

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet
Veleszületett Immunitás Csoport

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Intézet

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

***A DROSOPHILA WILLISTONI* ROBUSZTUS VELESZÜLETETT IMMUNVÁLASZÁNAK EGYEDI ÉS ÁLTALÁNOS SAJÁTOSSÁGAI**

Szerző:

Fodor Kinga

Biológia BSc. szak, II. évfolyam

Témavezetők:

Prof. Dr. Andó István Ph.D., D.Sc.

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Veleszületett Immunitás Csoport

Dr. Cinege Gyöngyi Ilona Ph.D.

(tudományos főmunkatárs)

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Veleszületett Immunitás Csoport

36. OTDK Biológia Szekció

Szeged, 2022

Tartalomjegyzék

1. Bevezető	3
2. Célkitűzések:	4
3. Anyagok és módszerek.....	4
3.1. <i>Drosophila</i> törzsek fenntartása.....	4
3.2. Parazitoid darázs törzsek fenntartása	5
3.3. Parazitoid darázsfertőzés	5
3.4. Statisztikai elemzés	5
3.5. Hibridóma előállítás és specifikus ellenanyag tesztelés	6
3.6. Hibridóma sejtenyésztés.....	6
3.7. Hibridóma fagyasztás és felolvasztás.....	6
3.8. Véresejt és kutikula preparátumok előállítása, indirekt immunofluoreszcencia.....	7
3.9. Sejtszám meghatározás.....	8
3.10. Baktériumok FITC jelölése	8
3.11. Fagocitózis teszt	9
4. Eredmények és értékelésük	9
4.1. A <i>D. willistoni</i> hatékonyan védekezik a parazitoid darázsakkal szemben	9
4.2. A <i>D. willistoni</i> véresejtjeivel reagáló ellenanyagok különböző véresejt alpopulációkat határoznak meg.....	10
4.3. A központi nyirokszerv reakciója a fertőzést követően	12
4.4. A véresejtek száma és az alpopulációk aránya a parazitoid darázsfertőzést követően megváltozik	13
4.5. A véresejtek reakciója a parazitoid darázsakkal történő fertőzést követően.....	15
5. Összefoglalás.....	17
6. Köszönetnyilvánítás	17
7. Irodalomjegyzék.....	18

1. Bevezető

Az evolúció során a patogénekkel történő folyamatos kölcsönhatások - a patogén változékonysága és annak támadására a gazdaszervezet által adott reakciók - alakítják az élővilágban az immunválasz változatos formáit (1). Az immunválasz legősibb szerkezeti egysége a veleszületett immunitás, melynek sejtes elemei a vérsejtek. A magasabb rendű élőlényekhez hasonlóan a *Drosophila*-nak is vannak vérsejtjei, melyek részt vesznek a kórokozók elleni küzdelemben, a véralvadásban és a sebgyógyulásban, így biztosítva a szervezet egységét. A veleszületett immunitás sejtes elemei széleskörűen vizsgáltak gerinces és gerinctelen szervezetekben. Jól ismert, hogy a *Drosophila* vérsejtjei morfológiai jegyeikben és működésükben, mint például a bekebelezés és a parazitákkal szembeni védekezés, nagyfokú hasonlóságot mutatnak a gerincesek vérsejtjeivel (2). Az egymástól különböző vérsejtek működésükkel kiegészítik egymást és biztosítják a kisméretű részecskékkel (baktériumok) és a nagyobb betolakodókkal (paraziták) szembeni védekezést. A baktériumokat a makrofágok - *Drosophila*-ban a plazmatociták -bekebelezik, míg a paraziták támadását követően a vérsejtek egy speciális formája differenciálódik, mely központi szerepet játszik azok elhatárolásában és elpusztításában (3, 4).

A paraziták elpusztításának részletesen tanulmányozott és jól ismert módja a *Drosophila melanogaster* parazitoid darazsakkal szembeni védekezése. A *D. melanogaster* vérében, a hemolimfában, plazmatociták és kristálysejtek keringenek. A parazitoid darazsakkal szembeni védekezésben a fagocitáló plazmatociták nagyméretű, lapos sejtekké, lamellocitákká differenciálódnak, melyek a plazmatocitákkal és kristálysejtekkel együttesen tokot képeznek, és elzárják a parazitát a környező szövetektől. Ugyanekkor, egy enzim-láncreakció eredményeként melanin képződik, melynek szintézise során toxikus vegyületek, szabad gyökök szabadulnak fel, és részt vesznek a parazita elpusztításában (5).

Laboratóriumunkban olyan *Drosophila* fajokat azonosítottak, melyekben a parazitoidokkal szembeni védekezés hatékonysága magasabb, mint a *D. melanogaster*-ben (6), azonban a védekezés mechanizmusa ismeretlen. Az eddig vizsgált fajokban közös, hogy a fertőzést követően nem lamellociták, hanem sokmagvú óriássejtek jönnek létre, melyeknek vizsgálata, a védekezési folyamatokban és a hatékony immunválaszban való részvételének módja képezi a kutatások alapját.

