

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**Vérsejt-differenciálódás vizsgálata a *Drosophila melanogaster*
hematopoietikus kompartmentumaiban**

Varga Gergely István

Biológus MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Készült a

**Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai
Kutatóközpont Genetikai Intézet Immunológiai csoportjában**

Témavezető: Dr. Honti Viktor

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Bevezetés.....	4
2.1. A veleszületett immunitás és az ecetmuslica.....	4
2.2. A <i>Drosophila melanogaster</i> immunválasza:.....	4
2.3. A <i>Drosophila</i> lárva vérsejtképző kompartmentumai és vérsejtjei:.....	5
2.3.1. A keringő hemociták:.....	5
2.3.2. A központi nyirokszerv:.....	7
2.3.3. A szesszilis szövet:.....	7
2.4. A hemociták leszármazási vonalai és a vérsejtképző kompartmentumok fejlődése:.....	8
2.5. A sejtsorsok vizsgálatához alkalmazott kísérleti rendszerünk:.....	9
2.6. A <i>headcase</i> , a differenciálódás szabályozó faktora:.....	11
2.7. Az Eater a fagocitózis receptora:.....	12
3. Célkitűzések.....	13
4. Anyagok és módszerek.....	14
4.1. Felhasznált anyagok:.....	14
4.1.1. Pufferek, vegyszerek:.....	14
4.1.2. Felhasznált ellenanyagok:.....	14
4.2. Felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek:.....	14
4.3. Módszerek:.....	16
5. Eredmények és értékelésük.....	19
5.1. A <i>hdc</i> kifejeződésének <i>in vivo</i> követése:.....	19
5.2. A <i>hdc</i> csendesítő konstrukció hatékonyságának vizsgálata:.....	20
5.3. A <i>hdc</i> csendesítés lamellociták differenciálódására gyakorolt hatásának vizsgálata:.....	20
5.4. A <i>hdc</i> hatása a plazmatociták érésére:.....	21

5.5. Az <i>UAS</i> szekvenciák közötti esetleges kompetíció vizsgálata:	22
5.6. A szesszilis szövet szerkezetének <i>in vivo</i> vizsgálata:	25
5.7. A <i>hdc</i> csendesítésnek a szesszilis szövet felépítésére gyakorolt hatása:	26
5.8. Az <i>eater</i> csendesítés hatása a szesszilis szövet szerkezetére és dinamikájára:	26
5.9. A GAL4-független <i>Hml-GFP</i> konstrukciót hordozó vonalak vizsgálata:	28
6. Összefoglalás.....	30
7. Irodalomjegyzék.....	32
8. Köszönetnyilvánítás	35

2. Bevezetés

2.1. A veleszületett immunitás és az ecetmuslica

Az evolúció során a soksejtű szervezetek megjelenésével elengedhetetlenül szükségessé vált egy hatékony védekező rendszer kialakulása, mely megőrzi a többsejtű szervezet homeosztázisát az azt fenyegető parazitákkal és mikroorganizmusokkal szemben. Ennek a feladatnak az ellátására alakult ki a többsejtű állatokban a veleszületett immunrendszer, melynek humorális és sejtes elemei, az antimikrobiális peptidek termelése, a bekebelezés, és a testidegen részecskék elhatárolása az állatvilágban általánosan elterjedt védekezési folyamatok (Hartenstein, 2006).

Mai ismereteink szerint a gerinctelen szervezetek kizárólag elsődleges immunrendszerrel rendelkeznek, míg a gerincesekben a veleszületett és a szomatikus rekombináción alapuló adaptív immunrendszer együttműködése biztosítja az egyed túlélését (Williams, 2007). A veleszületett védekező rendszer jól vizsgálható tehát gerinctelen modellorganizmusok segítségével.

Az immunitás szempontjából legjobban jellemzett gerinctelen állatok a rovarok, a több mint fél évszázados múlta visszatekintő kutatásoknak köszönhetően (Rizki, 1957; Krieg, 1958). Az alapvető védekező reakciók mindegyikét megfigyelték már ebben az állatcsoportban: a bakteriális vagy gombás fertőzések hatására a zsírtestből antimikrobiális peptidek szabadulnak fel, a vérsejtek pedig képesek bekebelezni a mikrobákat és tokképzés segítségével elzárni a hemolimfától a nagyméretű testidegen részecskéket (Hoffmann, 1990; Hoffmann, 2003).

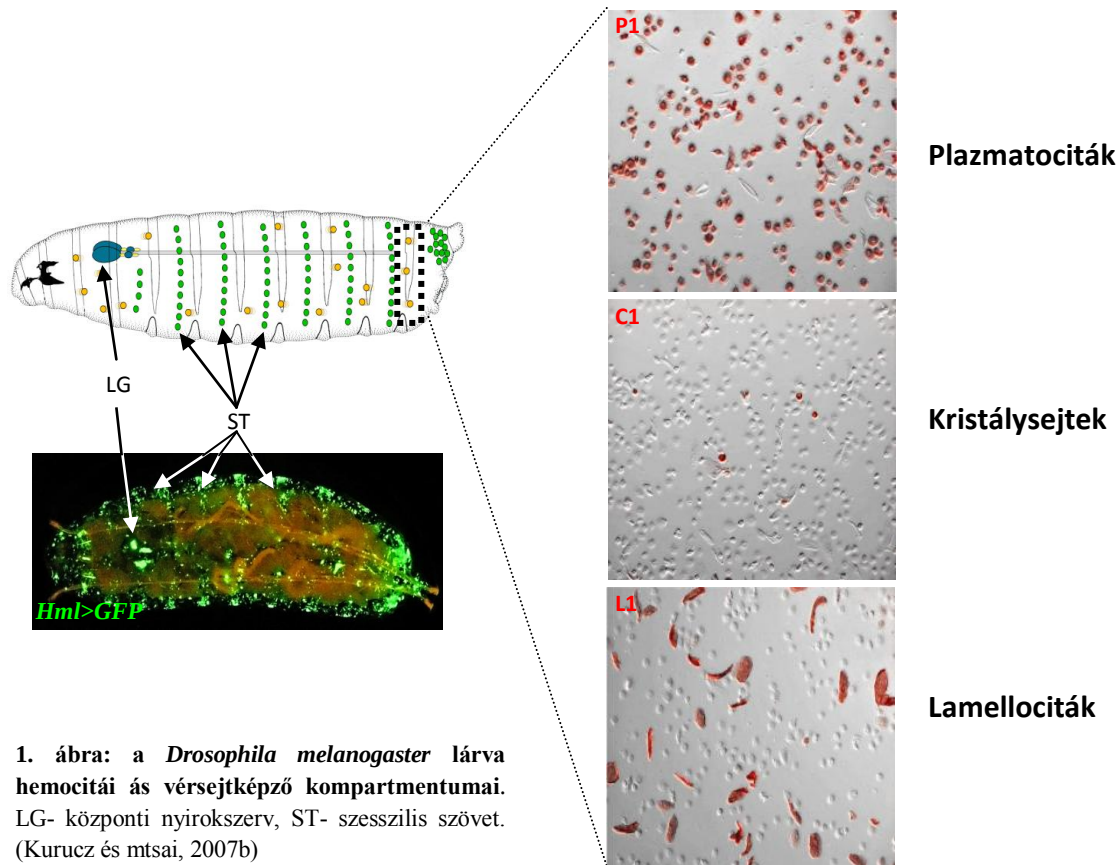
A *Drosophila melanogaster*t jól jellemzett fiziológiai és genetikai háttere, valamint teljes genomszekvenciájának ismerete kiemeli a potenciális rovar modellszervezetek közül, és kiválóan alkalmassá teszi az elsődleges immunrendszer vizsgálatára. Az ecetmuslica védekezésében szerepet játszó számos génről kiderült, hogy a humán immunfolyamatokban is jelentős szereppel bír. Bebizonyosodott, hogy az ember és a *Drosophila* immunválaszának alapelemei funkcionálisan és molekulárisan is erősen konzerváltak (Evans és mtsai, 2003). Ám az ecetmuslica immunitása nem csak modellrendszerként érdekes - védekező folyamatainak egyedi vonásai, különleges vérsejtjeinek kialakulása és működése önmagukban is megismerésre érdemessé teszik ezt az állatfajt.

2.2. A *Drosophila melanogaster* immunválasza:

Az ecetmuslica védekező folyamatait humorális és sejtes komponensek együttműködése alakítja ki. A humorális jelenségeket a hemolimfa faktorai által megvalósított véralvadás, a

fenoxidáz által beindított melanizációs kaszkád, valamint az antimikrobiális peptidek termelése jelentik. A sejtes immunválasz alapvető jelenségei a mikróbák bekebelezése és a nem fagocitálható méretű veszélyes részecskék körüli tok képzése, megvalósítói pedig a vérsejtek (hemociták).

2.3. A *Drosophila* lárva vérsejtképző kompartmentumai és vérsejtjei:



1. ábra: a *Drosophila melanogaster* lárva hemocitái és vérsejtképző kompartmentumai. LG- központi nyirokszerv, ST- szesszilis szövet. (Kurucz és mtsai, 2007b)

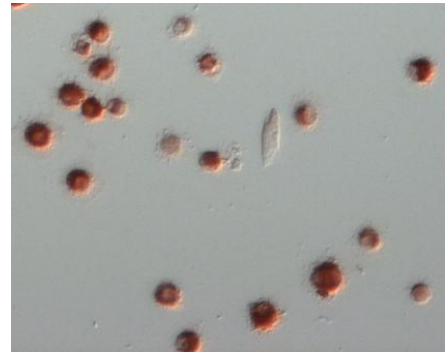
Az ecetmuslica lárvájában a hemociták három vérsejtképző kompartmentumba rendeződnek: a keringő hemociták, a szesszilis szövet és a központi nyirokszerv. Ez a három szövet egyaránt képes a végrehajtó sejtípusok, a plazmatociták, a kristálysejtek és a lamellociták képzésére (1. ábra).

2.3.1. A keringő hemociták:

A hemolimfában keringő hemociták három funkcionálisan, morfológiailag és immunológiai markerekkel is egymástól elkülöníthető típusát írták le: a plazmatocitákat, a kristálysejteket és a lamellocitákat.

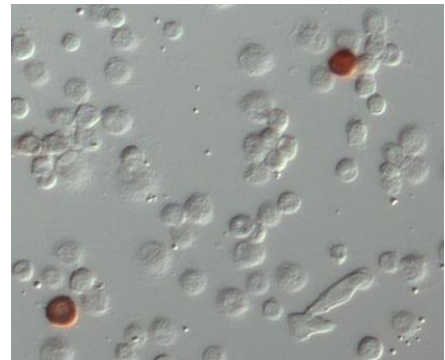
A plazmatociták kisméretű (10 μ), kerek morfológiájú, professzionális bekebelező sejtek (2. ábra), az embrióban az apoptotikus törmelék eltávolítását végzik (Franc és mtsai, 1996), majd a

lárvális és adult életszakaszokban a mikróbák bekebelezése az elsődleges feladatuk (Hoffmann, 1995). Ezen kívül extracelluláris mátrix komponenseket és antimikrobiális peptideket is termelnek. A lárva keringésének fő tömegét, a sejtek mintegy 95%-át a plazmatociták teszik ki. A lárvális plazmatociták kifejezik a NimC1 molekulát, amelynek a mikróbák bekebelezésében van szerepe (Kurucz és mtsai, 2007a).



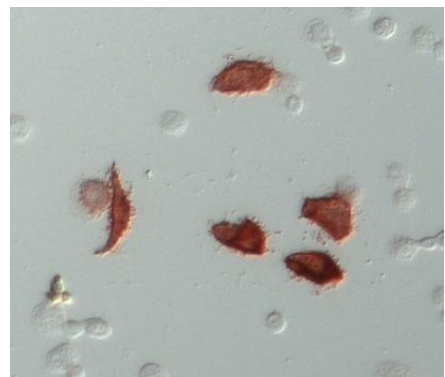
2. ábra: a plazmatociták kifejezik a NimC1 (P1) molekulát.

A kristálysejtek szintén kisméretű (10-12 μ), de bekebelezést nem végző hemociták (3. ábra). Citoplazmájukban profenoloxidáz kristályokat hordoznak, aminek aktív formája, a fenoloxidáz a melanizációs kaszkád kulcsenzime. A melanizációnak a tokképző reakcióban és a sebgyógyulásban van alapvető szerepe. A kristálysejtek a naív lárva keringő hemocitáinak 5%-át teszik ki, specifikus markerük a C1 molekula (Kurucz és mtsai, 2007b).



3. ábra: a kristálysejtek kifejezik a C1 markert.

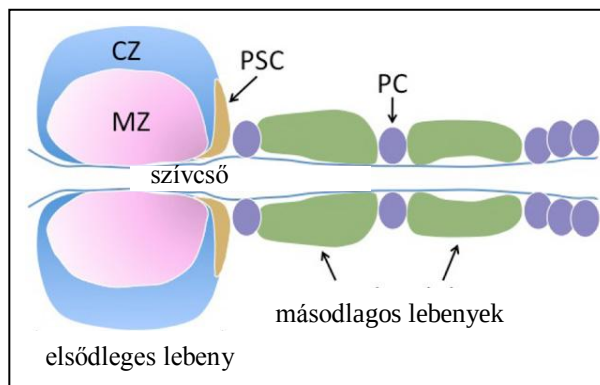
A vérsejtek harmadik csoportja, a vad típusú lárvában immunindukció következtében megjelenő lamellocita (4. ábra). Ezek a nagyméretű (20-50 μ), kiterült, L1, L2, L4, L6 markereket kifejező sejtek (Kurucz és mtsai, 2007b) a parazitoid darázs lárvája, vagy más, veszélyes részecske körüli tok kialakításában vesznek részt. Sejtvonal jelöléses vizsgálatainkból kiderült, hogy a korábbi elképzelésekkel ellentétben a lamellocitáknak csak egy része származik prekursor sejtekből, jelentős hányaduk a korábban terminálisan differenciálódottként vélt plazmatocitákból képződik (Honti és mtsai, 2010). Kísérleteinkből az is kiderült, hogy a Lozenge transzkripciósfaktor által meghatározott kristálysejt-vonal sejtjei nem alakulnak lamellocitává. A tokképző reakció a három sejtípus együttes részvételével zajlik: a plazmatociták és lamellociták alkotta többrétegű tokban a kristálysejtekből felszabaduló fenoloxidáz által indított kaszkád során képződött szabadgyökök elpusztítják a parazitoid darázs petéjét, miközben a többrétegű tok melanizálódik (Nappi, 1973).



4. ábra: a lamellociták kifejezik az L1 fehérjét.

