

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Genetika Tanszék

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT

Genetikai Intézet, Immunológiai csoport

XXXI. OTDK Biológia Szekció

A rovarok veleszületett immunitásának vizsgálata

A házi méh sejt-közvetítette immunitása

Készítette: **Gábor Erika**

Biológia MSc II. szamos hallgató

Témavezető: **Prof. Dr. Andó István**

Belső konzulens: **Dr. Török Tibor**



2012

Összefoglaló

A házi méh a *Hymenoptera* rendbe tartozó kozmopolita elterjedésű rovar. Az egyik legfontosabb faj a növények beporzásában, ezáltal a biodiverzitás kialakításában, nélkülözhetetlen a méztermelésben. A kolóniákat több patogén is károsítja, az utóbbi években világszerte több országban számoltak be megnövekedett méhelhullásról, amely súlyos gazdasági következményeket von maga után. Annak érdekében, hogy megoldást találjunk az elterjedt fertőzésekre, megbetegedésekre és megismerjük a kolóniák pusztulását okozó tényezőket, fontos megértenünk a házi méh immunrendszerének működését. A többi rovarfajhoz hasonlóan veleszületett immunitással rendelkezik, melynek sejt-közvetítette és humorális elemei vannak, de mivel szociális faj alapvető különbségeket, speciális elemeket tartalmazhat a már részletesen vizsgált organizmusokhoz képest. Alternatív stratégiákat alkalmaz, mint például a tisztogatási tevékenység vagy a „kaptárláz”. Korábbi tanulmányok alapján a sejt-közvetítette immunválasz effektorsejtjeit, a vérsejteket morfológiai jegyek alapján jellemezték, azonban ennek ellenére semmit nem tudunk még a különböző vérsejtpopulációk és alpopulációk pontos funkciójáról, differenciálódási vonalokról, vérképző szövet meglétéről.

Kísérleteinkben a házi méh sejt-közvetítette immunitásának elemeit a vérsejteket vizsgáljuk. Immunológiai markereket azonosítottunk melyek segítségével immunhisztokémiai és indirekt immunfluoreszcens módszerekkel elkülöníthetők a lárva és a kifejlett egyed keringő vérsejt típusai. A vérsejt-specifikus markerek alkalmasak lehetnek a házi méh immunitásának, sejt-közvetítette immunválaszának a vizsgálatára és a vérsejtképző szövetek azonosítására.

Tartalomjegyzék

Összefoglaló	2
Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezető.....	5
I.1 <i>A házi méh jellemzése</i>	5
I.2 <i>A házi méh kórokozói</i>	6
I.3 <i>A házi méh veleszületett immunitása</i>	6
I.4 <i>A házi méh genomja</i>	7
I.5 <i>Alternatív stratégiák az immunvédekezésben</i>	7
Célkitűzések	9
II <i>Anyagok és módszerek</i>	10
II.1 <i>Reagensek és oldatok</i>	10
II.2 <i>Az <i>Apis mellifera</i> egyedek tartási körülményei</i>	10
II.3 <i>Vérsejtek gyűjtése</i>	11
II.4 <i>Ellenanyagok előállítása</i>	11
II.5 <i>Immunhisztokémiai vizsgálatok</i>	12
II.6 <i>Indirekt immunfluoreszcens vizsgálatok</i>	13
III <i>Eredmények és az eredmények értékelése</i>	14
III.1 <i>A vérsejtek morfológiai jellemzői</i>	14
III.2 <i>Molekuláris klaszterek</i>	15
III.2 <i>Fagocitózis vizsgálat</i>	19
III.3 <i>A lárv szövetének vizsgálata</i>	20
Diszkusszió	21
További terveink	22
Mellékletek.....	23
Irodalomjegyzék.....	24
Köszönetnyilvánítás	27
Nyilatkozat.....	Error! Bookmark not defined.

Rövidítések jegyzéke

AEC	3-amino-9-etilkarbazol
BSA	borjú szérumalbumin
DAPI	4,6-diaminido-2-fenillindol
FBS	újszülött borjúsérum
FITZ	fluoreszcein-izotiocianát
HAT	hipoxantin-aminopterim-timidin
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HRP	tormaperoxidáz
IMD	immundeficiencia
JAK	Jánusz-kináz
PBS	foszfátokkal pufferelt fiziológias sóoldat
PEG	polietilén-glikol
PGRPs	peptidoglikán felismerő fehérjék
PTU	1-fenil-2-tiourea
T2/48	humán leukocita elleni antigén

Bevezető

I.1 A házi méh jellemzése

Regnum: *Animalia*

Phylum: *Arthropoda*

Classis: *Insecta*

Ordo: *Hymenoptera*

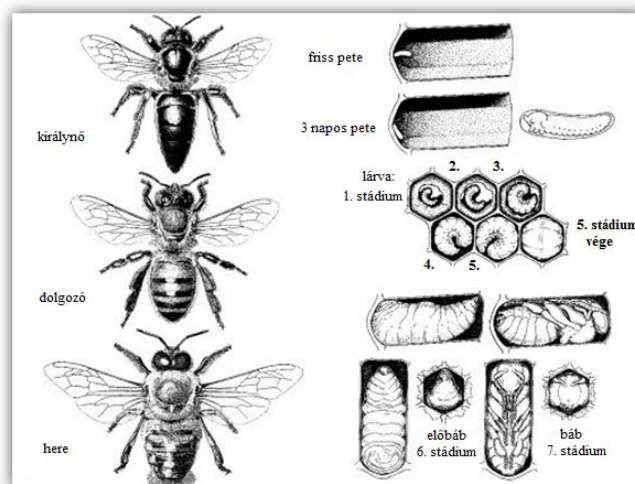
Familia: *Apiidae*

Genus: *Apis*

Species: *Apis mellifera*

A házi méh több ezer évvel ezelőtt házasított, kozmopolita elterjedésű, kizárólag családokban élő euszociális faj. Egy család általában 20 000-80 000 egyedből áll, melyek 3 kasztba rendeződnek: királynő, dolgozó és here. Normális körülmények között egyedül a királynő (méhanya) képes fertilis petét rakni a hatszögletű kaptársejtekbe, melyeket a dolgozók építenek. A fiatal dolgozók a kaptárban belső munkát végeznek: gondozzák a királynőt, a fiatal egyedeket és a lépet, míg az idősebb dolgozók külső munkássá válnak: pollent és nektárt gyűjtenek a környező növényekről. A herék kizárólagos feladata a párzás, ősz közeledtével a dolgozók elkergetik őket a kaptárból.

Az egyedek teljes átalakulással fejlődnek. A pete 3 nap után lárvává, körülbelül 6-7 nap után bábbá alakul. Az utolsó lárvastádium végén a dolgozók befedik a sejtet, amelyből 16.-24. napon a kifejlett egyed kirágja magát (Winston, 1991).



1. ábra A házi méh kasztok és fejlődési stádiumok összehasonlítása (Dade, 1977 után, módosítva))

A házi méh mind ökológiai, mind gazdasági szempontból az egyik legjelentősebb haszonállat. Jelentős mértékben hozzájárul a biodiverzitás kialakításához a növények

beporzásán keresztül. Nélkülözhetetlen a méztermelésben, a különböző „méhtermékek”, mint a propolisz, virágpor, méhméreg stb., előállításában, amelyek az élelmiszeripar, a gyógyszeripar és a kozmetikai ipar alapanyagául szolgálnak (Moritz et al., 2010).