A *Drosophilidae*-k és egyéb rovarfajok vérsejtjeinek, azonosítására és jellemzésére alkalmas és széleskörűen alkalmazott, immunológiai és genetikai rendszereket fejlesztettek (7, 8), melyeknek alapján meghatározták a sokmagvú óriássejtek alapvető immunológiai és

molekuláris biológiai sajátosságait. Előzetes kísérletek alapján megállapították, hogy a *Drosophila willistoni*-ban is sokmagvú órássejtek differenciálódnak a parazitoid fertőzést követően, ezért vizsgálataink célja a fertőzést követő immunológiai változások megismerése. A *D. willistoni*-ban, a *D. melanogaster*-rel ellentétben, naiv állapotban is többféle, morfológiai jegyek alapján meghatározott vérsejttípust azonosítottak (9), azonban a sejtek funkcióira vonatkozó direkt adatok, a fertőzést követő sejtes immunválasz során a vérképben történő változások és a válasz hatékonysága sem ismertek. Továbbá, mivel az eredeti nevezéktan alkalmazása zavaró és nem illeszkedik az újabb eredményekhez, ennek alkalmazásától eltekintünk. Az új nevezéktan kidolgozása és elfogadtatása folyamatban van.

2. Célkitűzések:

Kísérleteim célja a *D. willistoni* sejt-közvetítette immunválaszáinak a megismerése.

2.1. A parazitoidokkal szembeni védekezés hatékonyságának a meghatározása.

2.2. Vérsejttípusok azonosítására alkalmas immunológiai panel létrehozása.

2.3. A vérsejttípusok azonosítása.

2.4. A különböző vérsejttípusok azonosítása a sejt közvetítette immunválasz során

- a vérkép (kvantitatív és kvalitatív) jellemzése naiv és parazitoidokkal fertőzött egyedekben
- baktériumok bekebelezésében résztvevő sejtek azonosítása
- különböző parazitoidokra adott sejtes immunválasz jellemzése a kifejlesztett markerek alkalmazásával

2.5. A markerek expressziójának jellemzése a központi nyirokszervben.

2.6. Távolabbi céljaim között szerepel az ellenanyagok által felismert molekuláris markerek azonosítása majd ezt követően informatikai és genetikai vizsgálatok végzése, az adott molekuláknak az immunológiai folyamatokban és a védekezésben betöltött szerepének a vizsgálata.

3. Anyagok és módszerek

3.1. *Drosophila* törzsek fenntartása

A *Drosophilidae* családba tartozó vad típusú *D. willistoni* (14030-0811.24) törzset a UC San Diego *Drosophila* törzsközpontból rendeltük. Kísérleteinkhez kontrollként vad típusú *D. melanogaster* (Oregon-R) törzset használtunk, mely a Bloomington *Drosophila*

törzsközpontból származik. Mindkét törzset 25°C-on standard ecetmuslica táptalajon tenyésztettük.

3.2. Parazitoid darázs törzsek fenntartása

A munka során alkalmazott *Leptopilina bouleari* G486, *Leptopilina heterotoma* 14 és *Leptopilina victoriar* UNK parazitoid darázstörzseket Prof. Todd Schlenke (University of Arizona) bocsátotta a kutatócsoportunk rendelkezésére. A parazitoid darázsok fenntartása vad típusú *D. melanogaster*-en történt. A parazitoidok fenntartására előállított táptalaj 10% glükóz és 1.5% agart tartalmaz, melyet a táptalajra szűrőpapíron elhelyezett vegyes virágmézzel egészítettünk ki.