2.3.2. A központi nyirokszerv:

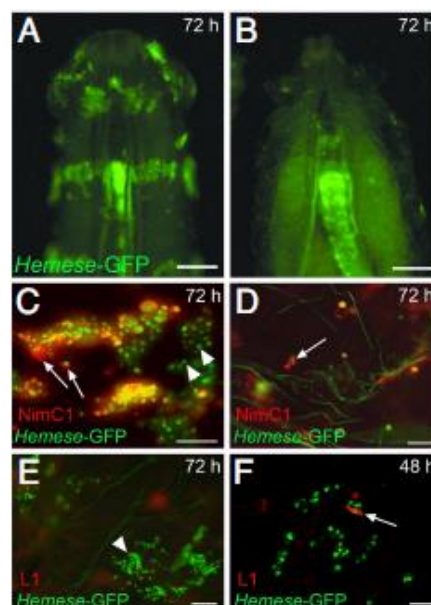
A központi nyirokszerv a szívcső két oldalán elhelyezkedő, bazális membránnal körülhatárolt, páros lebenyes szerv. Az elsődleges lebenyt poszterior irányban több másodlagos lebeny követi, az egyes lebenyeket a központi nyirokszervvel azonos embrionális eredetű perikardiális sejtek választják el egymástól. Az elsődleges lebenyt helyzetén kívül jól megfigyelhető szerkezete is megkülönbözteti a többitől (5. ábra): kérgi zónájában érett hemociták találhatók, míg a velőállományt differenciálatlan prohemociták alkotják (Jung és mtsai, 2005). Az elsődleges lebeny poszterior részén elhelyezkedő poszterior szignalizációs központ (PSC) sejtjei nyúlványokat bocsájtanak a velőállományba, és az ott elhelyezkedő sejtek differenciálatlan állapotának fenntartását biztosítják (Krzemien és mtsai, 2007). A többi lebenyben ez a strukturális tagoltság nem figyelhető meg. A központi nyirokszerv immunindukció hiányában a lárvális életszakasz végéig megőrzi integritását, azonban indukció, például parazitoid darázsfertőzés hatására a szerkezete felbomlik, sejtjei a keringésbe kerülnek, és részt vesznek a darázspete elpusztításában (Márkus és mtsai, 2009; Honti és mtsai, 2010).



5. ábra: a központi nyirokszerv felépítése. CZ- kérgi zóna, MZ- velőállomány, PSC- poszterior szignalizációs központ, PC- perikardiális sejt (Jung és mtsai, 2005)

2.3.3. A szesszilis szövet:

A *Drosophila* lárva harmadik véresejtképző kompartmentumát, a szesszilis szövetet a testüreg falára kitapadt, a szelvényeknek megfelelő sávozott mintázatban elhelyezkedő progenitorsejtek és fagocitáló sejtek (plazmatociták) alkotják. Immunindukció hatására a szesszilis szövet szerkezete felbomlik (6. ábra), a hemociták differenciálódnak, és a többi kompartmentum sejtjeivel együttműködésben részt vesznek az immunválasz kialakításában (Márkus



6. ábra: az immunindukció hatására a szesszilis szövet szerkezete felbomlik. A: harmadik stádiumú lárva szesszilis szövetének sávozott mintázata. B: az immunindukciót követően a szesszilis szövet szerkezete felbomlik. C-F: a plazmatociták (C és D) és a lamellociták (E és F) immunológiai jelölése NimC1-, illetve L1-specifikus ellenanyaggal, naív (C és E) és indukált (D és F) lárva szesszilis szövetében. (Márkus és mtsai, 2009)

és mtsai, 2009). Laboratóriumunkban kimutattuk, hogy a szesszilis vérsejt populáció mintázata az embrionális és lárvális fejlődés során fokozatosan alakul ki. Azt is kimutattuk, hogy a lárvá szesszilis szövetében sejtosztódás zajlik, valamint, hogy a kompartmentumot plazmatociták és prekursor jellegű sejtek alkotják. Számos, a szesszilis szövet szerkezetét befolyásoló gént azonosítottak (Stofanko és mtsai, 2008), azonban a szesszilis szövet kialakulásának és strukturális változásainak molekuláris háttere és pontos mechanizmusa nem ismert.

2.4. A hemociták leszármazási vonalai és a vérsejtképző kompartmentumok fejlődése:

Az ecetmuslica vérsejtképzése az emlősökéhez hasonlóan már az embrionális fejlődés korai szakaszában megkezdődik és kompartmentumokhoz kötötten, több hullámban zajlik. A folyamatot konzervált epigenetikai és transzkripciós faktorok irányítják (Holtz és mtsai, 2003; Evans és mtsai, 2003). A hemocita sejtors az ötödik embrióstádiumban determinálódik: a feji mezoderma sáv területén osztódó sejtek két vérsejt populációt hoznak létre: az embrionális makrofágokat és az embrionális kristálysejteket. A makrofágok bejárják a teljes embriót és bekebelezik a fejlődés során keletkező apoptotikus törmelékét. Az embrionális kristálysejtek a középbél poszterior szakasza közelében két sejtcsoportot alkotnak, funkciójuk ebben a stádiumban nem ismert. Ez a két sejtpopuláció a lárvában osztódás révén két vérsejtképző kompartmentumot hoz létre: a keringő hemocitákat és a testüreg falára kitapadt szesszilis vérsejteket. A *Drosophila* lárvá harmadik hematopoietikus kompartmentuma, a központi nyirokszerv, a másik kettőtől elkülönülten fejlődik a kardiogén mezoderma sejtjeiből, azonban ugyancsak képes a végrehajtó sejtek képzésére (Honti és mtsai, 2010). A metamorfózis során a szesszilis szövet és a központi nyirokszerv szerkezete felbomlik, a hemociták a keringésbe kerülnek, és a fagocita sejtek részt vesznek a szövetek átrendeződése során keletkező apoptotikus törmelék eliminálásában. A kifejlett egyedben két vérsejt-kompartmentum figyelhető meg: a keringő hemociták és a szesszilis szövet. A két populációt a két leszármazási vonal (a feji- és a kardiogén mezoderma vonala) közösen alakítja ki (Honti személyes közlés). Jelenlegi ismereteink szerint ebben az életszakaszban vérsejtképzés nem történik.

A hemocita sejtors meghatározásáért a *Drosophila* vérsejtképzésével kapcsolatban elsőként azonosított transzkripciós faktor, a Serpent (Srp) a felelős (Lebestky és mtsai, 2000), mely a GATA transzkripciós faktor fehérjecsald tagja. Ebbe a családba számos, az emlősökben és az ecetmuslicában azonosított transzkripciós faktor tartozik, és közülük többnek a működését a vérsejtképzés során figyelték meg és jellemezték a legjobban. A családra jellemző, hogy a fehérjék legalább egy, de többnyire két cink-ujj motívumot tartalmaznak: a „C-ujj” (ez minden GATA

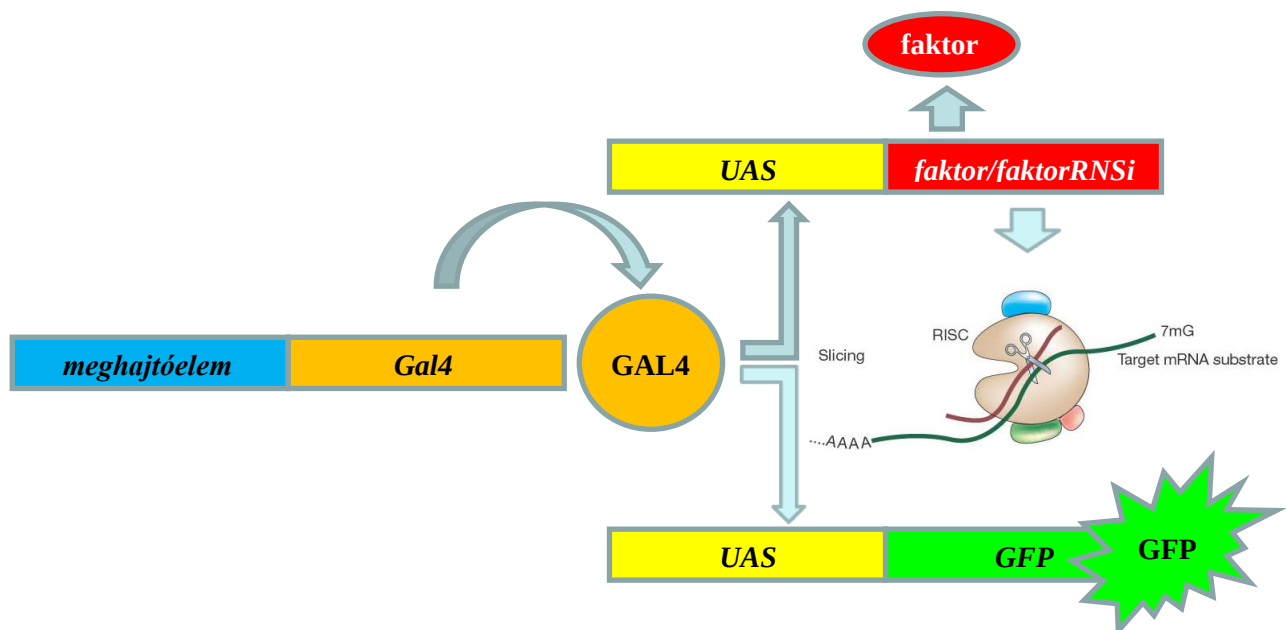
faktornak része) a WGATAR konszenzus DNS szekvencia felismeréséért és megkötéséért, az „N-ujj” pedig a kötés stabilizálásáért és más fehérjékkel történő interakcióért felelős. A feji mezoderma és az embrionális és lárvális központi nyirokszerv progenitor sejtjeiben kifejeződő Srp-nek két, alternatív splicing révén keletkező, aktív izoformáját azonosították, melyek különböző kölcsönható partnerekhez kapcsolódnak és különböző gének aktivitását fokozzák (Fossett és mtsai, 2003).

Az emlősök vérsejtképzésében szintén alapvető fehérjecsalád, a FOG (Friend Of GATA) család tagja, a *Drosophilában* a U-shaped, amely a Serpent korepresszoraként, azzal kapcsolódva gátolja a kristálysejt-sors determinációját (Fossett és mtsai, 2001). A Srp hatására kifejeződő Gcm/Gcm2, valamint a Serpent és a U-shaped együttesen felelős a makrofág irányú determinációért.

A kristálysejt fejlődési vonal meghatározó, alapvető transzkripciós faktora a RUNX családba tartozó Lozenge (Lz). A családba tartozó gének jelentős része szerepet játszik az emlősök vérsejtképzésében, egyes faktorok mutációját különböző leukémiákban is azonosították. A *lozenge* a feji mezoderma Srp-t kifejező sejtjeinek egy részében aktív, és ezekben a sejtekben a Serpennel együttműködve indukálja a kristálysejt irányba történő fejlődést. A Lz negatív sejtek makrofágokká differenciálódnak (Muratoglu és mtsai, 2006).

2.5. A sejtorsok vizsgálatához alkalmazott kísérleti rendszerünk:

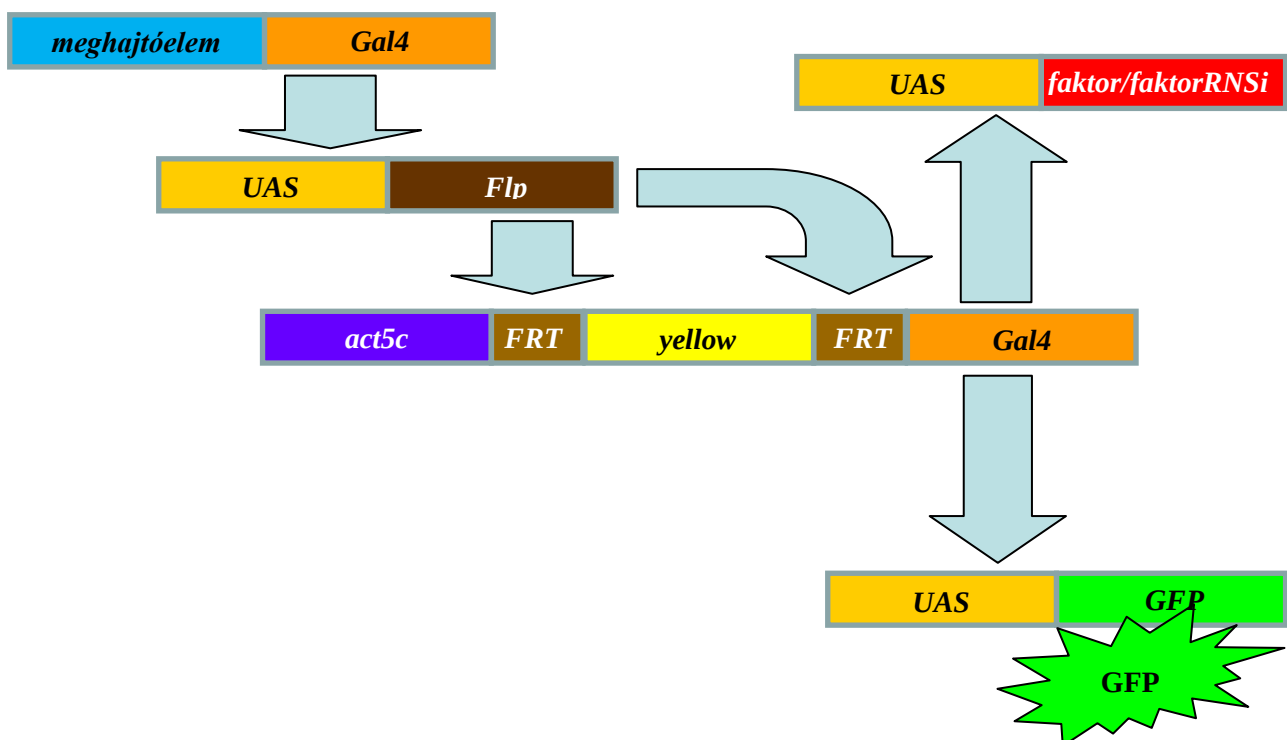
Munkánk során a vérsejtek differenciálódását szabályozó faktorokat azonosítunk, valamint vizsgáljuk a kompartmentumok együttműködésének és plaszticitásának molekuláris hátterét és a



7. ábra: a vizsgált faktorok túltermelése, illetve csendesítése. A vérsejt-specifikus meghajtóelem működése révén termelődő GAL4 az UAS szekvenciákon keresztül biztosítja a riporter GFP és a túltermelő, vagy a csendesítő transzgén kifejeződését.

szerkezetük kialakulásának és fenntartásának mechanizmusait. Ehhez kétféle módszert alkalmazunk: az egyik módszer szerint genetikai meghajtóelemek segítségével olyan faktorokat termeltetünk túl, illetve csendesítünk a vérsejtekben, amelyek feltehetően szerepet játszanak ezekben a folyamatokban. A hemociták *in vivo* követésére *UAS-GFP* riporter konstrukciót alkalmazunk, így a beavatkozások hatása az élő lárvában is megfigyelhető (7. ábra).