I.2 A házi méh kórokozói

Számos kórokozó károsítja a fiakat és a dolgozókat egyaránt. Bakteriális fertőzés okozza az amerikai nyúlós költésrothadást. A *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* Gram-pozitív baktérium a lárvák rothadását váltja ki (Alippi et al., 2002). Hasonló tünetei vannak a *Mellisococcus pluton* által előidézett európai költésrothadásnak is (Arai et al., 2012). Gombás fertőzés például az *Ascosphaera apis* keltette „Chalkbrood”-betegség, mely évről évre jobban terjed. Önmagában nem végez kolóniamértékű pusztításokat, azonban így is komoly gazdasági károkat okozhat (Aronstein et al. 2010). A kifejlett egyedek szárnyelégtelenségét okozza a DWV (deformed wing virus) fertőzés, melynek következtében röpképtelenné válnak az egyedek, és az egészséges dolgozók kirekesztik őket a kolóniából (Chen et al., 2007). A házi méh atkásodásért többek között felelős fajok a *Varroa destructor* és *Varroa jacobsoni*. Ezek külső paraziták, melyek a kifejlett egyedek vérével táplálkoznak így gyengítve azokat, ezáltal a méhek sokkal fogékonyabbak lesznek egyéb fertőzésekre (Anderson et al., 2000). A *Nosema cerenae* és *Nosema apis* okozott hasmenés szintén hozzájárul méhelhulláshoz (Chen et al., 2010). Ezenfelül, nemrégiben felfedezték, hogy egy légy faj is szerepet játszhat a kaptárelhagyás jelenségében. Az *Apocephalus borealis* kifejlett egyedek potrohában helyezi el petéjét, aminek hatására a dolgozók a fény felé szállnak elvesztve tájékozódási képességüket (Core et al., 2012). Az utóbbi időben drámaian megemelkedett a kolóniák elnéptelenedéssel járó, súlyos gazdasági károkat eredményező pusztulása, amely több patogén együttes támadásának a következménye (Daniat et al., 2012). A házi méh a különböző patogének ellen immunválasszal és a szociális viselkedésből adódó alternatív védekező stratégiákkal veszi fel a harcot.

I.3 A házi méh veleszületett immunitása

A házi méh a többi rovarfajhoz hasonló veleszületett immunitással rendelkezik. Ezen belül két fő rendszer különíthető el: a sejt-közvetítette és humorális immunválasz. A sejt-közvetítette immunválasz effektor sejtjei a vérsejtek, melyek bekebelezik a mikrobákat. A parazitákkal szemben kialakuló tokképző reakció megléte (Wilson et al., 2008) eddig nem nyert megerősítést. A humorális immunválaszt a patogént érzékelő peptidoglikán felismerő fehérjék (PGRPs) indítják el, különböző jelátviteli utakat

aktiválva, mint a Toll-, Imd-, JAK- út, melynek eredményeként antimikrobiális peptidek termelődnek. Azonban összehasonlítva a *D. melanogaster* fajjal, ahol 20 típus különböztethető meg, a házi méhben eddig hatot fedeztek fel, melyek közül a hymenoptaecin fajspecifikus (Evans et al., 2006).

Morfológiai jegyek alapján más *Hymenoptera* fajokhoz hasonlóan (Amaral et al., 2010, Manfredini et al., 2008) kategorizálták a vérsejttípusokat. Megkülönböztetnek prohemocitákat, különböző plazmatocitákat, granulocitákat, önocitoidokat és koagulocitákat (Mohandes et al., 2010). A strukturális kategorizálás ellenére sem a morfológiailag egymástól különböző vérsejt típusok funkciói sem a differenciálódási vonalak nem ismertek. A különböző sejttípusok azonosítására nincsenek elérhető molekuláris markerek, és mindeddig vérsejtképző szöveteket sem sikerült azonosítani.

I.4 A házi méh genomja

A házi méh genomjának DNS szekvenciáit 2006-ban tették közzé (Consortium, 2006): számos olyan kódoló régiót sikerült azonosítani, amelyekről átíródó fehérjék részt vesznek az immunvédekezésben.

Több, a *D. melanogaster* immunfehérjéivel homológ szekvenciát találtak, többek között egy *NimA*-, egy *NimB*-, két *NimC*- és egy *draper*-szerű gént. Ezen gének az ecetmuslicában a fagocitózisban játszanak szerepet (Kurucz et al., 2007, Somogyi et al., 2010). A genom magas A+T és CpG tartalmú, a gerincesekre jellemző cirkadián ritmusról, RNS interferenciáról (RNSi) és DNS metilációért felelős szakaszt tartalmaz. A különböző kasztok és fejlődési stádiumok kialakulásában micro RNS-ek játszanak szerepet (Consortium, 2006).

A háziméhek genomja más rovarfajokhoz képest kevesebb immunválaszban résztvevő fehérjét kódol (Consortium, 2006). Ennek az lehet az oka, hogy a házi méh euszociális faj, és ebből adódóan az egyedszintű immunvédekezés kolónia szintű alternatív stratégiákkal egészül ki.

I.5 Alternatív stratégiák az immunvédekezésben

A házi méh szociális viselkedéséből adódóan egyéb kolóniákban élő fajokhoz hasonlóan (Armitage et al., 2010, Schlüns et al. 2009) speciális módszereket alkalmaz a fertőzések megelőzésére:

A tisztogatási tevékenység során a dolgozók felismerik és eltávolítják a kaptárból a fertőzött lárvákat elkerülve a fertőzés további terjedését. A „szociális vakcináció” során az egyedek tisztogatják egymást (Richard et al., 2008), felismerik, és eltávolítják egymás

testéről a rájuk tapadó kórokozókat. A tisztogatási hajlam vonalanként eltérő, és genetikailag öröklődik. A dolgozók képesek a kaptár hőmérsékletének megemelésére, ez az úgynevezett „kaptárláz” jelenség, ami egyes kórokozókat elpusztít, vagy megakadályozza azok fertőzőképességét. A fertőzött, beteg dolgozók csökkentik az érintkezést a királynővel és a kaptárral, vagy elhagyják a kolóniát.

Célkitűzések

Kísérleteinkben a sejt-közvetítette immunitás elemeinek a vizsgálatát tűztük ki célul a házi méhben, mivel a különböző vérsejttípusok funkciója és vérsejtképző szerve sem ismert. Immunológiai markerek azonosításával részletesebben szeretnénk vizsgálni az immunválasz elemeit, vérsejtképző szövetek után kutatunk, megvizsgáljuk a különböző kasztok és fejlődési stádiumok közti esetleges különbségeket.

A keringő vérsejtek immunfestődési mintázata alapján az egyes vérsejtekre specifikus immunológiai markereket azonosítunk. A későbbiekben ezeknek a markereknek a biokémiai, és molekuláris biológiai vizsgálatát tervezzük. A vérsejt-specifikus immunológiai markerek alkalmasak lehetnek immunszerv azonosítására, továbbá az egyedfejlődési stádiumokra, vagy egyes kasztokra specifikus molekulákat jelölhetnek ki.