3.3. Parazitoid darázsfertőzés

A *Drosophila* lárvákat nőstény parazitoid darázsokkal fertőztünk (10). Standard ecetmuslica táptalajon 70, korai második stádiumos *Drosophila* lárvát, 25°C-on éjszakán át szűrattunk 15 parazitoid darázs nősténnyel. Ezt követően a parazitoidokat eltávolítottuk, majd a fertőzött lárvákat tovább inkubáltuk 25°C-on. A darázsfertőzés hatékonyságát a szűratást követő 72. órában ellenőriztük. A táptalajból ecsettel óvatosan kimosott *Drosophila* lárvákat *Drosophila* Ringer oldatba helyeztük, majd mikroszkóp alatt vizsgáltuk. Az immunindukált állatokat a darázsszűrés helyén keletkezett kutikula-melanizáció alapján különítettük el, majd használtuk az egyes kísérletekhez. A különböző vizsgálatokhoz kontrollként hasonló módon mosott és áthelyezett naiv állatokat alkalmaztunk. A darázsfertőzést követő kelési tesztek esetében a fiolában található 70 szűratott lárvából a beavatkozást követő 72. órában random módon kiválasztott 10 *Drosophila* lárvában megvizsgáltuk a melanizált szűrésnyom jelenlétét. Amennyiben mindegyik lárva kutikuláján jelen volt a szűrés melanizált helye, az adott fiolát 100%-ban szűrtnak minősítettük és a fiolában maradt 60 lárvát alkalmasnak tartottuk a kelési vizsgálatokhoz, ezért az adult rovarok bábokból való kikeléséig tovább inkubáltuk 25°C-on. A bábozódást követő negyedik napon egyes bábokból legyek, másokból a 12-20. napon parazitoid darázsok keltek ki. Eredményeinkhez minden esetben legalább három egymástól független kísérletet végeztünk, mintánként 60 lárvával. A kelési arányokat az adott kísérletben használt egyedek százalékában fejeztük ki.

3.4. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéshez T-próbát alkalmaztunk. Amennyiben $P < 0.05$, a különbséget szignifikánsnak tekintettük.

3.5. Hibridóma előállítás és specifikus ellenanyag tesztelés

BALB/c nőstény egereket három alkalommal immunizáltunk *L. bouhardi* parazitoid darázsszal immunindukált *D. willistoni* lárvákból izolált vérsejtekkel. Ezt követően az immunizált egerek lépét izoláltuk, 5% magzati borjúsérumot (FBS) tartalmazó RPMI-1640 szövettenyésztő tápfolyadékban szétbontottuk és lépsejt szuszpenziót készítettünk, majd a lépsejteket Sp2/0 myeloma sejtekkel fuzionáltattuk (11.). A hibridsejteket HAT médiumban (hypoxanthine-aminopterin-thymidin) szelektáltuk, melyben kizárólag a hibridsejtek képesek szaporodni. A sejtfüzió eredményeként létrejött hibridóma sejtek egy része megőrzi a myeloma sejtek osztódó képességét, termeli a HAT médiumban szaporodást lehetővé tévő HGPRT enzimet, valamint a lépsejt (plazmasejt) ellenanyag termelő képességét is hordozza. Mivel a hibridóma sejtek különböző ellenanyagtermelő sejtekből származnak, különböző fehérjék más-más epitópjai ellen termelnek ellenanyagot. Az így keletkező 960 hibridóma klónból a vérsejt specifikus ellenanyagokat termelőket indirekt immunofluoreszcenciás vizsgálatokkal választottuk ki a további kísérletekhez.

3.6. Hibridóma sejtenyésztés

A hibridóma sejteket szuszpenziós tenyészetben 37 °C-on, 5%-os CO₂ koncentrációval rendelkező termosztátban neveltük. Az adott hőmérséklet és megfelelő CO₂ koncentráció fontos volt, mivel az emlős sejtek működéséhez és szaporodásához az élő szervezethez hasonló körülményeket biztosít. A megfelelő ellenanyagokat termelő HAT médiumban növekvő klónokat komplett RPMI médiumra szükséges átszoktatni. Komplett RPMI (KRPMI) esetében az RPMI (Gibco) alapú táptalaj, 0.137 mM Streptomycint, 0.175 mM Penicillint, 4 mM glutamint és 5% magzati borjúsérumot (FBS) tartalmazott. A HAT médiumról a KRPMI médiumra való átszoktatáshoz HT médium szükséges. A HT, olyan KRPMI médium, mely nátrium-hipoxantint és timidint is tartalmazott. Át szoktatáskor a hibridóma sejteken lévő HAT medium felét HT médiumra cseréltük. Ezt a folyamatot 3 napon át végeztük, majd a negyedik napon a sejteken lévő táptalajt teljesen eltávolítottuk és helyére azonos mennyiségű 37 °C-os KRPMI-t pipettáztunk. Ezt követően a klónokat KRPMI médiumon növesztettük. Az ellenanyagok nagyobb mennyiségű előállítása érdekében a hibridóma kultúrákat nem hígítottuk a sejtek optimális szaporodási igényeihez igazítva, hanem túlnövesztettük. A termelődött ellenanyagok nagy mennyiségben szekretálódtak a hibridóma sejtek felülúszójába.