A faktorok túltermelését, illetve csendesítését teljes vérsejtvonalakra is ki tudjuk terjeszteni a laboratóriumunkban alkalmazott sejtvonaljelölő rendszer alkalmazásával (8. ábra, Honti és mtsai, 2010). A rendszer alapját a FLP-FRT rekombinációs rendszer és egy, a sejtosztódástól és differenciálódástól függetlenül, kikapcsolhatatlanul működő promóter képezi. Az FLP enzim termelődését egy tetszőleges vérsejt-specifikus meghajtóelem biztosítja. Ennek következtében a hemocitákban az FRT szekvenciák között szomatikus rekombináció történik, ami a vonaljelölő konstrukcióból a *yellow* markergént tartalmazó stop kazetta kivágódását eredményezi. A rekombináció következtében a konstitutívan működő *act5c* promóter a GAL4 kódoló szekvenciája közelébe kerül, és annak folyamatos kifejeződését serkenti. A kikapcsolhatatlanul termelődő GAL4 a riporterként alkalmazott GFP és a túltermelő vagy csendesítő transzgén kifejeződését konstitutív módon biztosítja.



8. ábra: a beavatkozások kiterjesztése teljes vérsejt-vonalakra. A meghajtóelem a FLP rekombináz vérsejt-specifikus termelődését biztosítja. Az enzim működésének következtében az *FRT* szekvenciák között szomatikus rekombináció történik, ami a stop kazetta kivágódását eredményezi. A kazetta eltávolítása után az *act5c* promóter működésének következtében a *Gal4* kifejeződése konstitutívvá válik, és a sejtek differenciálódásától és osztódásától függetlenül fennmarad. Ennek köszönhetően a transzgének kifejeződése is állandósul (Honti és mtsai, 2010).

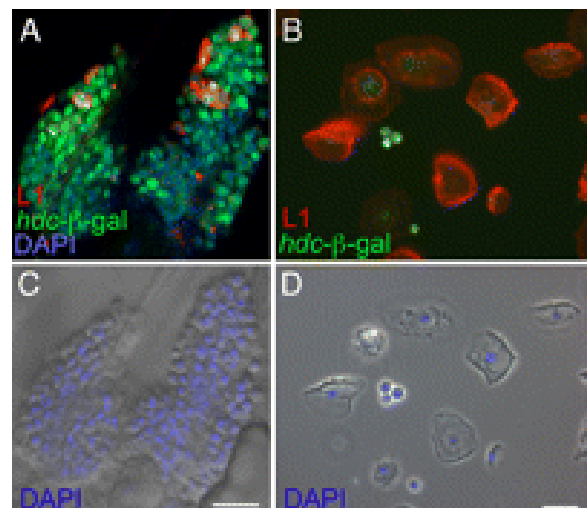
Dolgozatomban két faktornak, a Headcasenek és az Eaternek a vérsejt differenciálódás szabályozásában, illetve a szesszilis szövet szerkezetének kialakításában betöltött szerepét mutatom be.

2.6. A *headcase*, a differenciálódás szabályozó faktora:

A vérsejt-differenciálódás szabályozásával kapcsolatban általunk vizsgált egyik szabályozó faktor a Headcase. Ez a citoplazmatikus fehérje volt az első, amelyről leírták, hogy minden imaginális szövetben kifejeződik, ezáltal lehetővé vált az adult szerv- és szövetkezdemények korai azonosítása és morfogenezisük nyomon követése az embriótól a kifejlett egyedig (Weaver és White, 1996). A Headcase aminosav sorrendje nem tartalmaz egyértelmű, konzervált motívumokat, ismert funkcióhoz köthető szekvenciákat. Az mRNS-ében található egy belső UAA stop kodon, és így egy ismeretlen „readthrough” mechanizmusnak köszönhetően kétféle polipeptid képződik róla, bár funkciót eddig csak a hosszabb izoformához tudtak kötni (Steneberg és mtsai, 2001). Központi szerepét eddig két folyamatban igazolták. Az imaginális szövetekben kifejeződő Headcase gátolja ezen szövetek sejtjeinek differenciálódását. Kifejeződése a fejlődő szervkezdeményekben az utolsó mitotikus osztódásig fennmarad, majd a metamorfózis kezdetén a gén aktivitása megszűnik, és a kifejlett egyedet kialakító struktúrák sejtjei differenciálódásnak indulnak (Weaver és White, 1996). Másik funkcióját a trachea fejlődése során tölti be: a tracheaelágazások csúcsi sejtjében kifejeződő Headcase nem-autonóm módon gátolja a további elágazások képződését (Steneberg és mtsai, 1998). A Hdc fehérje humán homológjának, a HECA-nak tumorsuppresszor hatását figyelték meg fej- és nyak tumorokból származó sejtvonalak vizsgálata során, illetve kiváló markernek bizonyult vastagbél tumorok diagnózisában (Dowejko és mtsai, 2009, 2011; Chien és mtsai, 2006).

A *hdc* gén kifejeződési mintázatát mutató LacZ tartalmú enhanszercsapdázó inszerció (*hdc*^{B5}) vizsgálata során megfigyeltük és megerősítettük, hogy a Headcase nem kizárólag az imaginális szövetekben, hanem a központi nyirokszervben is kifejeződik (Weaver és White 1996).

Azt is megállapítottuk, hogy az immunindukció hatására a nyirokszervből felszabaduló és

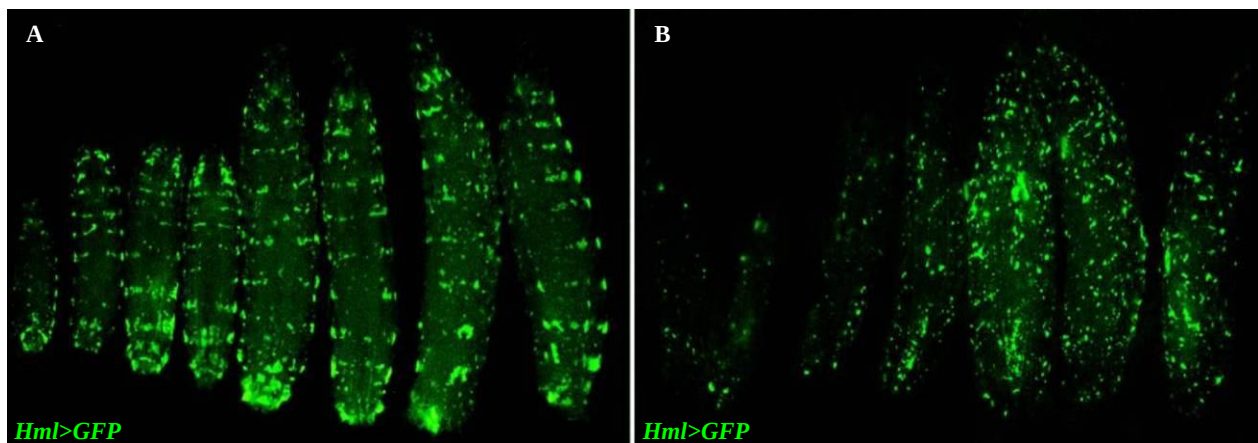


9. ábra: az immunindukció hatására a központi nyirokszervet elhagyó és differenciálódó hemocitákban a *hdc* kifejeződése megszűnik. A és C: a központi nyirokszerv elsődleges lebenye, B és D: az immunindukciót követően a központi nyirokszervből kilépő vérsjetelekben a riporter LacZ kifejeződése megszűnik (Márkus és mtsai, 2009).

differentiálódó hemocitákban a gén aktivitása megszűnik (9. ábra). Ez azt sugallta, hogy a *hdc* a központi nyirokszervben részt vesz a vérsejtek érésének szabályozásában. Fontos megjegyezni, hogy sem a keringő hemocitákban, sem pedig a szesszilis vérsejtekben nem figyeltünk meg *hdc* expressziót.

2.7. Az Eater a fagocitózis receptora:

Az Eater a plazmatociták által kifejezett, EGF-szerű ismétlődéseket tartalmazó, transzmembrán molekula. Az Eater fehérje baktériumkötő tulajdonsága révén részt vesz a baktériumok bekebelezésében, így az ecetmuslica antimikrobiális védekezésének nagyon fontos eleme. Hiányában a fagocitózis nagymértékben csökken, és fokozódik a bakteriális fertőzések esélye. Azonban az Eater nem csak a baktériumok bekebelezésében játszik szerepet, hanem a hemociták testfalhoz tapadásához is szükség van erre a faktorra: az *eater* gént átfedő deléciók kombinációját hordozó lárvák szesszilis szövetében a vad típushoz képest nagymértékben lecsökken a vérsejtszám (Kocks és mtsai, 2005). Megfigyeltük, hogy az *eater* kifejeződés vérsejt-specifikus csendesítésének hatására (*Hml-Gal4, UAS-GFP; UAS-eater^{RNSi}/TM3*) szintén felbomlik a szesszilis szövet, valamint megemelkedik a keringő vérsejtek száma (10. ábra). A vizsgálataink során az is kiderült, hogy a korábbi elképzeléssel ellentétben a szesszilis szövet leválása nem indukálja a lamellocita differenciálódást.



10. ábra: az *eater* csendesítésének hatására a szesszilis szövet szerkezete felbomlik. A: *Hml-Gal4, UAS-GFP* B: *Hml-Gal4, UAS-GFP; UAS-eater^{RNSi}/TM3*.

3. Célkitűzések

A hematopoietikus kompartmentumok differenciálódásában és működésében szerepet játszó faktorok azonosítása és az azonosított faktorok (a Headcase és az Eater) szerepének tisztázása.

Az egyes vérsejtképző kompartmentumok kialakulásában szerepet játszó autonóm és nem-autonóm szabályozó folyamatok vizsgálata.

A szesszilis szövet struktúrájának nagy felbontású, időbeni vizsgálata.

4. Anyagok és módszerek

4.1.Felhasznált anyagok:

4.1.1.Pufferek, vegyszerek:

Schneider's médium

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

BSA (Sigma): marha szérum-albumin.

Fluoromount G (SouthernBiotech): fedő médium.

PTU (Sigma): 1-fenil-2-tiourea, gátolja a melanizációt.

DAPI (Sigma): 4',6'-diamidino-2-phenylindole 20mg/ml, fluoreszcens DNS festék.

Dichlorvos (Flukar): acetil-kolin észteráz gátló

Heptán

Voltalef olaj

4.1.2.Felhasznált ellenanyagok:

Humán leukocita antigén specifikus: T2/48 (Vilmos és mtsai, 2004), negatív kontroll

Hemese specifikus: 1.2/1 (Kurucz és mtsai 2003), elsődleges ellenanyag

L1 specifikus ellenanyag keverék: H10/9, 7A6, 29D4 felülúszók elegye (Kurucz és mtsai 2007b), elsődleges ellenanyag

Alexa568 konjugált, kecskében termeltetett anti-egér Ig másodlagos ellenanyag (Molecular Probes) 2 mg/ml

4.2.Felhasznált *Drosophila* törzsek:

w¹¹¹⁸: a szemszín kialakulásáért felelős gén mutációja, az állatok szemszíne fehér.

Hml>GFP: (*w[1118]*; *P{w[+mC]=HmlΔ-GAL4}* *P{w[+mC]=UAS-2xEGFP}*) a *He>GFP*-hez hasonlóan a hemocitákban GFP-t kifejező törzs, de a riporter expresszió nem csak a keringő és szesszilis vérsejtek 80%-ában, hanem a központi nyirokszerv kérgi részének sejtjeiben is megfigyelhető. A *Gal4* kifejeződését a *von Willebrand*-faktor homológjaként leírt *hemoelectin* gén szabályozó régiója vezérli, és a konstrukció ektopikus kifejeződése figyelhető meg a kifejlett egyedek petevezetékében és szájszervében (Goto és mtsai, 2003).

He>GFP: ($w[*]$; $P\{w[+mC]=He-GAL4.Z\}85$, $P\{w[+mC]=UAS-GFP.nls\}$) a törzs a pán-hemocita sejt felszíni markerként azonosított *Hemese* génszabályozó régiójának felhasználásával előállított *He-Gal4* meghajtó elemet és egy *UAS-GFP* konstrukciót hordoz, így az élő állatban is megfigyelhetők a vérsejtek. A lárvák szesszilis szövetének egyes populációi és a keringő hemociták mintegy 70%-a mutat GFP kifejeződést, azonban a központi nyirokszervben a meghajtó elem csak néhány sejtben aktív (Kurucz és mtsai, 2003).

UAS-hdcRNSi: (w^{1118} ; $P\{GD8578\}$) a *hdc* csendesítésére alkalmas kettős szálú RNS-t kódoló konstrukciót hordozó törzs. A dsRNS kifejeződését *UAS* elem biztosítja.

UAS-2xEGFP: ($y[*]$ $w[*]$; $P\{w[+mC]=UAS-2xEGFP\}AH3$) a törzs a harmadik kromoszómán olyan erősített *GFP* konstrukciót hordoz, melynek a vezérlését *UAS* elem végzi. Meghajtó elemek kifejeződési mintázatának vizsgálatára alkalmaztuk.

hdc⁸: (w ; hdc^8 $P\{GawB\}/TM3$ *Sb*, *Ser*, *e*) a *headcase* szabályozó régiója által vezérelt *Gal4*-es meghajtó elemet tartalmazó enhanszer csapdázó inszerció. Az inszerciót génkonverzióval állítottuk elő, kifejeződési mintázata megegyezik a *hdc* ismert mintázatával, és a *headcase* amorf alléljához hasonlóan recesszív letális fenotípust mutat: a homozigóta egyedek a báb stádiumban elpusztulnak.