II Anyagok és módszerek

II.1 Reagensok és oldatok

Oldatok:

- **AEC- oldat:** 0,05% AEC törzsoldat (Sigma Aldrich) 0,003% H₂O₂ nátrium-acetát pufferben
- **DAPI:** Sigma Aldrich, 20mg/ml 1:10000 0,1% PBS-BSA-ban hígítva
- **Drosophila-Ringer-oldat:** 111 mM NaCl, 1,87 mM KCl, 2,38 mM NaHCO₃, 1,1 mM CaCl₂, 0,84 mM NaH₂PO₄
- **FBS:** GIBCO
- **Fluoromont médium:** Southern Biotech, Fluoromont G
- **Glicerol-oldat:** 85% glicerol, 0,1 M TRIS
- **HAT:** Sigma Aldrich, 5 mM hipoxantin, 0,02 mM aminopterin, 0,8 mM timidin
- **Nátrium-acetát:** 2mM, pH 4,6
- **PBS-oldat:** 0,13 M NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄, pH 7,4
- **PEG 1540:** Sigma Aldrich
- **PTU:** Sigma, Aldrich
- **RPMI 1640:** GIBCO
- **Schneider-médium:** Sigma Aldrich

Ellenanyagok:

- **ALEXA 568:** Molecular Probes, 2 mg/ml 1:1000 0,1% PBS BSA-ban hígítva
- **Biotinált anti-egér kecske ellenanyag:** DAKO, 1,46 mg/ml 1:500 0,1% PBS-BSA-ban hígítva
- **Monoklonális ellenanyagok:** 2. táblázat
- **Streptavidin HRP:** DAKO, 0,85mg/ml 1:300 0,1% PBS-BSA-ban hígítva
- **T2/48:** humán leukocita entigén elleni ellenanyag, 0,5 mg ml⁻¹, 0,15 M NaCl

II.2 Az *Apis mellifera* egyedek tartási körülményei

Az általunk vizsgált méheket magyar szabvány szerinti ún. Tamási rendszerű 1/2 Boconádi, egyenlő lépes rakodó-kaptárakban tartjuk, melyben a keretek külmérete 42x18 cm és amely fiókonként 10 keretnyi lépet tartalmaz. Az alsó két fiók (2 x 10 keretnyi lép) szolgál „fészek” gyanánt, vagyis itt található az anya és a szaporulata. A fészek felett anyaráccsal van elválasztva a szükség szerint 1-3 fiókból álló „mézkamra”, melybe a család az elvehető tartalék mézet gyűjti. A méheket tavasztól nyár végéig vándoroltatjuk,

vagyis lehetőség szerint az éppen virágzó „méhlegelőkre” szállítjuk, ami április közepén repce, május közepén akác, június elején szíriai selyemkóró, és végül július elején napraforgó. Az állományt az akác és a napraforgó után amitráz tartalmú atkaölő szerrel, novemberben pedig oxálsavval kezeljük a *Varroa destructor* atka kártevő ellen. A méhek az utolsó gyűjtés után náluk hagyott kb. 5-10 kg-nyi napraforgó mézen és az arra etetett kb. 5-10 kg-nyi répacukor-szirupon telelnek, két fiókon.

A kísérleti egyedeket a kísérlet napján gyűjtöttük, tavasszal és nyáron. Azonnal felhasználtuk. A lárvákat *Drosophila*-Ringer oldattal mostuk ki a lépekből és begyűjtésüket követően öt órán belül használtuk a kísérletekben.

II.3 Vérsejtek gyűjtése

A lárva vérsejtjeinek gyűjtése során a lárvákat *Drosophila* Ringer-oldatban lemostuk, majd egy jéggel hűtött üvegtálba helyeztük. Egy fecskendő segítségével átszűrtük a kutikulát, majd egy másik helyen PTU-t, 5% FBS-t tartalmazó Schneider médiumot fecskendeztünk a lárvába, így tejszerű homogén, vérsejteket tartalmazó hemolimfát nyertünk. A sejteket 5 percig jégen üleptítettük, majd 4 000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk és 5% FBS-t tartalmazó Schneider médiumban szuszpendáltuk.

A kifejlett egyedeket CO₂-dal kábítottuk, majd egy fecskendő segítségével 50 µl 5% FBS-t tartalmazó Schneider médiumot fecskendeztünk az egyed torán keresztül a testüregbe, majd egy tű segítségével felsértettük a potrohát és a potrohon keresztül cseppenként távozó hemolimfát jégen álló 1,5 ml-es Eppendorf csőben fogtuk fel. A sejteket 5 percig jégen üleptítettük, majd 4 000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk és 5% FBS-t tartalmazó Schneider médiumban szuszpendáltuk.

A vérsejtek fagocitózisának in vivo vizsgálata során a lárvákba és a kifejlett egyedekbe 50 µl FITC jelölt *E.Coli*-t oltottunk, majd az egyedeket 45 perc után perfundáltuk.

II.4 Ellenanyagok előállítása

BALB/c egereket immunizáltunk háromszor, minden alkalommal 10⁵ *A. mellifera* lárvából nyert vérsejttel 3 hetes időközökkel. Az immunizálás után sejtszuspenziót készítettünk az egerek lépéből RPMI-1640 szövetkultúra médiumban. A lépsejteket Sp2/0 sejtekkel fuzionáltattuk PEG-1540 (Sigma Aldrich) hozzáadásával. A hibridómákat HAT (Aldrich, 5 mM hipoxantin, 0,02 mM aminopterin, 0,8 mM timidin) médiumon szelektáltuk. A szövetkultúra szupernatánsait használtuk a vérsejtek jellemzésére (Köhler et al., 1975, Köhler et al., 1976, Kurucz et al., 2007).

II.5 Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal figyeltük a markerek kifejeződését a vérsejteken és lárvális szöveteken. A kísérleteket 23°C-on végeztük.

A vérsejtek vizsgálata:

A vérsejtek egy többlyukú tárgylemezre tapasztottuk (SM-011, Hendley-Essex) 60 percig 5% FBS-t és PTU-t tartalmazó Schneider oldatban. A sejteket acetonnal fixáltuk 6 percig és levegőn szárítottuk, majd 0,1% PBS-BSA oldattal telítettük 20 percig. A sejteket 60 percig inkubáltuk a hibridóma felülúszóval, majd a mintákat három alkalommal 5 percig mostuk PBS oldattal. Biotinált anti-egér kecske ellenanyaggal (DAKO, 1,46 mg/ml 1:500 0,1% PBS-BSA-ban hígítva) inkubáltuk a lemezeket 45 percig, majd három alkalommal 5 percig mostuk PBS oldattal. Ezután a mintákat Streptavidin HRP-vel (DAKO, 0,85 mg/ml 1:300 0,1% PBS BSA-ban hígítva) kezeltük 45 percig majd újból háromszor 5 percig mostuk PBS-sel, ezt követően háromszor 3 percig nátrium-acetáttal (0,2 M, pH4,6). A reakciót 0,003% H₂O₂-t tartalmazó, nátrium-acetát pufferben (0,2 M, pH 4,6) oldott 0,05% 3-amino-9-etilkarbazol (AEC, Sigma-Aldrich) oldattal tettük láthatóvá. A folyamatot háromszor 5 perces desztillált vizes mosással állítottuk meg. A sejtmagok jelölésére 10 percig DAPI oldattal (Sigma Aldrich, 20mg/ml 1:10000 0,1% PBS-BSA-ban hígítva) inkubáltuk a mintákat, majd háromszor 5 percig mostuk desztillált vízben. A lemezeket glicerol oldattal fedtük és Zeiss Axioscope mikroszkópban, Nomarski, fáziskontraszt és fluoreszcens objektívvel vizsgáltuk.

