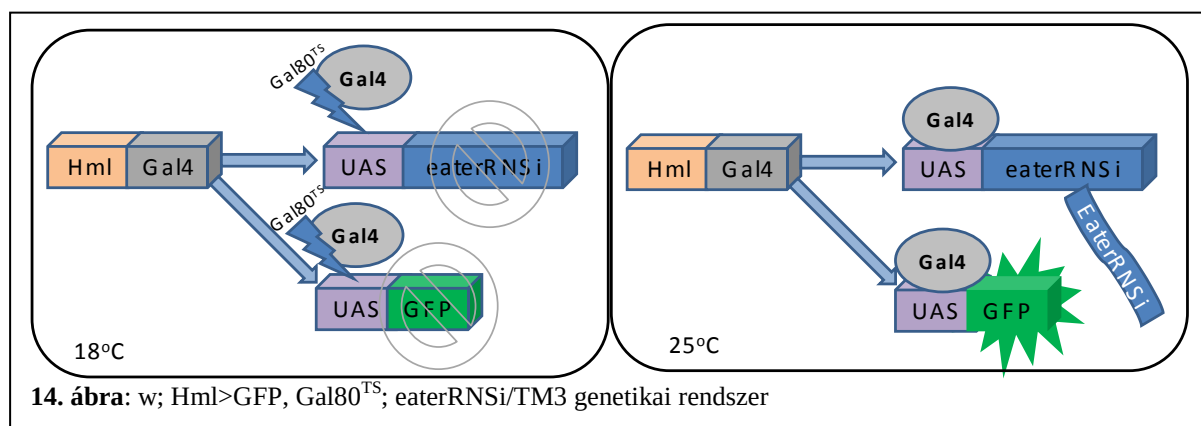
Megfigyeléseink során azonban kiderült, hogy az adult szesszilis szövetben is történnek változások, melyek oka és mechanizmusa eddig ismeretlen. Laborunknak eddig két, az adult szesszilis szövet szerkezetét meghatározó gént azonosítottunk. A *hopscotch* gén *Hop^{Tum}* funkciónyeréssel allélja és az *eater* gén csendesítése egymáshoz hasonló fenotípust okoz adultban, ami a szesszilis immunsejtek drasztikus csökkenését jelenti. Érdekes és fontos kérdés, melyre jelenleg még nem tudjuk a választ, hogy az Eater fagocitózis receptor a vérsejtek a testüreg falához való kitapadáshoz, vagy a szerkezet fenntartásához szükséges. Kutatócsoportunkban jelenleg is zajlanak e kérdés megválaszolásához szükséges kísérletek. Az, hogy az *eater* csendesítése mind lárvában, mind adultban gyakorlatilag megszünteti a szesszilis szövetet, arra következtetünk, hogy a szövet sejtjei lárvában és adultban valószínűleg ugyanazzal a mechanizmussal, hasonló vagy azonos molekulán keresztül kapcsolódnak a testüreg falához.

Terveink

Szeretnénk az általunk létrehozott rendszer alkalmazásával folytatni a genetikai screent, és további géneket azonosítani, melyek szerepet játszanak az adult szesszilis szövet szerkezetének kialakításában.

Továbbra is folytatjuk vizsgálatainkat az eddig azonosított két génnel (*eater* és *Hop^{tum}*), melyek drasztikus hatással vannak a szesszilis szövet felépítésére.

Szeretnénk megérteni, hogy az *eater* csendesítése miként játszik szerepet a szesszilis szövet kialakításában. Létrehoztunk egy vizsgálati rendszert (15. ábra), melynek segítségével megválaszolhatjuk azt a kérdést, hogy az Eater a szesszilis szövet szerkezetének létrehozásához, fenntartásához, vagy mindkét folyamathoz szükséges. A kísérletben *w; Hml>GFP; eaterRNSi/TM3* genetikai konstrukciót kiegészítjük egy hőérzékeny fehérjét termelő *Gal80^{TS}* transzgénnel. A hőérzékeny *Gal80^{TS}* alacsony hőmérsékleten megakadályozza, az *eater* gén lekapcsolását a GAL4 transzkripció faktor gátlásán keresztül. Hőmérsékletemeléssel azonban az általunk választott időpontban a *Gal80^{TS}* degradálódik, felszabadítva a GAL4 faktort, amely csendesíti az *eater* gént RNS interferenciával (14. ábra). Amennyiben az Eater kizárólag a vérsejtek kitapadásához szükséges, akkor a szesszilis szövet várhatóan normális szerkezetet fog mutatni az *eater* gén csendesítése után is. Azonban ha szükséges a szesszilis szövet szerkezetének megtartásához, akkor az *eater* gén csendesítésével a szerkezet felbomlik.