Sejtvonaljelölő törzs: ($y[*]$, $w[*]$, *UAS-Flp*; *act5cFRT*(y^+)*Gal4*, *UAS-GFP*) a teljes, Flp-FRT rekombinációs rendszeren alapuló sejtvonaljelölő rendszert hordozó törzs. Az *actin5c-Gal4* konstitutívan aktív meghajtó elem működését az FRT szekvenciák közé épített *yellow⁺* kazetta gátolja, melyet egy általunk alkalmazott meghajtóelemmel termeltetett Flp rekombináz eltávolít. Ennek köszönhetően a kiválasztott meghajtó elem által kijelölt sejtekben és azok utódsejtjeiben állandó GFP kifejeződés figyelhető meg (Honti és mtsai, 2010).

lz sejtvonaljelölő törzs: ($y[*]$, $w[*]$, *UAS-Flp* *lz* $P\{GawB\}$; *act5cFRT*(y^+)*Gal4*, *UAS-GFP*) olyan vonal, melyben a *lozenge* által meghatározott differenciálódási vonal sejtjei konstitutívan kifejezik a *GFP* riporter gént, így ezek *in vivo* megfigyelésére alkalmas. A törzset kontrollként alkalmaztuk.

w; SM6b/Sco: *Sco* domináns markerrel jelölt második kromoszómát *SM6b* balanszer kromoszóma felett hordozó vonal. Rekombináns második kromoszómát hordozó tiszta vonalak előállításához használtuk.

w; *TM3/TM6D*³: két harmadik kromoszómás balanszert hordozó törzs. Harmadik kromoszómás inszerciók balanszírozásához használtuk.

w; *Hml>GFP; UAS-eaterRNSi/TM3*: a *Hml* működésének köszönhetően GFP-t kifejező törzs, amely az *eater* csendesítésére alkalmas konstrukciót is hordozza. A csendesítés hatására a lárvák szesszilis szövete felbomlik, a keringő sejtek száma megemelkedik.

4.3. Módszerek:

***Drosophila* lárvák in vivo vizsgálata:** Olympus FV 1000 konfokális, illetve Leica MZ FL III UV-sztereomikroszkóp segítségével, GFP szűrőn át figyeltük meg az élő lárvákat és kifejlett egyedeket.

***hdc-Gal4* vonalak létrehozása P-elem mobilizáláson alapuló génkonverzióval:** w; *P{GawB}; hdc*^{B5} hímeket w; *SM6b/Sp; TM3Δ2-3/CxD* szűz nőstényekhez kereszteztük. Az utódok közül w; *P{GawB}/SM6b; hdc*^{B5}/*TM3Δ2-3* genotípusú, jump starter szüzeket gyűjtöttünk, annak érdekében, hogy a konverzióhoz esetlegesen szükséges rekombinációs mechanizmus működését biztosítsuk. A szüzeket párkeresztezésbe vittük w¹¹¹⁸ hímekkel. Az utódok közül a w; *SM6b/+; hdc-Gal4/+* genotípusú (piros szemű) hímeket kereszteztük, w¹¹¹⁸ szüzekhez. A szegregáció alapján kromoszómára térképeztük a beépüléseket. Harmadik kromoszómásnak tekintettük az inszerciót, ha az *SM6b* balanszer kromoszómától és a nemtől függetlenül szegregált. A jelölteket y, w; *UAS-2xEGFP* szüzekhez, a kifejeződési mintázat ellenőrzése érdekében. A harmadik kromoszómás, *hdc*-nek megfelelő kifejeződési mintázatot mutató vonalak hím egyedeit w; *TM3/TM6D*³ szüzekhez kereszteztük, és az inszerciót balanszer kromoszóma felett törzsbe állítottuk (1. függelék).

Immunindukció: a második lárvastádiumban lévő egyedeket *Leptopilina boulandi* G486 parazitoid darázzsal fertőztük: 50 lárvához 8 megtermékenyített nőstény darazsat helyeztünk a fiolába. A fertőzéseket 3 órán át 25°C-on végeztük.

w; *Hml>GFP, UAS-hdcRNSi* törzs előállítás és ellenőrzése: w; *Hml>GFP* hímeket w; *UAS-hdcRNSi* nőstényekkel kereszteztünk, majd az első utódnemzedékből w; *Hml>GFP/ UAS-hdcRNSi* genotípusú rekombinátor szűz nőstényeket gyűjtöttünk, és azokat w; *SM6b/Sco* hímekhez kereszteztük. Az utódok közül azokat a legerősebb szemszínű hímeket kereszteztük tovább w; *SM6b/Sco* nőstényekhez, amelyek GFP kifejeződést mutattak. Az első utódnemzedékből *SM6b* balanszer kromoszóma felett vittük tovább a rekombináns kromoszómákat, majd a balanszer elhagyásával homozigóta törzseket hoztunk létre. A rekombináció igazolása érdekében a törzseket

letalitás tesztnek vetettük alá, melyhez a *hdc*⁸ recesszív letális allélt hordozó törzset alkalmaztuk: az *UAS-hdcRNSi/+; hdc*^{8/+} egyedek nem élik túl a báb stádiumot (2. függelék).

w; UAS-hdcRNSi; He>GFP törzs előállítása: Két keresztezési vonalon indultunk el. Egyfelől w; *SM6b/+; He>GFP/TM3* genotípusú nőtényeket állítottunk elő w; +; *He>GFP* hímek és w; *SM6b/Sp; TM3/CxD* nőtények keresztezésével, másfelől w; *UAS-hdcRNSi/Sp; CxD/+* hímeket válogattunk w; *SM6b/Sp; TM3/CxD* hímek és w; *UAS-hdcRNSi; +* nőtények utódai közül. A fenti genotípusú hímek és nőtények keresztezésének F1 utódnemzedékéből w; *UAS-hdcRNSi/SM6b; He>GFP/CxD* hímeket és szűz nőtényeket gyűjtöttünk, és ezek w; *UAS-hdcRNSi; He>GFP* genotípusú utódaiból állítottuk be a homozigóta törzset (3. függelék)

A keringő vérsejtek vizsgálata indirekt immun-fluoreszcenciával: a hemocitákat harmadik stádiumú naiv, illetve, a parazitoid darázsfertőzést követően 72 órával, immunindukált lárvákból izoláltuk 12 lyukú Hendley-Essex tárgylemezre, Schneider's médium segítségével. A lárvák kutikuláját egy csepp, PTU-t tartalmazó Schneider's médiumban feltéptük, majd enyhén megráztuk, így a vérsejtek a folyadékba kerültek. Az izolátumokat ezt követően nedves kamrában, szobahőmérsékleten, 45 percig inkubáltuk, eközben a sejtek a tárgylemez felszínéhez tapadtak. A PTU-t tartalmazó S&S cseppek eltávolítását követően a mintákat 2% paraformaldehidben 10 percig, vagy acetonban 6 percig fixáltuk szobahőn. Ezután a preparátumokat 0,1% BSA-PBS-sel telítettük, majd egy órán keresztül, nedves kamrában, szobahőmérsékleten inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal. Az inkubációs idő letelte után a mintákat PBS-ben mostuk, és a másodlagos ellenanyaggal nedves kamrában, szobahőmérsékleten, 45 percig inkubáltuk. Elsődleges ellenanyagként három L1 specifikus ellenanyag keverékét használtuk a lamellociták jelölésére (H10/9, 7A6, 29D4), valamint Hemese specifikus 1.2 ellenanyagot, mint pozitív, és humán leukocita antigén specifikus T2/48 ellenanyagot, mint negatív kontrollt. Másodlagos ellenanyagként Alexa568 konjugált anti-egér immunglobulint alkalmaztunk 1:1000 hígításban. A sejtmagok jelölésére használt DAPI-t a másodlagos ellenanyaggal együtt adtuk a mintákhoz 1:10000 hígításban. Végül a preparátumokat fedőmédiummal fedtük és fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk.

Fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálat: a vérsejt mintákat Zeiss Axioskop2 MOT fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk, a felvételeket AxioVision szoftver segítségével rögzítettük.

Központi nyirokszerv, illetve szesszilis szövet preparátum készítése: a harmadik stádiumú lárvákat gumipárnán egy csepp Schneider's médiumba helyeztük, feji és farki végüket rögzítettük, majd csipesszel a feji-farki tengely mentén feltártuk. A kiszabaduló hemocitáktól és egyéb törmeléktől mosással szabadultunk meg, majd a vizsgálni nem kívánt szerveket és szöveteket csipesz segítségével eltávolítottuk. PBS-sel történő mosást követően a preparátumot mikrotiter lemez egy lyukába helyeztük, 2%-os paraformaldehidben 10 percig fixáltuk, majd PBS-sel mostuk. Ezután 0,1% BSA-PBS-ben telítettük, majd egy órán keresztül inkubáltuk a Hemese specifikus elsődleges ellenanyaggal (1.2). Ezt újabb PBS-ben történő mosás követte, ami után 45 percig inkubáltuk a mintát a DAPI-val kiegészített (1:10000) másodlagos ellenanyaggal (Alexa568 konjugált anti-egér Ig 1:1000), majd PBS-sel történő mosást követően a preparátumot tárgylemezre helyeztük, FluoromountG fedőmédiumban fedőlemezzel lefedtük és konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk.

Konfokális mikroszkópiás vizsgálat: a nyirokszerv és a szesszilis szövet preparátumokat, valamint az élő lárvákat Olympus FV 1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, a felvételeket Olympus Fluoview 1000 program segítségével készítettük.

In vivo konfokális videomikroszkópiás vizsgálat: a harmadik stádiumú, acetilkolin-észteráz gátlóval megbénított lárvákat heptánban oldott ragasztóval kezelt petricsészére helyeztük, majd Voltalef olajjal lefedtük. A vizsgálatokat Leica LSM mikroszkóppal végeztük a LAS AF Lite szoftver segítségével. A felvételeket 15 perces intervallumban készítettük, 5 másodperces felbontásban, 1,7-szeres nagyítás mellett.

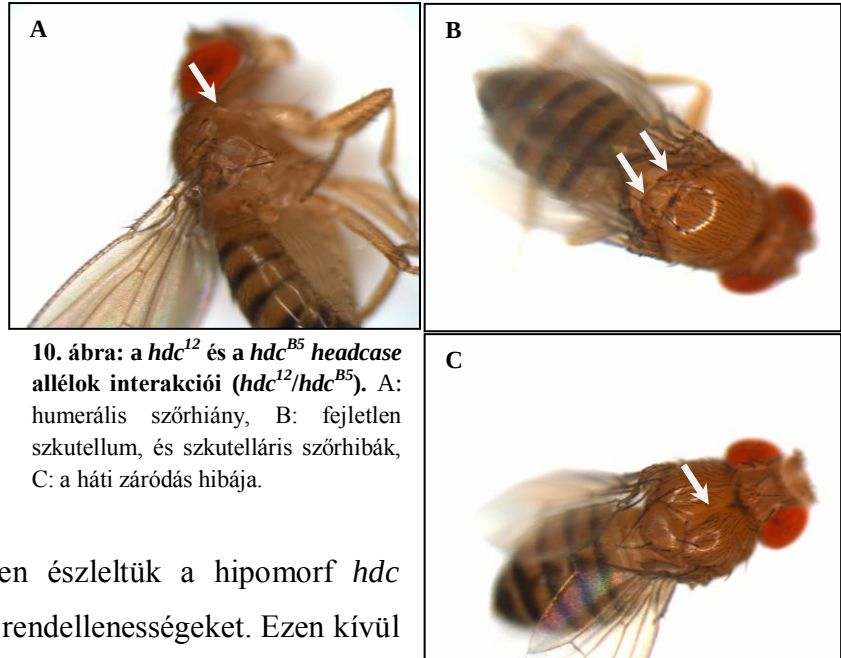
GAL4-független *Hml-GFP* vonalak létrehozása mikroinjektálással: az injektáláshoz szükséges konstrukciót Lukacsovich Tamás (UCLA, Irvine, USA) készítette: a piggyBac plazmid a szövetekben általánosan kifejeződő *cherry* riportergént, illetve a *Hml* 5' regulátorrégiójának szabályozása alatt álló *GFP* gént tartalmazta. 230, w^{1118} embriót injektáltunk, majd a kikelő egyedeket párkeresztezésbe vittük w^{1118} egyedekkel. Az utód lárvákban UV-sztereomikroszkóppal vizsgáltuk a *cherry* marker és a *Hml-GFP* kifejeződését. A jelölteket kromoszómára térképeztük, és törzsbe állítottuk. A vonalak expressziós mintázatát konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk.

5. Eredmények és értékelésük

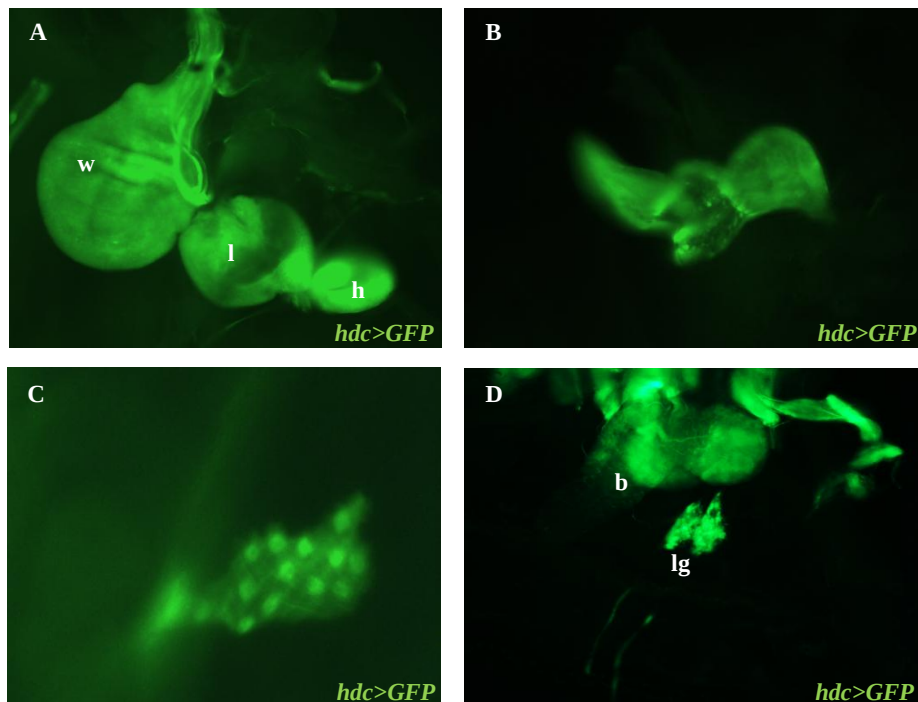
5.1. A *hdc* kifejeződésének *in vivo* követése:

P-elem mobilizáláson alapuló génkonverziós screen során a *hdc^{B5}* allélt *hdc-Gal4* meghajtóelemekké konvertáltuk. A létrehozott mintegy 50 *hdc* expressziót mutató inszerció közül további vizsgálatokra az öt legerősebb GFP expressziót mutató vonalat választottuk ki (*hdc⁸*, *hdc¹²*, *hdc¹⁹*, *hdc³¹* és *hdc⁵⁵*). A vonalak mindegyikében észleltük a hipomorf *hdc* allélokra jellemző fejtok fejlődési rendellenességeket. Ezen kívül megfigyeltünk elégtelen háti záródást, csökevényes szkutellumot és hiányos humerális, illetve szkutelláris szörnövekedést is (10. ábra). A kiválasztott vonalak GFP kifejeződési mintázatában nem figyeltünk meg különbségeket.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a konverzió sikeres volt, a kiválasztott konvertáns vonalak működése hűen követi a *hdc* kifejeződési mintázatát (11. ábra). A *hdc* aktivitását az imaginális szövetek mellett a központi nyirokszervben is megfigyeltük, azonban a *hdc^{B5}*-höz hasonlóan a keringő és szesszilis



10. ábra: a *hdc¹²* és a *hdc^{B5}* *headcase* allélok interakciói (*hdc¹²/hdc^{B5}*). A: humerális szórhiány, B: fejletlen szkutellum, és szkutelláris szórhibák, C: a háti záródás hibája.