Szövetek vizsgálata:

A testfestéshez szétbontottuk a lárvát Schneider, 5% FBS oldatban, majd 20 percig telítettük 0,1% PBS-BSA, Triton-X oldatban. Hozzáadtuk a hibridóma felülúszót 60 percre. A mintákat három alkalommal 10 percig mostuk PBS oldattal. Biotinált anti-egér kecske ellenanyaggal (DAKO, 1,46 mg/ml 1:500 0,1% PBS-BSA-ban hígítva) inkubáltuk 45 percig, majd háromszor 10 percig mostuk PBS oldattal, ezután Streptavidin HRP-vel (DAKO, 0,85 mg/ml 1:300 0,1% PBS BSA-ban hígítva) inkubáltuk 45 percen keresztül. A mintákat háromszor 10 percig mostuk PBS oldattal, majd háromszor 3 percig nátrium-acetáttal (0,2 M, pH4,6). A reakciót 0,003% H₂O₂-t tartalmazó, nátrium-acetát pufferben (0,2 M, pH 4,6) oldott 0,05% 3-amino-9-etilkarbazol (AEC, Sigma-Aldrich) oldattal tettük láthatóvá. A folyamatot háromszor 10 perces desztillált vizes mosással állítottuk le. A sejtmagok jelölésére 10 percig DAPI oldattal inkubáltuk a mintákat, majd háromszor 10 percig desztillált vízzel mostuk. A lemezeket glicerol oldattal fedtük, Zeiss Axioscope mikroszkópban, fáziskontraszt, Nomarski és fluoreszcens objektívvel vizsgáltuk.

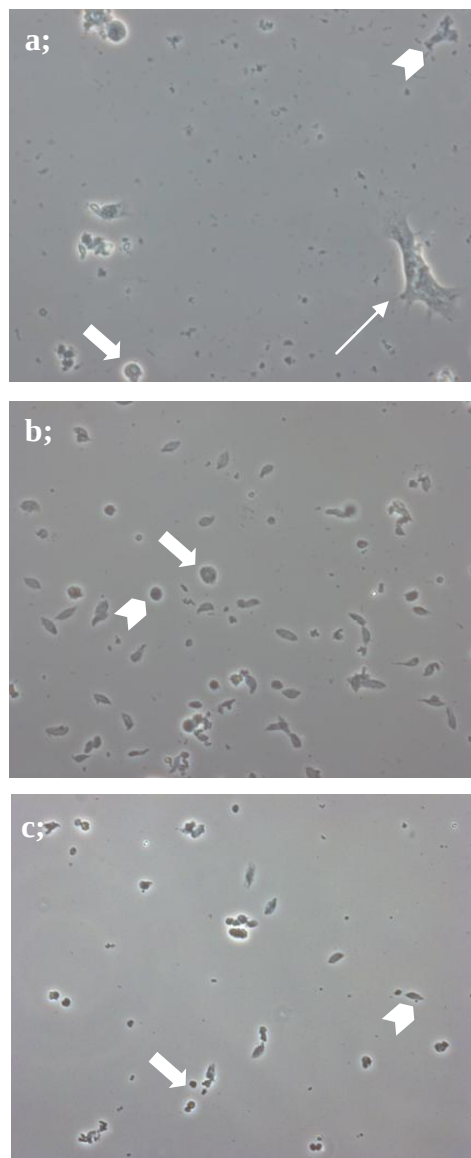
II.6 Indirekt immunfluoreszcens vizsgálatok

Indirekt immunfluoreszcens módszerrel vizsgáltuk a markerek kifejeződését a vérsejteken és a lárvális szöveteken. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük. A vérsejtek esetében a kísérlet menete a második ellenanyag hozzáadásáig megegyezik az immunhisztokémiai vizsgálat menetével (ld.:II.5. Immunhisztokémiai vizsgálatok). Második ellenanyagként anti-egér ALEXA 568 (Molecular Probes 1:1000, 0,1% PBS BSA-ban hígítva) oldatot használtunk, mely a sejtmagok megjelenítésére szolgáló DAPI-t (Sigma Aldrich, 20mg/ml 1:10000 0,1% PBS-BSA-ban hígítva) tartalmazott. A lemezeket a második ellenanyaggal 45 percig inkubáltuk, majd vérsejtek esetén háromszor 5 percig, szövetek esetén háromszor 10 percig mostuk PBS-ben. A mintákat Fluoremount-médiummal (Southern Biotech, Fluoromont G) fedtük le, majd elemzésük Zeiss Axioscope fluoreszcens mikroszkóp és Olympos konfokális mikroszkóp segítségével történt.

III *Eredmények és az eredmények értékelése*

III.1 *A vérsejtek morfológiai jellemzői*

Összehasonlítottuk a vérsejtek struktúráját különböző egyedfejlődési stádiumok és kasztok függvényében (2. ábra). A lárva és kifejlett egyed vérsejttípusai között a morfológiai jegyek alapján különbséget találtunk. Mindkét stádium hemolimfájában láthatunk kisebb és nagyobb szabályos szférikus (kerek) és nyúlványos sejteket, azonban a lárvában nagy nyúlványos sejteket is azonosítottunk. A herék és dolgozók vérsejttípusai között nem találtunk morfológiai különbséget.



2. ábra Vérsejttípusok morfológiai sajátosságai: lárva- (a); dolgozó- (b); here-(c) vérsejttípusainak összehasonlítása Zeiss Axioscope mikroszkópban, fáziskontraszt objektívvel, 20x-os objektív alatt. Mindhárom kasztban láthatunk szabályos szférikus (⇨) és nyúlványos (⇩) sejteket, azonban a lárvában azonosítottunk nagy aszimmetrikus nyúlványos sejteket is (⇨).

III.2. Molekuláris klaszterek

A különböző típusú vérsejtek funkcionális elkülönítése céljából monoklonális ellenanyagokat termeltettünk, melyeket immunfluoreszcens és immunhisztokémiai módszerekkel jellemeztünk. Ily módon a korábban már *D. melanogaster*-ben használt módszerre alapozva (Kurucz et al., 2007) immunológiai markereket azonosítottunk, melyeket a lárva és az adult keringő vérsejtjein történő megnyilvánulásuk alapján csoportosítottunk (1., 2. táblázat).

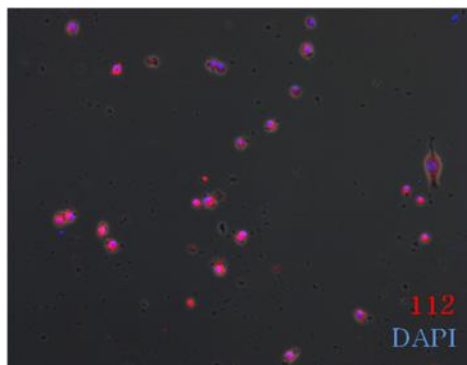
	Klón	Lárva (% pozitív sejt)	Adult (% pozitív sejt)
PÁNHE- MOCITA	1, 5, 35, 38, 40, 41, 76, 81, 98, 100, 112 , 120, 4A4, 4F8, 6C11, 8D10	>90	>90
HETEROGÉN	2, 28, 36, 61, 91	>90	< 90
	109 , 3G8	60-90	60-90
	43 , 80, 9F6	60-90	< 60
	23, 63, 88, 4E1, 5A2 , 6B3, 6F10	<60	< 60
LÁRVA- SPECIFIKUS	30, 57, 58, 64, 85	>90	0
	7, 31 , 56, 72, 124, 2E8	60-90	0

1. táblázat Molekuláris marker klaszterek, pirossal jelölve az ábrákkal illusztrált (3.-9. ábra) markerek

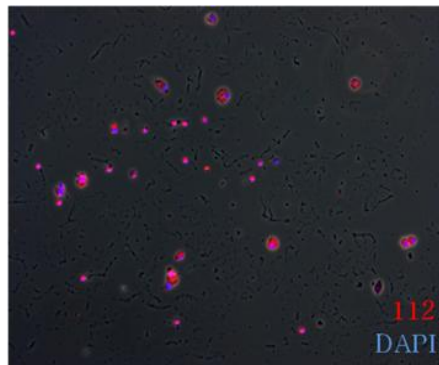
A markerek egy csoportja pánhemocita, azaz mind a lárva, mind a kifejlett egyed összes vérsejtjén jelen van (#112, 3. ábra).