Eddigi eredményeink rávilágítanak, hogy a *D. melanogaster* szesszilis szövetének tulajdonságai mennyire különböznek a lárva és adult fejlődési stádiumokban. További vizsgálatainkkal szeretnék közelebb kerülni a szesszilis szövet felépítésének, szerepének és újjászerveződésének teljes megértéséhez.

Irodalom

Bellen H.J., Levis R.W., Liao G., He Y., Carlson J.W., Tsang G., Evans-Holm M., Hiesinger P.R., Schulze K.L., Rubin G.M., et al. The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics*. 2004;167:761–781.

Brehélin, M. Comparative study of structure and function of blood cells from two *Drosophila* species. *Cell Tissue Res.*1982; 221, 607-615.

Crozatier M, Ubeda JM, Vincent A, Meister M. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue Collier. *PLoS Biol.* 2004;2:e196.

Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U: Thicker than blood: Conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis; *Developmental cell*. Vol. 5. 2003; 673 -690.

Fossett, N. and Schulz, R. A. Functional conservation of hematopoietic factors in *Drosophila* and vertebrates. *Differentiation* 2001; 69, 83- 90.

Holz A, Bossinger B, Strasser T, Janning W, Klapper R: The two origins of hemocytes in *Drosophila*; *Development* 130, 2003; 4955-4962

Honti V, Csordás G, Márkus R, Kurucz E, Jankovics F. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Mol Immunol.* 2010;47:1997–2004.

Hultmark D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 12–19.

Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, et al. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. 2005; *Cell* 123: 335–346.

Kurucz E., Vaczi B., Markus R., Laurinyecz B., Vilmos P., Zsamboki J., Csorba K., Gateff E., Hultmark D., Ando I. Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta. Biol. Hung.* 2007b; 58Suppl, 95-111.

Kurucz, É., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradzsky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E., Zettervall, C.J., Hultmark, D., Andó, I., Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr. Biol.* 2007a; 17, 649-654.

Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol*. 2001; 230(2):243–257.

Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U. Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 2000; 288, 146–149.

Mandal L, Martinez-Agosto JA, Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U: A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors; *Nature* vol. 2007; 446, 320-324

Markus R, Laurinyecz B, Kurucz E, Honti V, Bajusz I, et al. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:4805.

Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol*. 1995;68:450–456.

Phelps CB, Brand AH. Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods*. 1998;14:367–379.

Rizki TM, Rizki RM. Functional significance of the crystal cell in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J Biophys Biochem Cytol*. 1959;5:235–240.

Rizki, T.M., Rizki, R.M., Properties of larval hemocytes of *Drosophila melanogaster*. 1980; *Experientia* 36, 1223-1226.

Rorth P. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:12418–12422.

Somogyi K, Sipos B, Penzes Z, Kurucz E, Zsamboki J, et al. Evolution of genes and repeats in the Nimrod superfamily. *Mol Biol Evol*. 2008;25:2337–2347.

Somogyi, K., Sipos, B., Péntzes, Z., Andó, I. A conserved gene cluster as a putative functional unit in insect innate immunity. *FEBS Lett*. 2010; 584(21):4375:8.

Sorrentino RP, Carton Y, Govind S. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol*. 2002;243:65–80.

Stofanko M, Kwon SY, Badenhorst P. A misexpression screen to identify regulators of *Drosophila* larval hemocyte development. *Genetics*. 2008;180:253–267.

Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A. and Hartenstein, V. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. 1994; *Development* 120, 1829-1837.

Traver, D. and Zon, L. I. Walking the walk: migration and other common themes in blood and vascular development. 2002; *Cell* 108, 731-734.

Zettervall CJ, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, Kurucz E, et al. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. 2004; *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14192–14197.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Andó Istvánnak, hogy csatlakozhattam csoportjához. Szeretném megköszönni a megelőlegezett bizalmat, a türelmet és a segítőkészséget.

Köszönettel tartozom Csordás Gábornak iránymutatásáért, munkám segítéséért. Köszönöm, hogy minden kérdésemmel bizalommal fordulhattam hozzá, és mindenkor számíthattam rá..

Köszönöm Kovalcsik Olgának és Tápai Szilviának, hogy laboratóriumi munkám során eligazítottak és segítettek.

Köszönet jár a munkacsoport összes dolgozójának hasznos tanácsaikért és ötleteikért.

Nyilatkozat

Alulírott, **Abonyi Csilla**, a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- homozigóta vonalak létrehozása
- élő állatok mikroszkópos vizsgálata
- kutikulapreparátumok elkészítése
- keringő vérsejtek izolálása

végeztem el.

.....

aláírás

Szeged, 2012. december 07.