11. ábra: a *hdc⁸-Gal4* meghajtóelem kifejeződési mintázata. A meghajtóelem követi a *hdc* mintázatát, kifejeződik az imaginális szövetekben és a központi nyirokszervben is. A: imágó korongok (w- szárny, l- láb, h- billér), B: ivarlemez, C: abdominális hisztoblasztok, D: agy (b) és központi nyirokszerv (lg).

hemocitákban nem tapasztaltunk GFP kifejeződést.

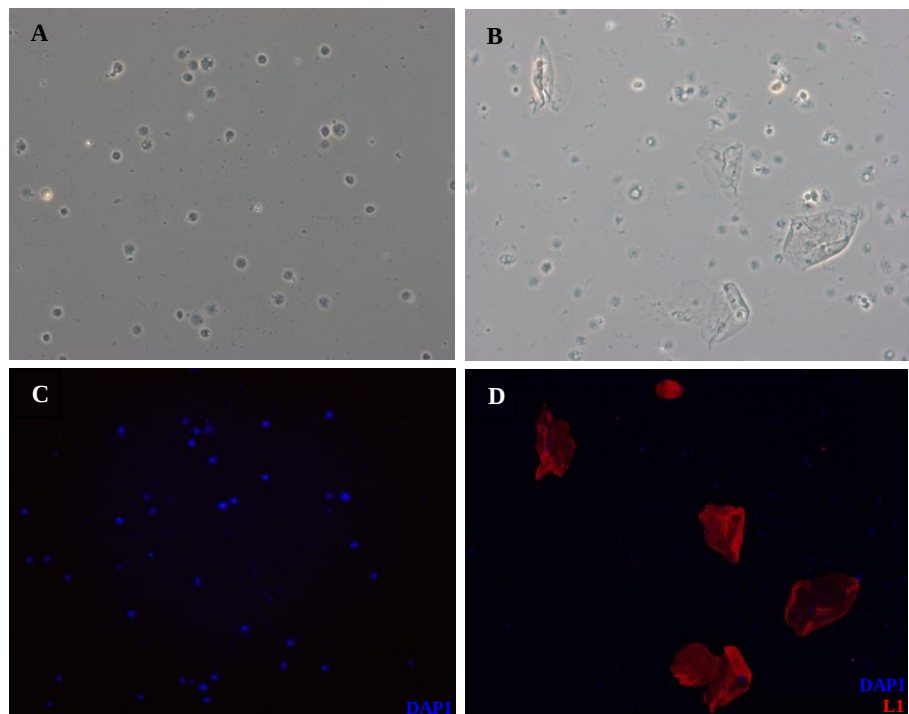
5.2. A *hdc* csendesítő konstrukció hatékonyságának vizsgálata:

A *hdc* vérsejt-kompartmentumokban betöltött funkciójának vizsgálatához a gén kifejeződését RNS interferencia alkalmazásával kívántuk csendesíteni, ezért megvizsgáltuk a csendesítő konstrukció hatékonyságát. A laboratóriumunkban létrehozott *hdc-Gal4* meghajtóelemek, a hipomorf *hdc* allélokhoz hasonlóan recesszív letális fenotípust mutatnak, a homozigóták a báb stádium során elpusztulnak. A *headcase hdc-Gal4* által vezérelt csendesítése szintén báb-letalitást okozott: a *w; UAS-hdcRNSi/+; hdc⁸/+* genotípusú egyedek bábállapotban elpusztulnak.

5.3. A *hdc* csendesítés lamellociták differenciálódására gyakorolt hatásának vizsgálata:

Korábbi megfigyeléseink alapján a központi nyirokszervből immunindukció hatására a keringésbe kerülő hemocitákban a *hdc* kifejeződése fokozatosan megszűnik. Ezzel párhuzamosan a nyirokszerv eredetű sejtek egy része lamellocitává alakul. Ez azt sugallta, hogy a *hdc* a központi nyirokszervben gátolja a lamellociták differenciálódását, a gátlás megszűnése pedig lehetővé teszi a tokképző sejtek képzését.

Hogy ellenőrizzük a hipotézisünket, *Hml-Gal4, UAS-GFP/UAS-hdcRNSi* heterozigóta lárvák vérképét vizsgáltuk naiv és immunindukált állapotban (12. ábra). A lárvák keringő vérsejtszáma nem változott jelentősen a *Hml-Gal4, UAS-GFP/+* genotípusú kontroll lárvákéhoz képest. A naiv lárvákban nem figyeltünk meg lamellociták differenciálódást, míg a

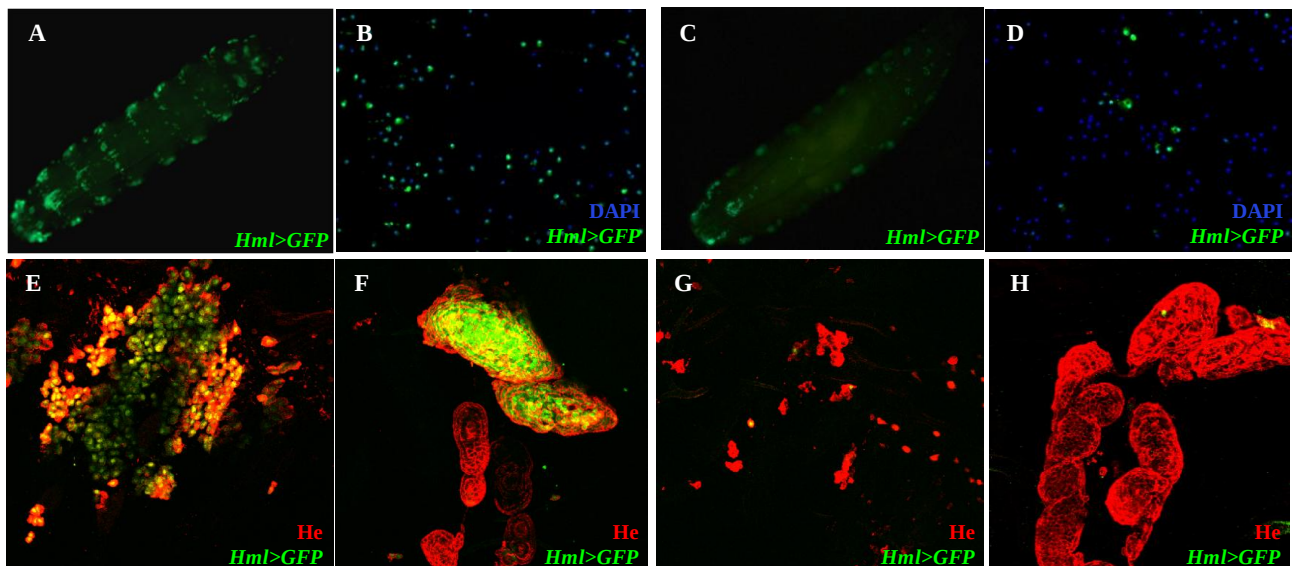


12. ábra: *Hml-Gal4 UAS-GFP/UAS-hdcRNSi* genotípusú lárva keringő vérsejtjei: naiv (A és C), és indukált (B és D) lárva hemocitái.

darázsfertőzést követően a kontrollnak megfelelő arányban jelentek meg lamellociták a hemolimfában. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a *hdc* nem vesz részt a lamellociták képzésének szabályozásában.

5.4. A *hdc* hatása a plazmatocitákérésére:

A *hdc* csendesítésének hatását mindhárom vérséjtképző kompartmentumban megvizsgáltuk az általunk létrehozott *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi* homozigóta vonal segítségével. Megfigyeltük, hogy a *Hml-Gal4*, *UAS-GFP* kontroll lárvákhoz képest a *hdc* csendesítésének hatására mindegyik hematopoietikus szövetben nagymértékben csökkent a GFP riportert kifejező sejtek száma, miközben a kompartmentumokat alkotó hemociták száma nem változott jelentősen (13. ábra). A kísérlet során meghajtóelemként használt *Hml-Gal4* expresszió az érett plazmatociták markere, így a GFP kifejeződés csökkenése az érett plazmatociták alacsony számával



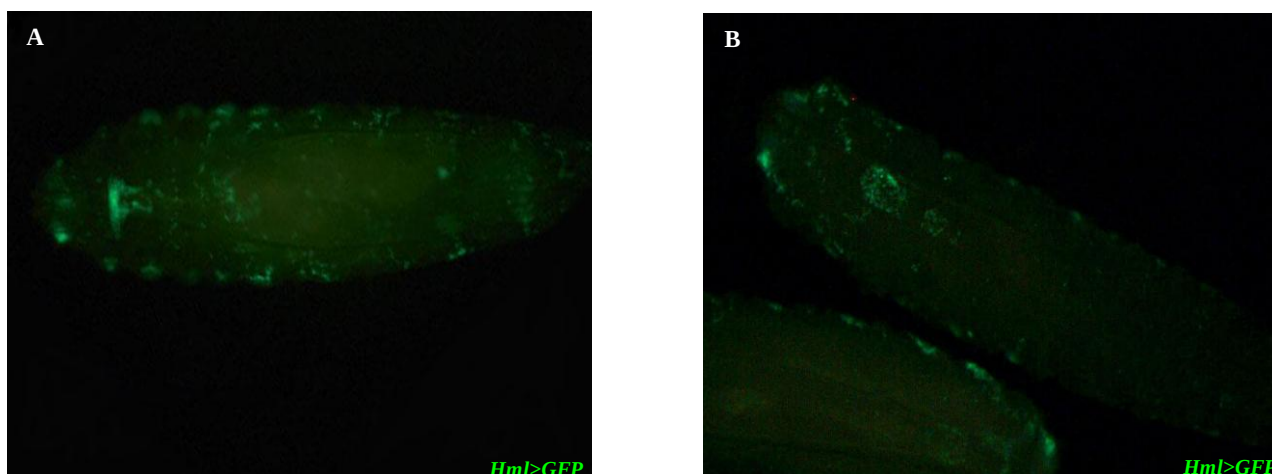
13. ábra: a *hdc* csendesítés hatása a hematopoietikus kompartmentumokban. A kontroll *Hml>GFP* lárvá szesszilis szöve in vivo (A) és kutikula preparátumon (C), keringő vérséjtjei (B) és központi nyirokszerve (F). A *Hml>GFP*, *UAS-hdcRNSi* lárvá szesszilis szöve in vivo (E) és kutikula preparátumon (G), keringő vérséjtjei (D) és központi nyirokszerve (H).

magyarázható. Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a *hdc* nem a lamellociták, hanem a plazmatociták differenciálódásának szabályozásában vesz részt. Mivel a fehérje jelenlegi ismereteink szerint nem fejeződik ki sem a keringésben, sem pedig a szesszilis szövetben, elképzelhető, hogy a Headcase a központi nyirokszervben autonóm, míg a másik két szövetben nem autonóm módon szabályozza a plazmatocitákérését. Mindez alátámasztja azt a megfigyelést, hogy a *hdc* mutációja, illetve csendesítése szuppresszálja az egyes tumoros vonalak szesszilis szövetében megfigyelhető fenotípust (Martin Schmid, UCMP, Umeå, Svédország, személyes közlés). Ez egyben azt is feltételezi, hogy a kialakulásuk során a kompartmentumok között kommunikáció zajlik.

5.5. Az UAS szekvenciák közötti esetleges kompetíció vizsgálata:

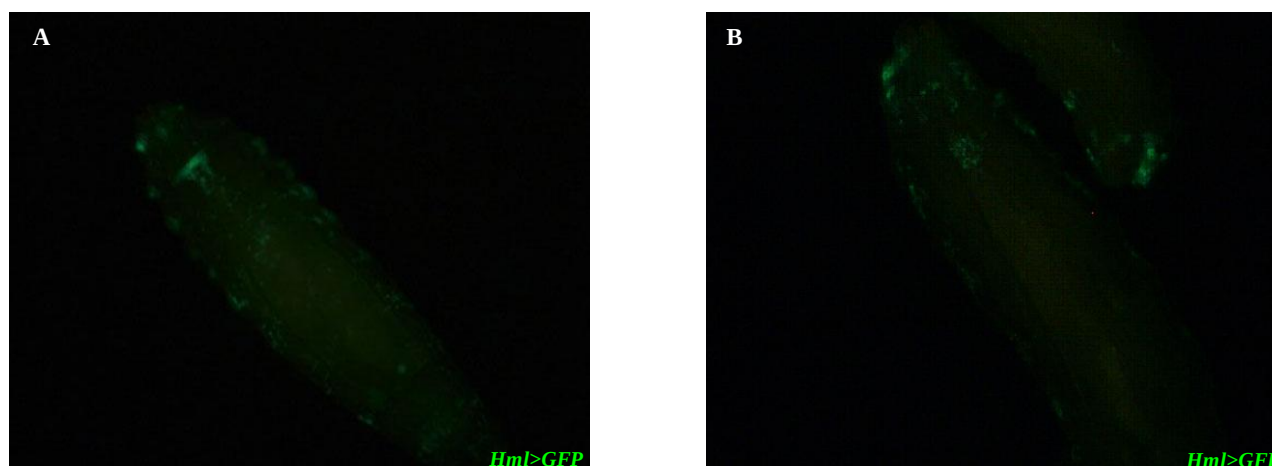
Annak érdekében, hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy a megfigyelt jelenség (a GFP kifejeződés csökkenése) az UAS elemek között a GAL4 forrásért fellépő kompetíció következménye, több kísérletet is elvégeztünk.

Megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a fenotípus, ha azonos dóziszú GAL4 forrás mellett megnöveljük az UAS-GFP transzgén arányát a csendesítő konstrukcióhoz képest. A *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/+*; *UAS-2xEGFP/+* transzgén hordozó lárvákban a *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/+* kontrollhoz hasonlóan megfigyelhető volt a GFP kifejeződés nagymértékű csökkenése (14. ábra).