A legtöbb marker jellegzetes heterogenitást mutat: egy részük a lárva valamennyi sejtjén kifejeződik, viszont a kifejlett egyedek vérsejtjein csak kisebb arányban van jelen (#91, 4. ábra). A heterogenitást jelző markerek alpopulációját képezik azok, melyek a vérsejtek alpopulációját jelölik ki azonos mértékben (#109 5. ábra, #5A2 7. ábra) vagy változó arányban lárva és adult vérsejteken (#43, 6. ábra). A markerek egy csoportja kizárólag a lárva vérsejtjein van jelen, a lárva-báb átmenet során eltűnik és az adult vérsejtjein nem nyilvánul meg (#85, 8. ábra és #31, 9. ábra).

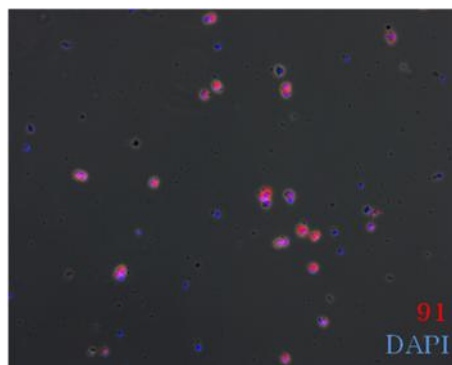
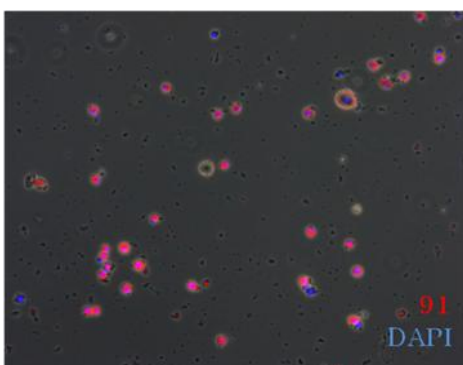
LÁRVA



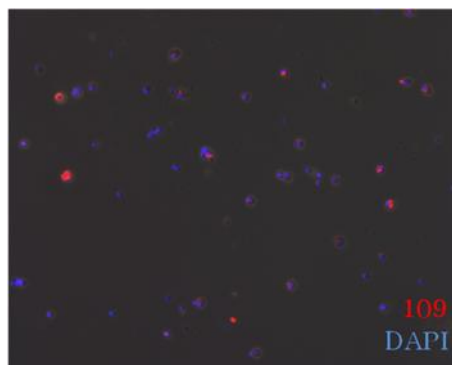
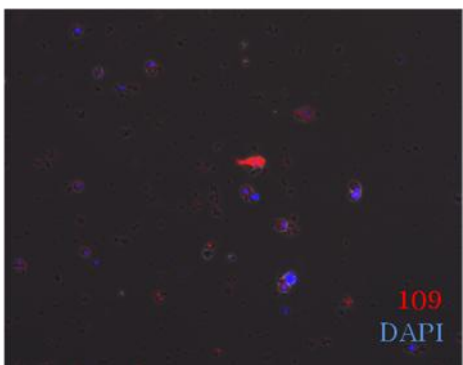
ADULT



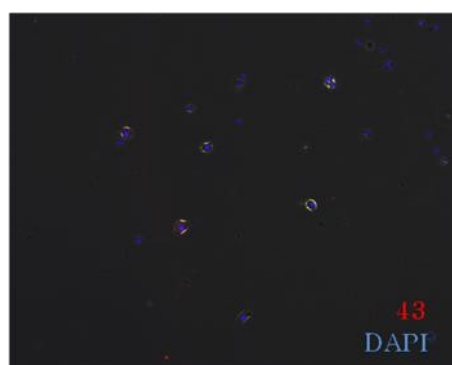
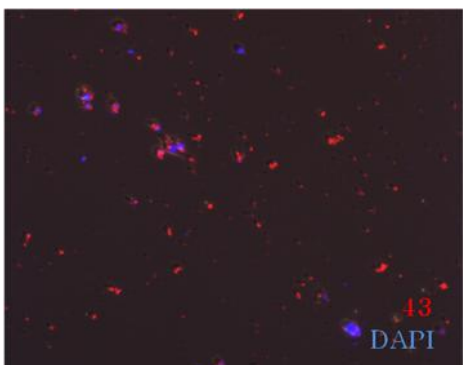
3. ábra Pánhemocita marker



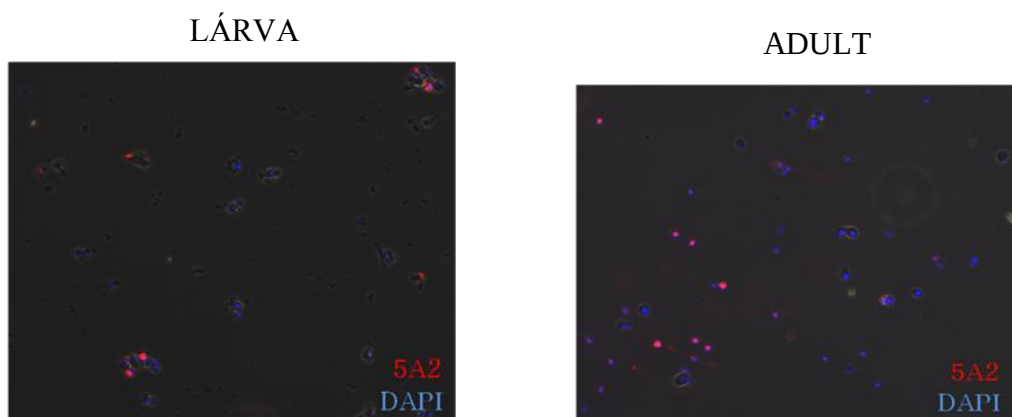
4. ábra Lárva- > 90%-án, adult vérsejtek < 90%-án kifejeződő marker



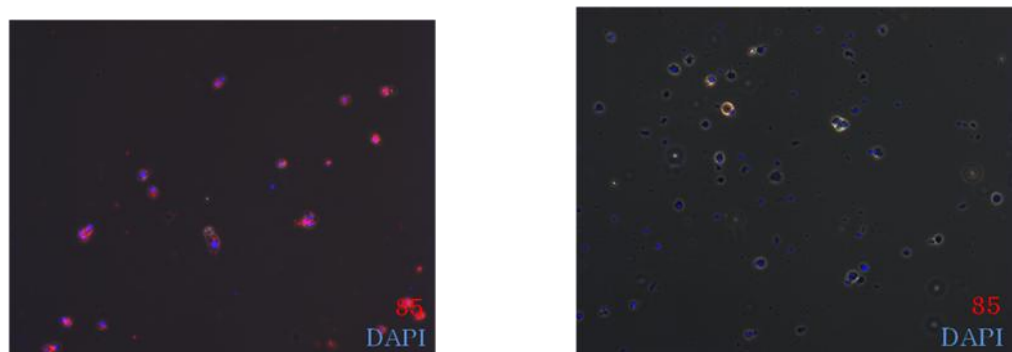
5. ábra Lárva- és adult vérsejtek 60-90%-án kifejeződő marker



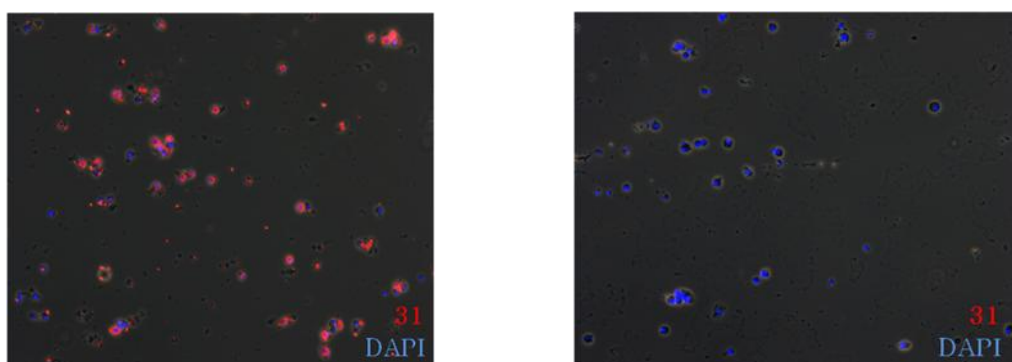
6. ábra Lárva- 60-90%-án, adult vérsejtek < 60%-án kifejeződő marker



7. ábra Lárva- és adult vérsejtek < 60%-án kifejeződő marker



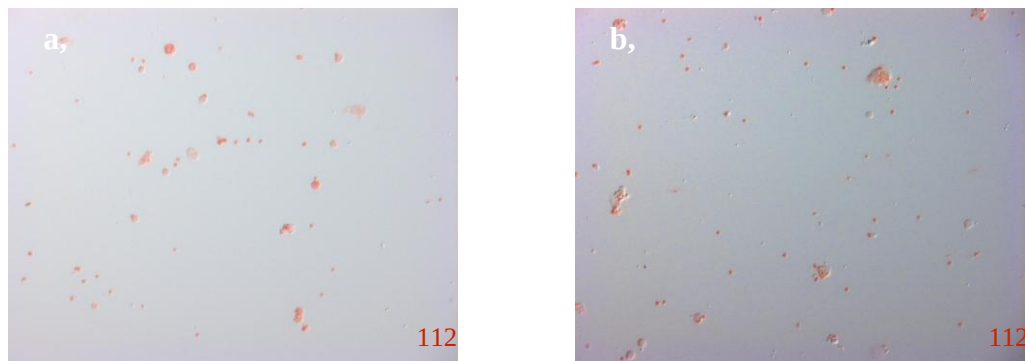
8. ábra Lárvaspecifikus marker



9. ábra Lárvaspecifikus marker

3-9. ábra: Molekuláris klaszterek immunfluoreszcens vizsgálata adult és lárva vérsejtjein Zeiss Axioscope mikroszkópban, 20x-os objektív alatt.

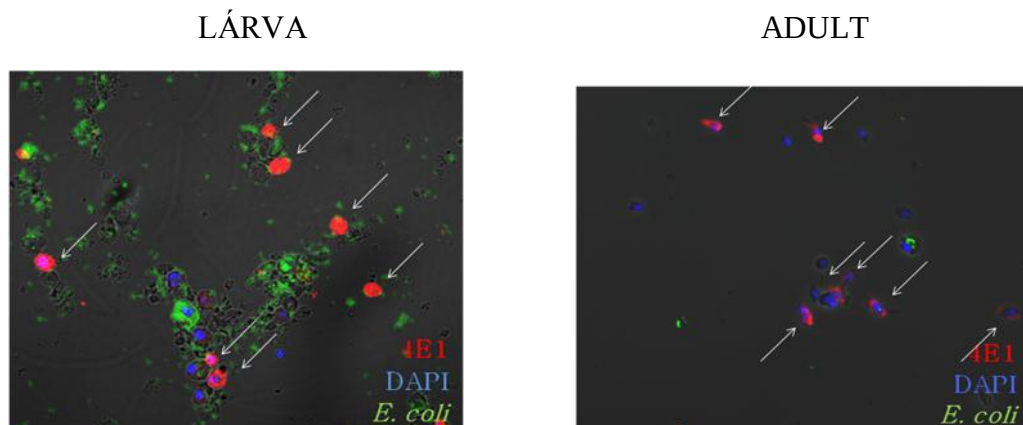
A különböző kasztok vérsejtjeinek azonosítására összehasonlítottuk néhány marker kifejeződését (#31, #76, #85, #90, **#112**) dolgozó és here vérsejteken. A két kaszt vérsejtjeinek ellenanyagokkal jellemzett molekuláris mintázatában (10. ábra) nem láttunk különbséget.



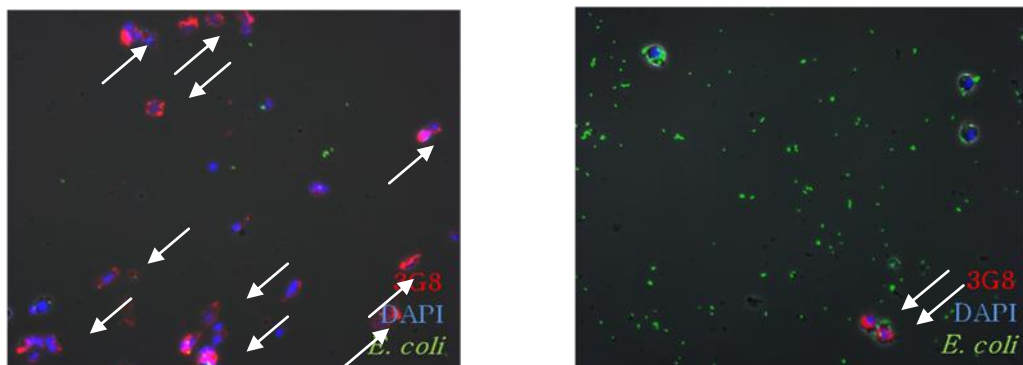
10. ábra Molekuláris marker mintázat összehasonlítása dolgozó (a) és here (b) vérsejteken Zeiss Axioscope mikroszkópban, Nomarski objektívvel, 20x-os objektív alatt. Mindkét kasztban azonos mértékben fejeződik ki a marker, minden sejten jelen van.

III.2 Fagocitózis vizsgálat

„In vivo” kísérletekben vizsgáltuk a FITC jelölt *E.coli* baktériumokat bekebelező sejtek morfológiai jellemzőit valamint a bekebelező képesség és a markereinkkel jellemezhető fenotípus közötti kapcsolatot. Megállapítottuk, hogy a vérsejteknek 38%-a (valamennyi kerek morfológiájú) fagocitál. Megállapítottuk továbbá, hogy egyes markerek (#4E1, #5A2, #6F10 és #6B3) a nem fagocitáló sejteken nyilvánulnak meg (1.diagram, 11.ábra), míg mások, eltérő, de molekuláris klaszterekre jellemző mintázattal alpopulációkra bontják a fagocitáló sejteket (#3G8, 12.ábra).