14. ábra: az UAS-GFP transzgén arányának növelése nem változtatja meg a GFP kifejeződés mértékét. A: *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/+*; B: *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/+*; *UAS-2xEGFP/+*.

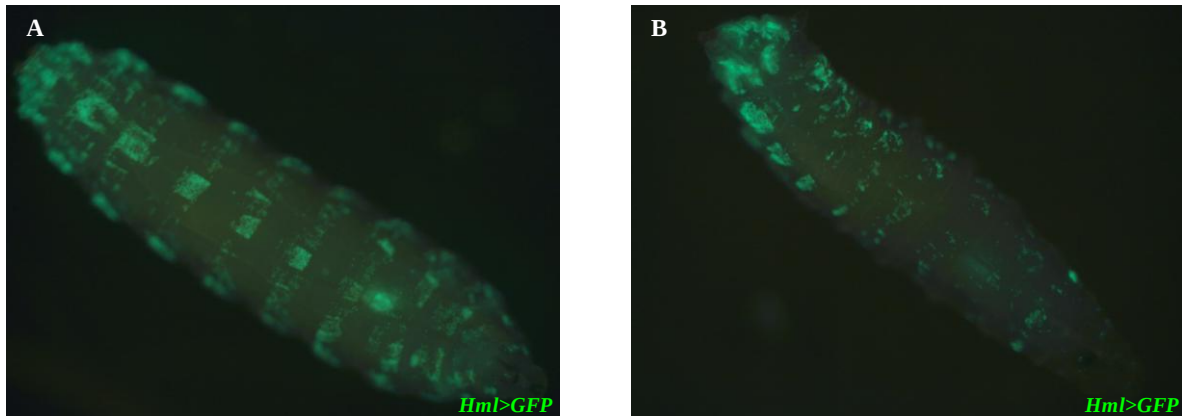
Ha azonos dóziszú GAL4 forrás mellett az *UAS-hdcRNSi* transzgén arányát növeltük az UAS-



15. ábra: az *UAS-hdcRNSi* transzgén-arány növelésének hatása. A: *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/+*; B: *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/UAS-hdcRNSi*.

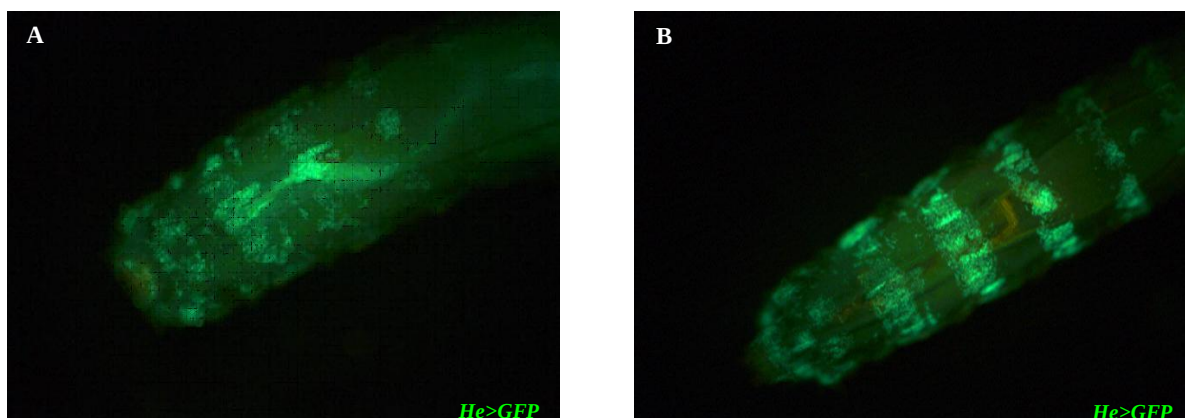
GFP-hez képest (*Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/UAS-hdcRNSi*) a fenotípus szintén a *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/+* kontrollhoz hasonló volt (15. ábra).

Abban az esetben, amikor mind a riporter konstrukció, mind pedig a meghajtóelem arányát megnöveltük a csendesítő transzgénhez képest (*Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/Hml-Gal4*, *UAS-GFP*), a kontrollhoz (*Hml-Gal4*, *UAS-GFP*) viszonyítva szintén csökkent a GFP kifejeződés (16. ábra).



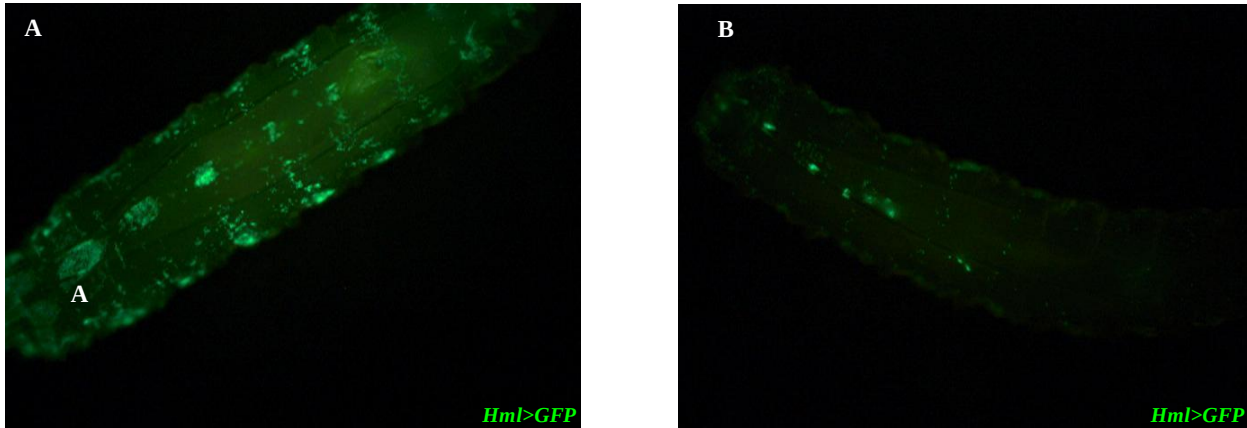
16. ábra: az *UAS-hdcRNSi* transzgén arányának csökkentése is GFP kifejeződés csökkenést okoz. A: *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*; B: *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi/Hml-Gal4*, *UAS-GFP*.

Megvizsgáltuk, hogy más vérsejtspecifikus meghajtóelem alkalmazása esetén is tapasztalunk-e hasonló jelenséget. Létrehoztunk egy *UAS-hdcRNSi*; *He-Gal4*, *UAS-2xEGFP* homozigóta vonalat, azonban a *He-Gal4*, *UAS-2xEGFP* vonal szesszilis szövetének mintázatához képest ebben az esetben nem történt változás, a GFP kifejeződés mintázata és erőssége megegyezett a két vonal lárváiban (17. ábra).



17. ábra: a *hdc* vérsejt-specifikus csendesítése *He-Gal4* meghajtóelemmel. A: *He-Gal4*, *UAS-2xEGFP*; B: *UAS-hdcRNSi*; *He-Gal4*, *UAS-2xEGFP*.

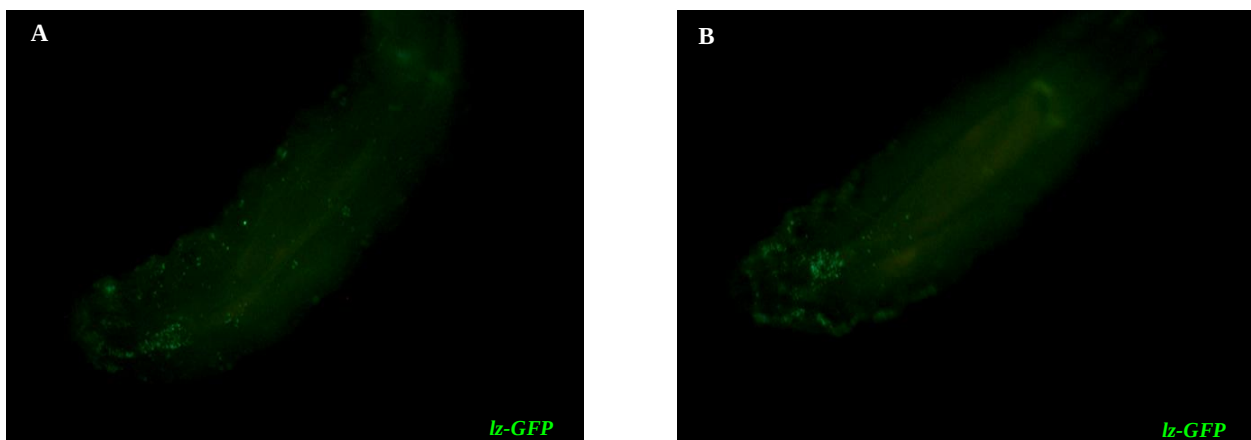
Megvizsgáltuk azt is, hogy mi történik abban az esetben, ha a laboratóriumunkban kifejlesztett sejtvonaljelölő rendszer segítségével konstitutívvá tesszük a Gal4 kifejeződését a *Hml*-sejtvonalban (18. ábra). A *y, w, UAS-Flp/+; Hml-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi/AFG* genotípusú



18. ábra: a *hdc* csendesítése a *Hml* vonalban. A: *y w UAS-Flp; Hml-Gal4, UAS-GFP/AFG*, B: *y w UAS-Flp; Hml-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi/AFG*.

lárvákban tehát egyszerre megnöveltük és folyamatosá tettük a rendelkezésre álló Gal4 mennyiséget, valamint biztosítottuk a csendesítő és a riporter transzgének folyamatos kifejeződését. A jellegzetes fenotípus, azaz a GFP kifejeződés csökkenése ebben az esetben is megjelent.

Abban az esetben, amikor a *lozenge*-sejtvonalban csendesítettük a *hdc* kifejeződését a *y, w, lz-Gal4, UAS-Flp/+; AFG/UAS-hdcRNSi* lárvák szesszilis hemocitáiban a GFP kifejeződés a *y, w, lz-Gal4, UAS-Flp/+; AFG/+* lárvákhöz képest nem változott jelentősen (19. ábra). Egy vérsejtfüggetlen meghajtóelemmel (*eyeless-Gal4*) történő *hdc*-csendesítés során nem változott a GFP kifejeződés mintázata.

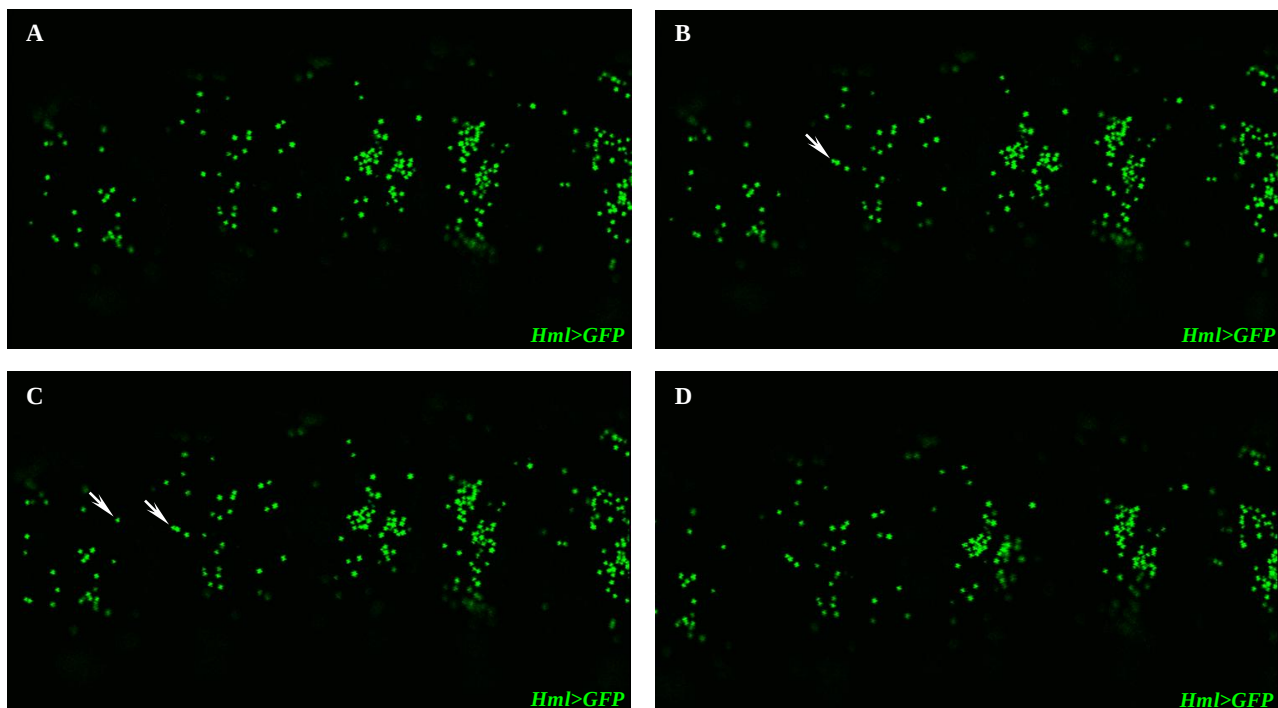


19. ábra: a *hdc* csendesítése a *lz* vonalban. A: *y, w, lz-Gal4, UAS-Flp/+; AFG/+*, B: *y, w, lz-Gal4, UAS-Flp/+; AFG/UAS-hdcRNSi*

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a megfigyelt jelenség nem az *UAS* elemek közötti kompetíciónak, hanem valóban a *hdc* csökkent mennyiségének következménye.

5.6. A szesszilis szövet szerkezetének *in vivo* vizsgálata:

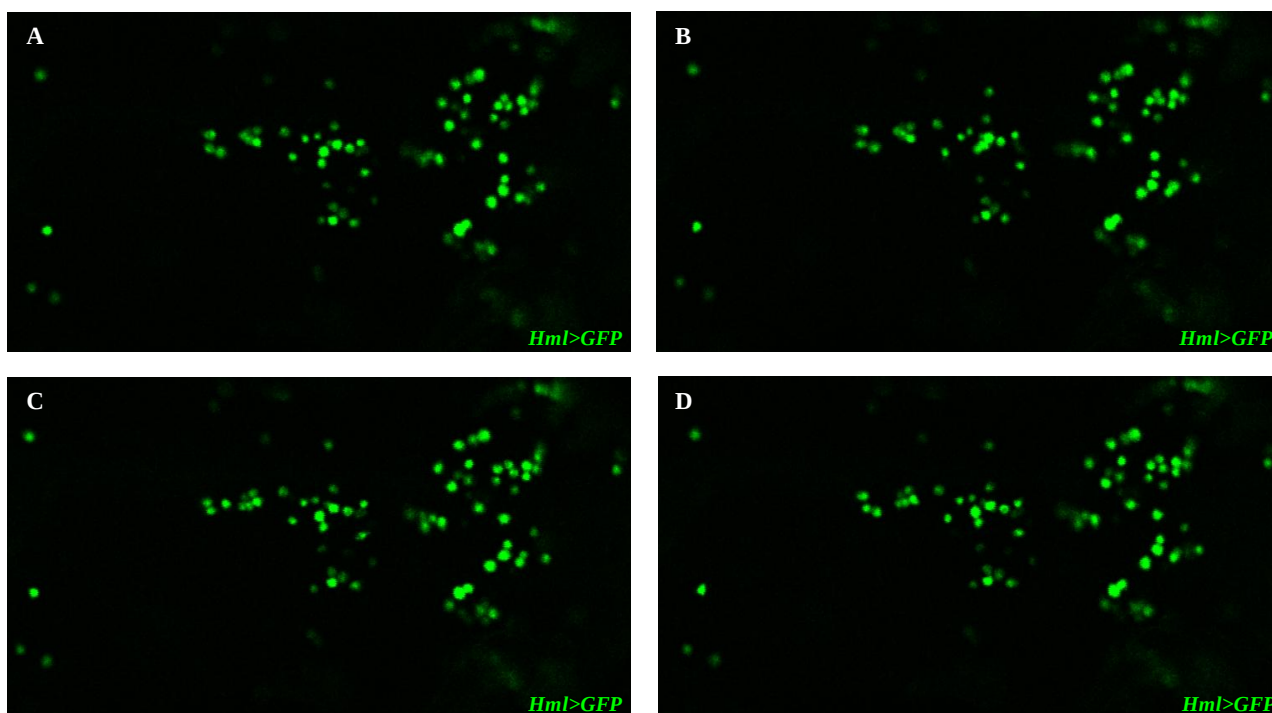
A szesszilis szövet szerkezetének és változásainak vizsgálatához *in vivo* konfokális videomikroszkópiát alkalmaztunk. A korábbi elképzelések szerint a szesszilis kompartmentum egy statikus struktúra, amit a vérsejtek csak indukció hatására hagynak el. A *Hml-Gal4, UAS-GFP* lárva vizsgálata során azonban kiderült, hogy a szesszilis szövet szerkezete folyamatosan, dinamikusan változik: kitapadt hemociták hagyják el a helyüket, és lépnek a keringésbe, a hemolimfából pedig keringő sejtek tapadnak ki a testüreg falához (20. ábra). Bár ez a dinamikus átrendeződés folyamatosan zajlik, a felvételek alapján megállapíthatjuk, hogy a szesszilis vérsejteknek csak egy része vesz részt ebben a folyamatban, míg a szövet sejtjeinek másik hányada statikusan megtartja pozícióját.



20. ábra: a szesszilis szövet dinamikusan változó struktúrája összekapcsolja a kompartmentumot a keringéssel. A képek a *Hml-Gal4, UAS-GFP* lárva szesszilis szövetéről készült konfokális videofelvétel pillanatképei. A nyilak a testfalhoz a keringésből kitapadó sejteket jelölik.

5.7. A *hdc* csendesítésnek a szesszilis szövet felépítésére gyakorolt hatása:

Megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van a *hdc* csendesítése a szesszilis szövet dinamikus struktúrájára. A kísérletet a *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi* lárvákon végeztük, és kontrollként a *Hml-Gal4*, *UAS-GFP* vonalat használtuk. A vizsgálat során nem figyeltünk meg a kontroll lárvákhoz hasonló változásokat: a testfalhoz tapadt sejtek nem hagyták el a szövetet, és keringő sejtek kitapadása sem volt észlelhető, a szövet szerkezete statikussá vált (21. ábra). Ez alapján valószínű, hogy a *hdc*-nek a plazmatociták érésén túl szerepe van a szesszilis szövet struktúrájának kialakításában is. Azonban a jelenségnek lehetséges magyarázata az is, hogy a beavatkozás hatására csökken a GFP-t kifejező sejtek, vagyis az *in vivo* megfigyelhető sejtek száma, így annak az esélye is csökken, hogy mozgó hemocitákat észleljünk.

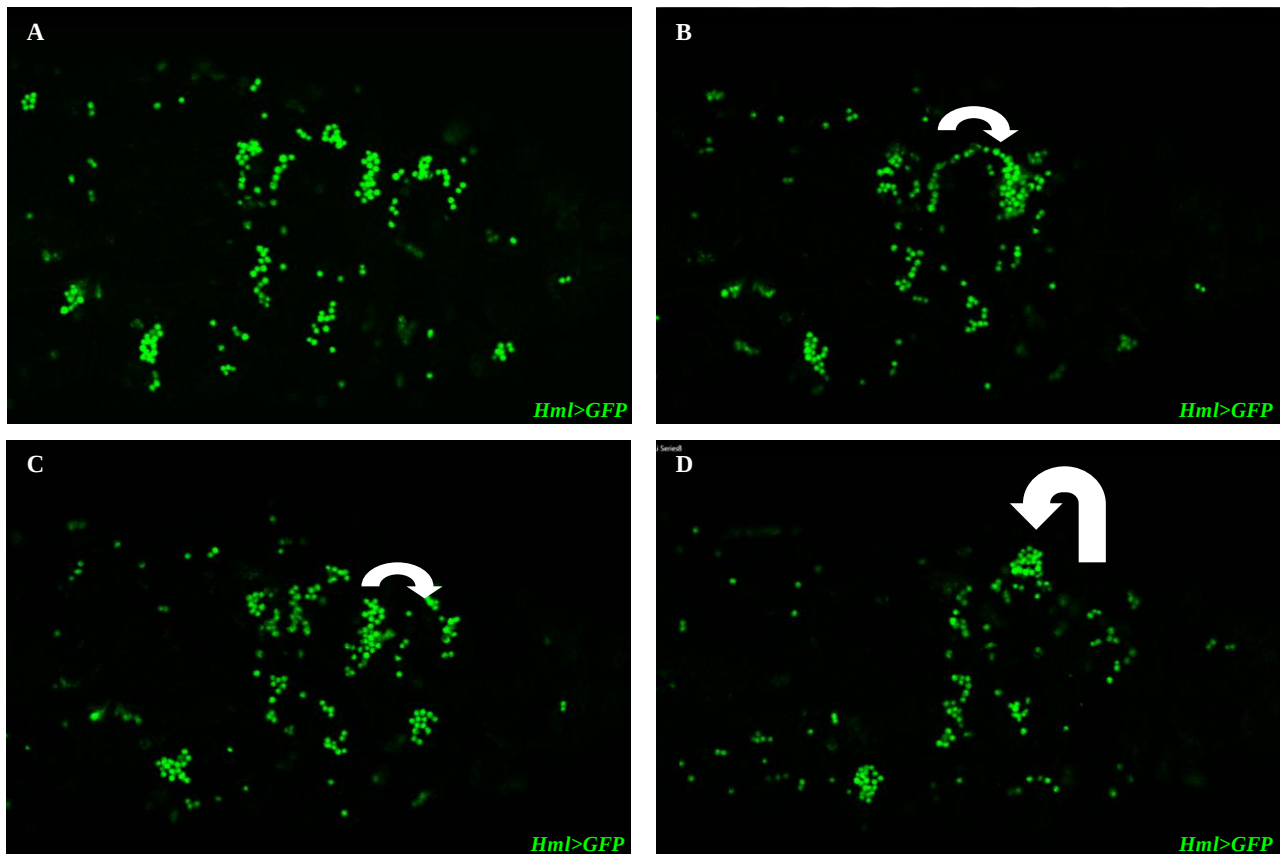


21. ábra: a *hdc* csendesítésének hatására a szesszilis szövet statikussá válik. A képek a *Hml-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-hdcRNSi* lárvák szesszilis szövetéről készült konfokális videofelvétel pillanatképei. A képek időben egymást követik.

5.8. Az *eater* csendesítés hatása a szesszilis szövet szerkezetére és dinamikájára:

Az *Eatert* korábban a fagocitózis receptoraként írták le. Csoportunkban megfigyeltük és megerősítettük, hogy a fehérje a szesszilis szövet struktúrájának fenntartásában is szerepet játszik: az *eater* vérsejt specifikus csendesítésének hatására a szesszilis hemociták leválnak a testüreg faláról, a keringő sejtek száma pedig megemelkedik. Megfigyelésünk szerint a szesszilis szövet mobilizálódása nem vezet lamellociták differenciálódásához a *Hml-Gal4* *UAS-GFP*; *UAS-*

*eater**RNSi/TM3* lárvák keringésében. A szesszilis szövet szerkezetének változásait *in vivo* konfokális videomikroszkópia segítségével követtük nyomon. Kontrollként ismét a *Hml-Gal4 UAS-GFP* törzset alkalmaztuk. A felvételekből kiderült, hogy az *eater* csendesítésének hatására a szesszilis szigetek mobilizálódnak, és a sejtek egymással asszociálódva a testfal mentén mozognak (22. ábra).

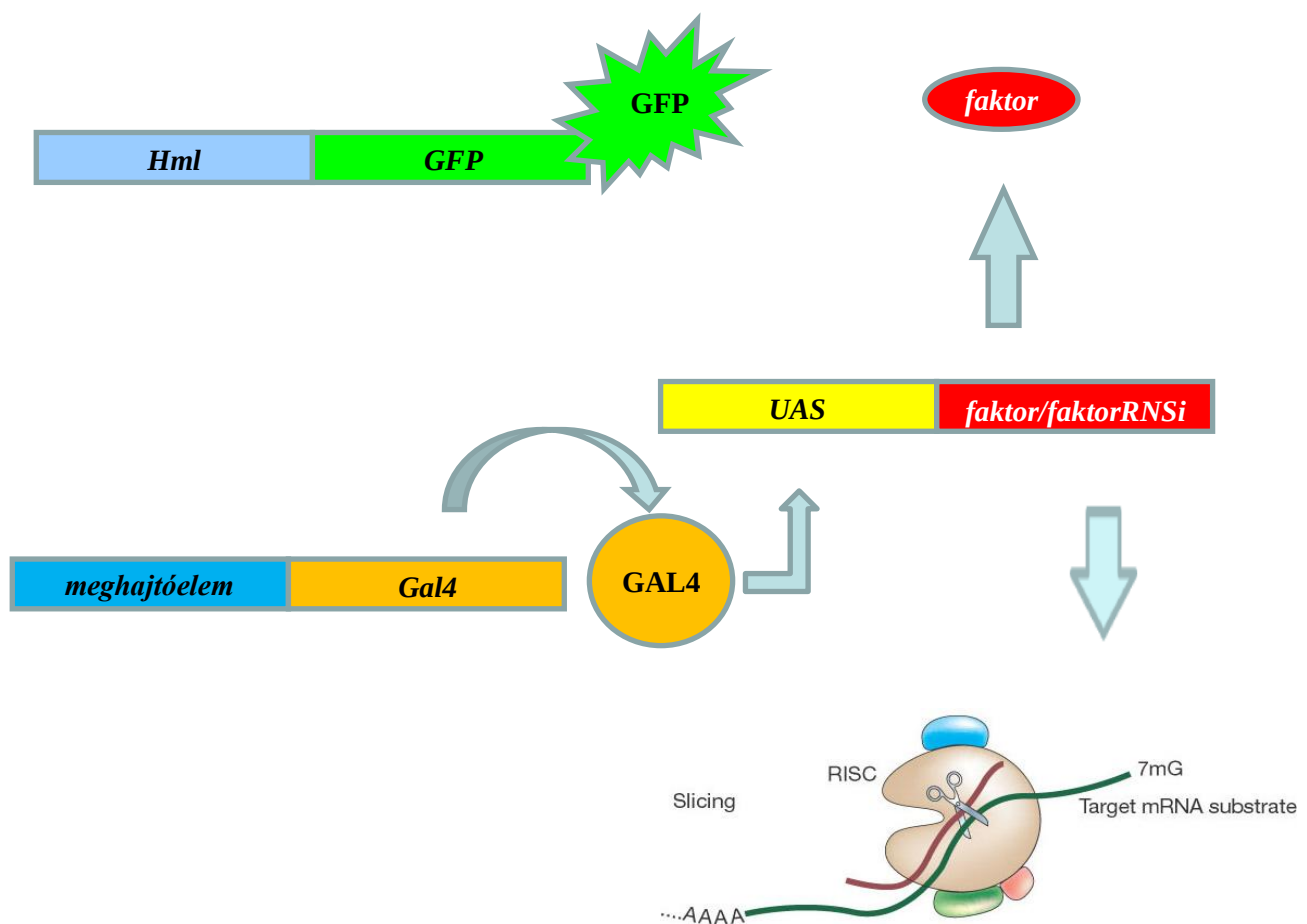


22. ábra: a szesszilis szigetek az *eater* csendesítésének hatására mobilizálódnak. A képek *Hml-Gal4, UAS-GFP; UAS-eaterRNSi/TM3* lárvá szesszilis szövetéről készült konfokális videofelvétel pillanatképei. A képek időben követik egymást. A nyilak a mobilizálódó, egymással összekapcsolódó, majd egymástól elváló szesszilis szigetek mozgásának irányát mutatják.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az Eater fehérje nem csupán fagocitózis receptorként működik, hanem fontos szerepet játszik a szesszilis szövet szerkezetének megtartásában. Az *eater* csendesítése során tapasztalt jelenségek is alátámasztják azt a megfigyelésünket, hogy habár a szesszilis szövet szerkezetének felbomlása és a lamellociták differenciálódása az immunindukció hatására egymást követve zajlik, molekuláris mechanizmusaikat tekintve a két jelenség szabályozása független egymástól.