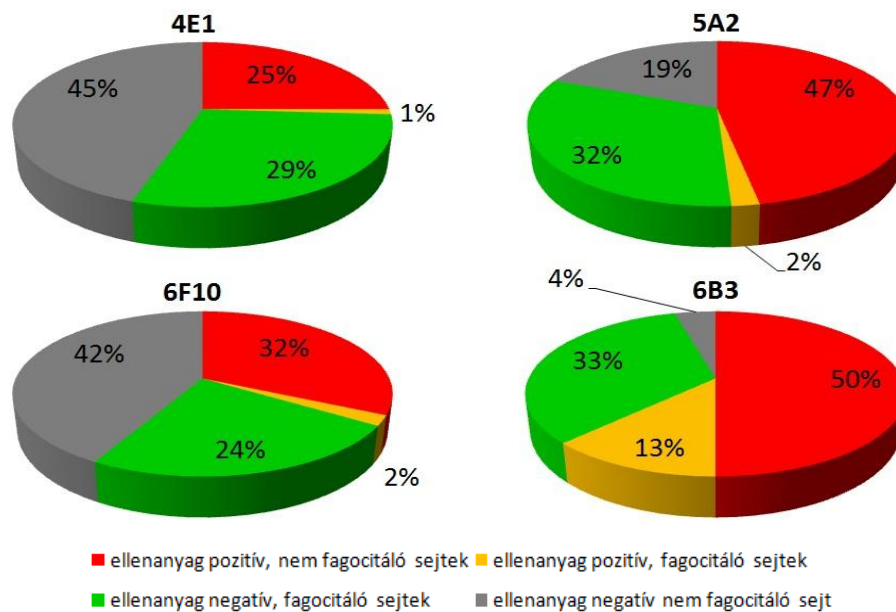


11. ábra Nem fagocitáló sejtek alpopulációját jelölő marker (⇒)



12. ábra Fagocitáló sejteket heterogén módon jelölő marker (⇒)

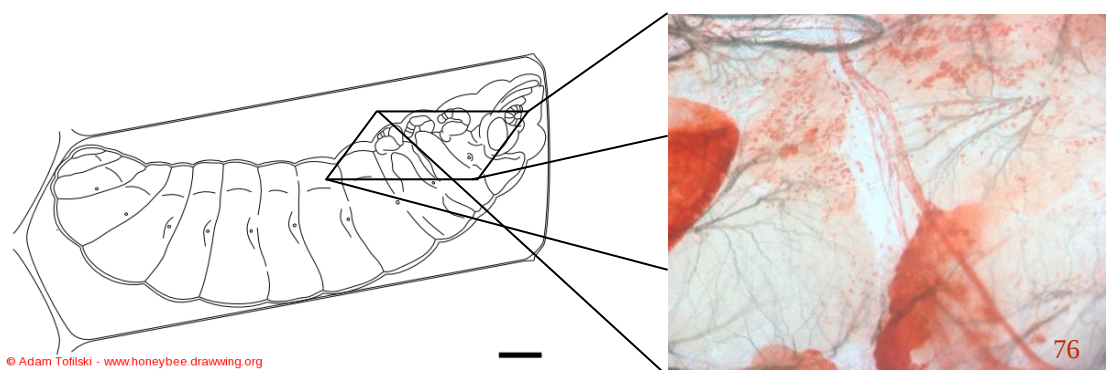
11.-12.ábra: Fagocitózis vizsgálata konfokális mikroszkópban 40x-es nagyítás alatt



1. diagram Nem fagocitáló sejtek apopulációját jelölő markerek

III.3 A lárva szöveteinek vizsgálata

A termeltetett ellenanyagok segítségével megpróbáltunk vérképző szövetet azonosítani. A vizsgálatokhoz a lárvák ventrális oldalát felnyitottuk és egy részüket így fixáltuk, másokat az emésztőcső eltávolítása után fixáltunk. Az ellenanyagokkal (#1, #2, #5, #30, #31, #40, #58, #61, #76, #85, #90, #91, #98, #100, #112, #120, #4F8) végzett immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatok segítségével eddig nem sikerült vérsejtképző szövetet azonosítani (13. ábra), „in vivo” injektált, FITC-*E.coli* baktériumok a muslicáéhoz hasonló szesszilis szövetet nem jelöltek ki.



13. ábra Lárva szövetek immunhisztokémiai festődése Zeiss Axioscope mikroszkópban, Nomarski objektívvel, 5x-ös objektív alatt. A lárva szöveteinek jelentős kifejeződő marker.

Diszkusszió

A rovarok, így a házi méh, kórokozók elleni védekezésében, a fizikai elhatárolás mellett, alapvető szerepet játszik az immunitás. Immunválaszukat, a többi szociális fajhoz hasonlóan alternatív stratégiákkal egészíti ki (Armitage et al., 2010, Schlüns et al. 2009), így kevesebb az immunitásban szerepet játszó fehérjét kódoló génszakasz található genomjában (Consortium, 2006, Evans et al., 2006).

Más *Hymenoptera* fajokhoz hasonlóan (Amaral et al., 2010, Manfredini et al., 2008) a házi méh vérsejtjei, morfológiai jellemzőik alapján, nagyfokú heterogenitást mutatnak (Mohandes et al., 2010); Kísérleteinkben ezenfelül, különbséget fedeztünk fel a fejlődési stádiumok vérsejttípusai között azonban a sejttípusok funkciója, eredete és a sejttípusok egymáshoz való viszonya nem ismert.

A sejt-közvetítette immunválasz vizsgálatára, a *Drosophilá*-ban sikeresnek bizonyult stratégiát (Kurucz et al. 2003, Kurucz et al. 2007) követve, specifikus markereket állítottunk elő. A markereket a vérsejteken adott reakciómintázatuk alapján klaszterekbe soroltuk, melyek alapján azonosítottunk pánhemocita, lárvaspecifikus és heterogén reakciókat adó markereket. A heterogén markerek mind a lárvában, mind a kifejlett egyedben megtalálhatóak azonos vagy különböző arányban. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a vérsejtek immunológiai fenotípusa az egyedfejlődés során jellegzetesen változik.

A markerek segítségével összefüggést kerestünk a vérsejtek morfológiai jellemzői, molekuláris mintázata és a funkció között. Megállapítottuk, hogy a kerek sejtek egy alpopulációja (38%) vesz részt a fagocitózisban, ezen túlmenően sikerült azonosítanunk olyan markereket, melyek a nem fagocitáló sejtek egy alpopulációjával reagálnak.

Vérsejtképző szövetet eddig nem sikerült azonosítani, azonban vérsejt-specifikus markerek segítségével további vizsgálatokat végzünk különböző fejlődési stádiumú lárvákon és adult egyedeken.

További terveink

A továbbiakban folytatjuk a jellegzetes mintázatot mutató markerek klaszterekbe sorolását molekulatömegük alapján, majd izolálásukat MALDI analízis céljából. A molekulák további jellemzése a Házi Méh Genom Project keretében generált szekvenciák alapján lehetővé teszi funkciójuk meghatározását, további jellemzését. Célul tűztük ki továbbá, hogy a jelenlegi, és újonnan generált markerek használatával részletesebben megvizsgáljuk a differenciálódási útvonalakat az egyedfejlődés, a kasztok és az időjárás függvényében.