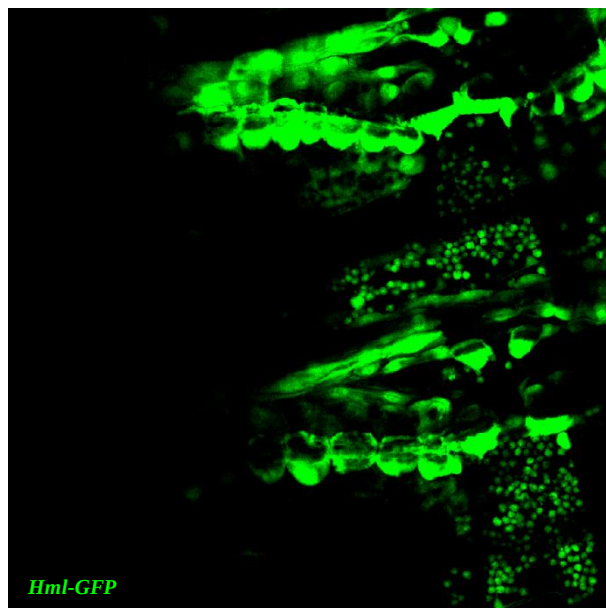
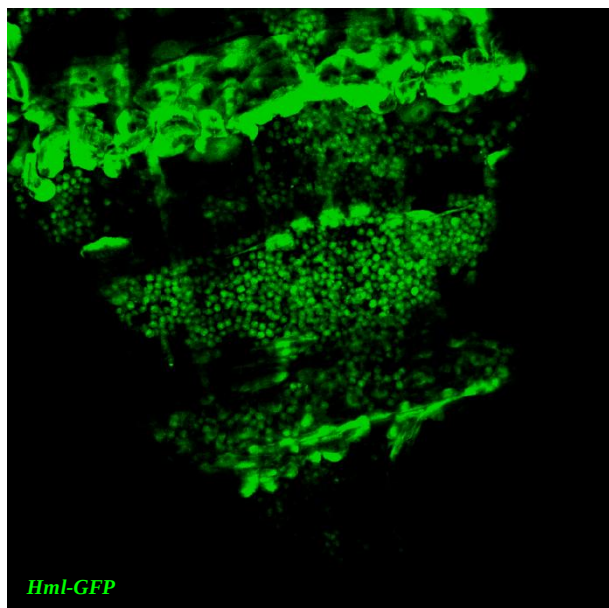
5.9. A GAL4-független *Hml-GFP* konstrukciót hordozó vonalak vizsgálata:

Mivel jelenlegi ismereteink szerint a Headcase nem fejeződik ki sem a keringésben sem pedig a szesszilis szövetben, elképzelhető, hogy a központi nyirokszervben kifejeződő Hdc nem-kompartmentum autonóm módon a másik két kompartmentumban is szabályozza a plazmatociták érését. Ahhoz, hogy a *hdc* gén nem-kompartmentum autonóm szabályozó szerepét vizsgálni tudjuk, olyan transzgenikus konstrukciókat hordozó vonalakat hoztunk létre, melyekben a riporter GFP kifejeződését közvetlenül a *Hml* gén promótere biztosítja (23. ábra). A 230 embrió mikroinjektálását követően 25 esetben kaptunk beépülést. A konstrukció megfelelően működött: a lárvális hemociták kifejezték a GFP-t, míg a többi szövetben Cherry expresszió volt megfigyelhető.



23. ábra: a GFP meghajtóelemtől független kifejeződésének biztosítása *Hml-GFP* transzgén segítségével. A közvetlenül a GFP kódoló szekvenciája elé klónozott *Hml* promóter a meghajtóelemtől, illetve a *GAL4-UAS* rendszertől függetlenül biztosítja a GFP kifejeződését.

Az eddigi vizsgálatok szerint a konstrukciót hordozó vonalak alkalmasak a kísérletek elvégzésére: a hemociták a várt mintázatban fejezik ki a *Hml-GFP* markert (24. ábra).



24. ábra: a *Hml-GFP* transzgén kifejeződési mintázata. A GFP marker kijelöli a szessilis szövet véresejtjeit.

Ezen vonalak felhasználásával a GFP expressziójától függetlenül tudjuk vizsgálni a különböző kompartmentum-, illetve véresejttípus specifikus *Gal4* forrásokkal kifejeztetett, illetve csendesített faktorok nem-autonóm hatását.

6. Összefoglalás

A *Drosophila melanogaster* kiváló modellrendszer a vérsejtek és a hematopoietikus kompartmentumok kialakulásának és működésének a vizsgálatára. A rendelkezésre álló vérsejt- és kompartmentum specifikus genetikai meghajtóelemek, valamint csendesítő és túltermelő transzgenikus konstrukciók felhasználásával a differenciálódási és szerveződési folyamatok részletesen és számos megközelítési irányból, akár *in vivo* is vizsgálhatóak.

Az említett elemekből építkező kísérleti rendszerünk segítségével vizsgáltuk a szesszilis hematopoietikus kompartmentumban található vérsejtek időbeli viselkedését. Megfigyeltük, hogy a szesszilis szövet sejtjei a központi nyirokszervben található sejtektől eltérően, képesek a keringésbe lépni, illetve keringő sejtek a szövetbe kitapadni.

Tanulmányoztunk két olyan fehérjét, (a Headcase-t és az Eater-t) tanulmányoztunk, amelyek kísérleteink szerint szerepet játszanak a szesszilis szövet differenciálódásának és működésének szabályozásában.

A *hdc^{B5}* allél *hdc-Gal4* meghajtóelemmé való konverziója lehetővé tette a gén kifejeződési mintázatának időbeli követését. Megfigyeltük a *hdc* funkcióját a hemociták differenciálódása során: a faktor csendesítése gátolta a plazmatociták érését a lárva mindhárom hematopoietikus kompartmentumában. Vizsgálataink alapján a Headcase nem kizárólag a vérsejt-differenciálódás regulátora, hanem szerepe lehet a szesszilis szövet dinamikus struktúrájának fenntartásában is. Mivel a *headcase* sem a keringésben, sem pedig a szesszilis szövetben nem fejeződik ki, hatása azonban ezekben a kompartmentumokban is érvényesül, valószínű, hogy a faktor a központi nyirokszervben kompartmentum autonóm, míg a másik két szövetben nem-kompartmentum autonóm módon szabályozza a hemociták érését. Ez megerősíti azt az elképzelést, mely szerint az egyes hematopoietikus kompartmentumok kialakulásuk és működésük során kommunikálnak egymással.

A nem-autonóm működés vizsgálatához előállítottunk olyan transzgenikus vonalakat, melyekben a GFP riportergén kifejeződését nem egy genetikai meghajtóelem, hanem közvetlenül a *Hml* gén promótere biztosítja. Ezáltal lehetőségünk nyílik a különböző kompartmentum specifikus meghajtóelemek alkalmazásával - a GFP expressziótól függetlenül - vizsgálni a *headcase* és egyéb faktorok nem kompartmentum autonóm hatását.

Egy fagocitózis receptor, az Eater vizsgálata során megfigyeltük, hogy a fehérje nem csak a baktériumok bekebelezésében játszik fontos szerepet, hanem a szesszilis szövet integritásának fenntartásában is: a faktor csendesítésének hatására a szesszilis szigetek mobilizálódtak. Azonban a

kísérletek során lamellociták differenciálódását nem figyeltünk meg, így megállapíthatjuk, hogy a szesszilis vérsejtek testfalról történő leválása és a tokképző sejtek képződése - az eddigi elképzelésekkel ellentétben - egymástól független folyamatok.

Eredményeink alapján a *Drosophila melanogaster* vérsejtjeinek differenciálódása, illetve hematopoietikus kompartmentumainak kialakulása és működése sejt- és kompartmentum-autonóm, valamint nem-autonóm módon ható szabályozási folyamatok együttműködésének eredménye.

7. Irodalomjegyzék

- Chien CC, Chang CC, Yang SH, Chen SH, Huang CJ (2006) A homologue of the *Drosophila* Headcase protein is a novel tumor marker for early-stage colorectal cancer. *Oncol Rep* 15:919-926
- Dowejko A, Bauer RJ, Müller-Richter UD, Reichert TE (2009) The human homolog of the *Drosophila* Headcase protein slows down cell division os head and neck cancer cells. *Carcinogenesis* 30:1678-1685
- Dowejko A, Bauer R, Bauer K, Müller-Richter UD, Reichert TE (2012) The human HECA interacts with cyclins and CDKs to antagonize Wnt-mediated proliferation and chemoresistance of head and neck cancer cells. *Exp Cell Res* 318:489-499
- Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U (2003) Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* 5:673-690
- Fossett N, Tevosian SG, Gajewski K, Zhang Q, Orkin SH, Schulz RA (2001) The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1 and FOG-2 function as negative regulators os blood, heart and eye development in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7342-7347
- Fossett N, Hyman K, Gajewski K, Orkin SH, Schulz RA (2003) Combinatorial interactions of *serpent*, *lozenge* and *U-shaped* regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11451-11456
- Franc NC, Dimarcq JL, Laqueur M, Hoffmann J, Ezekowitz RA (1996) Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 4:431-443
- Goto A, Kodowaki T, Kitagawa Y (2003) *Drosophila hemolectin* gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol* 264: 582-591.
- Hartenstein V (2006) Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:677-712
- Hoffman JA, Hoffman D (1990) The inducible antibacterial peptides of dipteran insects. *Res Immunol* 141:910-918
- Hoffmann JA (1995) Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 7:4-10
- Hoffmann JA (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426
- Holz A, Bossinger B, Strasser T, Janning W, Klapper R (2003) The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 130:4955-4962

- Honti V, Csordás G, Márkus R, Kurucz É, Jankovics F, Andó I (2010) Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Mol Immunol* 47:1997-2004
- Jung SH, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U (2005) The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132:2521-2533
- Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, Strom C, Conto SL, Hetru C, Stuart LM, Stehle T, Hoffmann JA, Reichhert JM, Ferrandon D, Ramet M, Ezekowitz RA (2005) Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123:335-346
- Krieg A (1958) Immunity in insect; contribution to comparative immunology. *Z Immun* 115:472-477
- Krzemien J, Dubois L, Makki R, Meister M, Vincent A, Crozatier M (2007) Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 446:325-328
- Kurucz É, Zettervall CJ, Sinka R, Vilmos P, Pivarcsi A, Ekengren S, Hegedüs Z, Andó I, Hultmark D (2003) Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2622–2627.
- Kurucz É, Márkus R, Zsámboki J, Medzihradszky K, Darula Zs, Vilmos P, Udvardy A, Krausz I, Lukacsovich T, Gateff E, Zettervall CJ, Hultmark D, Andó I (2007) Nimrod, a putative phagocytosis peceptor with EGF pepeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Current Biology* 17:649-654
- Kurucz É, Vácsi B, Márkus R, Laurinyecz B, Vilmos P, Zsámboki J, Csorba K, Gateff E, Hultmark D, Andó I (2007) Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biologica Hungarica* 58: Suppl. 95-111
- Lebestky T, Chang T, Hartenstein V, Banerjee U (2000) Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 288:146-149
- Márkus R, Laurinyecz B, Kurucz É, Honti V, Bajusz I, Sipos B, Somogyi K, Kronhamn J, Hultmark D, Ando I (2009) Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4805-4809
- Muratoglu S, Garratt B, Hyman K, Gajewski K, Schulz RA, Fossett N (2006) Regulation of *Drosophila* friend of GATA gene, *u-shaped*, during hematopoiesis: a direct role for *serpent* and *lozenge*. *Dev Biol* 296:561-579

- Nappi AJ (1973) Hemocytic changes associated with the encapsulation and melanization of some insect parasites. *Experimental Parasitology* 33:285-302
- Rizki TM (1957) Alterations in the haemocyte population of *Drosophila melanogaster*. *J Morphology* 100:437-458
- Steneberg P, Englund C, Kronhamn J, Weaver TA, Semakovlis C (1998) Translational readthrough in the *hdc* mRNA generates a novel branching inhibitor in the *Drosophila* trachea. *Genes Dev* 12:956-967
- Steneberg P, Samakovlis C (2001) A novel stop codon readthrough mechanism produces functional Headcase protein in *Drosophila* trachea. *EMBO Rep* 2:593-597
- Stofanko M, Kwon SY, Badenhorst P (2008) A misexpression screen to identify regulators of *Drosophila* larval hemocyte development. *Genetics* 180:253-267
- Vilmos P, Nagy I, Kurucz É, Hultmark D, Gateff E, Ando I (2004) A rapid rosetting method for separation of hemocyte sub-populations of *Drosophila melanogaster*. *Dev Comp Immunol* 28:555-563
- Weaver TA, White RA (1996) *headcase*, an imaginal specific gene require for adult morfogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 121:4149-4160
- Williams MJ (2007) *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol* 178:4711-4716

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni csoportvezetőmnek, Andó Istvánnak, hogy a csoportjában dolgozhattam. Köszönöm a segítséget és a bizalmat.

Köszönöm Honti Viktornak, témavezetőmnek a rengeteg szakmai és emberi segítséget, amit a munkámhoz nyújtott. Köszönet a vezetésért, a tanácsokért, a gondolatokért és az idejében kapott segítségért.

Köszönettel tartozom korábbi témavezetőmnek, Kurucz Évának, hogy a kutatás rögzös útjain elindított, és rajta is tartott.

Köszönet jár Csordás Gábornak a tanácsokért, ötletekért, az informatikai problémák megoldásáért és az Egérért.

Köszönöm Bajusz Izabellának, Cinege Gyöngyinek, Márkus Róbertnek és Zsámboki Jánosnak a szakmai segítséget, ötleteket.

Szeretném megköszönni Balázs Anitának a szüzeket, Tápai Szilviának a preparátumok elkészítésében nyújtott segítséget és Kovalcsik Olgának a vegyszereket és a beugrásokat.

Köszönet jár a csoport többi tagjának, Abonyi Csillának, Gábor Erikának, Kari Beátának és Lerner Zitának a nem csak szakmai segítségért.

Köszönöm Jankovics Ferencnek az *in vivo* konfokális videókat, Krausz Ildikónak az injektálást és Lukacsovich Tamásnak a transzgenikus konstrukciókat.

Szeretném megköszönni az SZBK CI laborjának a konfokális mikroszkóp használatában nyújtott segítséget.

Köszönöm az SZBK *Drosophilas* közösségének a termékeny közeget.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak, hogy mögöttem álltak. Nélkülük nem készült volna el ez a dolgozat.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Varga Gergely István a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- *Drosophila* lárvák *in vivo* vizsgálata
- fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálat
- immunindukció,
- *w; Hml>GFP, UAS-hdcRNSi* törzs előállítása és ellenőrzése,
- *w; UAS-hdcRNSi; He>GFP* törzs előállítása,
- a keringő vérsejtek vizsgálata indirekt immun-fluoreszcenciával,
- központi nyirokszerv, illetve szesszilis szövet preparátum készítését végeztem el, valamint részt vettem a:

- *hdc-Gal4* vonalak létrehozása P-elem mobilizáláson alapuló génkonverzióval
- konfokális mikroszkópiás vizsgálat
- *in vivo* konfokális videomikroszkópiás vizsgálat
- GAL4-független *Hml-GFP* vonalak létrehozása mikroinjektálással munkafolyamatokban.

.....

aláírás

Szeged, 2012. november 05.