Mellékletek

	Klón	Lárva (% pozitív sejt)	Adult (% pozitív sejt)
PÁNHEMOCITA	1	99	99
	5	99	99
	35	90	90
	38	95	95
	40	99	99
	41	99	99
	76	99	99
	81	99	99
	98	99	99
	100	91	91
	112	99	99
	120	98	98
	4A4	99	99
	4F8	95	95
	6C11	95	95
	8D10	99	99
HETEROGÉN	2	99	80
	28	91	54
	36	90	68
	61	99	32
	91	99	60
	109	86	64
	3G8	85	71
	43	81	50
	80	65	36
	9F6	80	25
	23	35	33
	63	43	42
	88	63	59
	4E1	26	26
	5A2	54	43
	6B3	62	60
	6F10	32	33
LÁRVASPECIFIKUS	30	96	0
	57	93	0
	58	98	1
	64	99	0
	85	95	0
	7	83	0
	31	78	0
	56	95	0
	72	75	0
	124	83	0
	2E8	85	0

2. táblázat Molekuláris markerek kifejeződése a vérsejteken [%], pirossal jelölve az ábrákkal (3.-9. ábra) illusztrált markerek

Adam Tofilski: www.honeybee.drawwing.org

- Alippi A.M., Lopez A.C., Aguilar O.M. (2002): Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of american foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA; Applied and Environmental Microbiology 63 3655–3660.
- Amaral I.M.R., Neto J.F.M., Pereira G.B., Franco M.B., Beletti M.E., Kerr W.E., Bonetti A.M., Ueria-Vieira C. (2010): Circulating hemocytes from larvae of *Scutellaria* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis; Micron 41 123-129.
- Anderson D.L., Trueman J.W.H. (2000): *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species; Experimental and Applied Acarology 24 165–189.
- Arai R., Tominaga K., Wu M., Okura M., Ito K., Okamura N., Onishi H., Osaki M., Sugimura Y., Yoshiyama M., Takamatsu D. (2012): Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates; PLoS One.; 7 (3): e33708.
- Armitage S.A., Boomsma J. J.: The effects of age and social interactions on innate immunity in a leaf-cutting ant; Journal of Insect Physiology; 56 (7) 780-787.
- Aronstein K. A., Murray K. D. (2010): Chalkbrood disease in honey bees; Journal of Invertebrate Pathology 103 20–29.
- Chen Y. P., Huang Z. Y. (2010): *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia; Apidologie 41 364–374.
- Chen Y.P., Siede R. (2007): Honey bee viruses; Advances in Virus Research 70 33-80.
- Core A., Runckel C., Ivers J., Quock C., Siapno T., DeNault S., Brown B., DeRisi J., Smith C.D., Hafernik J. (2012): A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly *Apocephalus borealis*; PLoS ONE 7(1): e29639. doi:10.1371/journal.pone.0029639.

- Dade, H.A. (1977). Anatomy and dissection of the honey bee; International Bee Research Association, London.
- Daniat B., Evans J. D., Chen Y. P., Gauthier L., Neumann P. (2012): Predictive markers of honey bee colony collapse; PLoS ONE 7(2): e32151. doi:10.1371/journal.pone.0032151.
- Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J. L., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., Hultmark D. (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*; Insect Molecular Biology, 15 (5) 645–656.
- Evans J.D., Pettis J.S. (2005): Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera* evolution, 59 (10) 2270–2274.
- Gliński Z., Jarosz J. (2001): Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*; *Apiacta* 36 (1) 12 – 24.
- Köhler G., Milstein C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity; *Nature* 256, 495 – 497.
- Köhler, G., Milstein, C. (1976): Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion; *Eur. J. Immunol.*; 7 511–519.
- Kurucz É., Márkus R., Zsámboki J., Folkl-Medzihradsky K., Darula Zs., Vilmos P., Udvardy A., Krausz I., Lukacsovich T., Gateff E., Zettervall C. J., Hultmark D., and Andó I. (2007): Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes; *Current Biology*, 17 (7) 649-657.
- Kurucz É., Váczi 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, 95-111.
- Kurucz É., Zettervall C.-J., Sinka R., Vilmos P., Pivarsci A., Ekengren S., Hegedűs 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 (5) 2622–2627.

- Manfredini F., Dallai R., Otaviani E. (2008): Circulating hemocytes from larvae of the paper wasp *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae); *Tissue Cell*; 40 (2) 103-112.
- Mohandes S. S; Nafea E. A., Fawzy A. M. (2010): Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera*: Egypt. Acad. J. biolog. Sci., 3 (1) 213 – 220.
- Moritz R. F. A., Miranda J., Fries I., Conte Y., Neumann P., Paxton R. J.(2010): Research strategies to improve honeybee health in Europe; INRA/DIB-AGIB/EDP Sciences.
- Richard F-J, Aubert A., Grozinger CM (2008): Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers; *BMC Biology*, 6:50 doi:10.1186/1741-7007-6-50.
- Schlüns H., Crozier R.H. (2009): Molecular and chemical immune defenses in ants (Hymenoptera: Formicidae); *Myrmecological News*; 12 237-249.
- Somogyi K., Sipos B., Péntzes Zs., Kurucz É., Zsámboki J., Hultmark D. and Andó I (2008): Evolution of genes and repeats in the Nimrod superfamily; *Mol. Biol. Evol.* 25 (11) 2337–2347.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006): Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*; *Nature*; 443 (7114) 931–949.
- Wilson R.N., Dres T.S., Starks, P.T. (2008): The ontogeny if immunity: development of immature strength in the honey bee (*Apis mellifera*); *Journal of Insect Physiology*; 54 1392-1399.
- Winston M., L.(1991): The biology of the honey bee; Harvard University Press, ISBN: 0-674-07409-2.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Andó Istvánnak a lehetőséget, hogy a csoportjában dolgozzam. Bizalmát, tapasztalatait, hasznos tanácsait, ötleteit és türelmét, melyekkel segítette munkámat.

Köszönöm konzulensemnek, Dr. Török Tibornak, a kutatás nélkülözhetetlen elemeinek, a házi méheknek a biztosítását, és azok tartásáról, szerveződéséről elsajátított ismereteimet.

Köszönöm Dr. Kurucz Évának, hogy bevezetett az alkalmazott biokémiai és molekuláris biológiai módszerek alapjaiba.

Köszönöm Csordás Gábornak önzetlen segítségét és türelmét diákköri munkám során.

Köszönöm a laboránsoknak: Balázs Anitának, Kovalcsik Olgának és Tápai Szilviának, hogy bevezettek a kutatás gyakorlati módszereibe és biztosították a megfelelő feltételeket munkánk végzése során.

Köszönöm a segítségét, hasznos ötleteit munkatársaimnak: Abonyi Csillának, Cinege Gyöngyinek, Kari Beátának, Lerner Zitának, Honti Viktornak, Varga Gergelynek, Zsámboki Jánosnak.

Köszönettel tartozom Erdélyi Miklósnak, az SZBK Genetikai Intézetének igazgatójának a támogatását, hogy az intézetben diákköri munkát végezhettem.

Köszönöm a családomnak, szüleimnek, valamint barátaimnak hogy mindvégig támogattak és mellettem álltak.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez:

Alulírott Gábor Erika, Biológus MSc szakos hallgató kijelentem, hogy dolgozatomban foglaltak a saját munkám eredményei és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) tartalmazzák.

A dolgozatban leírt munkafolyamatok közül:

- a vérsejtek gyűjtését
- a vizsgálati egyedek boncolását
- immunizálást
- az ellenanyagok tesztelését vérsejteken immunfluoreszcenciás vizsgálatokkal
- az ellenanyagok tesztelését vérsejteken immunhisztokémiás vizsgálatokkal
- az ellenanyagok tesztelését szöveteken immunfluoreszcenciás vizsgálatokkal
- az ellenanyagok tesztelését szöveteken immunhisztokémiai vizsgálatokkal
- a fény és fluorszcenciás mikroszkópos analízist
- konfokális mikroszkópos vizsgálatokat
- az eredmények kiértékelését
- a dolgozat megírását

végeztem el.

.....
Gábor Erika

2012. december. 20.