3.7. Hibridóma fagyasztás és felolvasztás

Az adott klónok biztos fennmaradása érdekében klónonként bizonyos mennyiségű sejtsuszpenziót lefagyasztottunk. A fagyasztani kívánt hibridóma sejtsuszpenziót steril

körülmények között 1400xg-vel 8 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a leült sejteket jéghideg 10% dimetil-szulfoxidot (DMSO) és 10% FBS-t tartalmazó HAT vagy KRPMI (amiben az adott klón növekedett) táptalajban szuszpendáltuk, majd fagyasztó csövekbe pipettáztuk. A fagyasztó csöveket gyors mozdulattal áthelyeztük már előkészített polisztirol dobozokba, majd -80 °C-on tároltuk. Huszonnégyszer óra múlva a fagyasztott mintákat áthelyeztük a folyékony nitrogéntárolóba, ahol körülbelül -196 °C-on évtizedekig biztonságosan tárolhatók. Szükség esetén az adott fagyasztó csövekben található minták felolvaszthatók. A sejtek jó életképességének megtartása érdekében a felolvasztási folyamatnak rövid ideig kell tartania. A felolvasztani kívánt sejtek táptalajának függvényében 10 ml HAT vagy KRPMI tápfolyadékot pipetázunk egy steril centrifugacsőbe. A nitrogéntárolóból kiemelt fagyasztó csövet 37 °C-os vízfürdőben gyorsan felolvasztjuk. Ezt követően a fagyasztó cső tartalmát steril körülmények között átpipetázzuk egy előkészített HAT vagy KRPMI táptalajt tartalmazó centrifuga csőbe és 1400xg-vel szobahőmérsékleten 5 percig centrifugáljuk. A felülúszót Pasteur pipettával eltávolítjuk, majd a sejtekhez 1 ml HAT vagy KRPMI médiumot adunk. A sejteket óvatosan szuszpendáljuk, majd 24 lyukú szövettenyésztő lemezre helyezük és 37 °C-on, 5% CO₂ koncentráció alatt termosztátban növesztjük.

3.8. Vérsejt és kutikula preparátumok előállítása, indirekt immunofluoreszcencia

A *Drosophila* lárvákat óvatosan háromszor mostuk *Drosophila* Ringer oldattal, majd leitattuk és 12 lyukú Hendley- Essex (PTFE&specialised coatings) tárgylemezen, 30 µl 5 % FBS-t és a melanizációs folyamatokat meggátoló fenil-tioureát (PTU) tartalmazó Schneider médiumban bontottuk (12). A testüregből távozó vérsejteket egy órán át szobahőmérsékleten tapasztottuk. A tárgylemezhez történő tapasztást követően 6 percig acetonnal fixáltuk, majd megszáritottuk. A kutikula preparátumokat a központi nyirokszervek vizsgálatához készítettük. A lárvákat 5 % FBS tartalmú Schneider médiumban boncoltuk úgy, hogy a dorzális oldalon húzódó központi nyirokszerv érintetlenül felszínre kerüljön, majd a mintákat 10 percen keresztül 2 % paraformaldehiddel fixáltuk. Ezt háromszor öt percig tartó PBS-sel mosás követte, majd 0.01 % Triton-X 100 és 0.1 % BSA-t tartalmazó PBS oldatban 20 percen át telítettük. A fixált vérsejt mintákat 0.1 % BSA-t tartalmazó PBS oldatban telítettük. A vérsejt és kutikula preparátumokat indirekt immunofluoreszcenciás vizsgálatoknak vetettük alá.

Hígítatlan hibridóma felülúszókat alkalmaztunk elsődleges ellenanyagokként, melyekkel szobahőmérsékleten két órán keresztül inkubáltuk a mintákat. Majd háromszor öt percig tartó PBS-es mosást követően másodlagos ellenanyagként kecskében előállított anti-egér IgG (H+L)

Alexa Fluor 488-at (Invitrogen) alkalmaztunk 1:1000 hígításában. Az ellenanyagot a megfelelő telítő oldatban hígítottuk. A sejtmagok azonosítása céljából, a másodlagos ellenanyagokban DAPI-t (4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid, SIGMA) alkalmaztunk 2.5 µg/ml koncentrációban. Az így előkészített másodlagos ellenanyag-DAPI oldatot a mintákra helyeztük, majd sötétben szobahőmérsékleten 45 percig inkubáltuk, ezután háromszor 5 percig PBS-ben mostuk a mintákat. Ezt követően a kutikula preparátumokat is óvatosan tárgylemezre helyeztük és Fluoromount G médiumba ágyaztuk, mikroszkópos fedőlemezrel lefedtük, majd Zeiss AxioScope 2 MOT epifluoreszcens vagy Olympus FV1000 konfokális LSM mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

3.9. Sejtszám meghatározás

A vérsejtek számának meghatározása fluoreszcens mintákról készített képeken alapszik. Az adott lárvák kifolyatott vérsejt mintáiból hússzoros nagyítással random pozíciókban készítettünk 3-3 felvételt. A sejtmagvak (DAPI, kék) illetve az adott ellenanyaggal reagáló vérsejtek (Alexa 488 konjugált, zöld) fluoreszcenciája alapján a sejtszám meghatározást az ImageJ program (<http://imagej.nih.gov/ij/>) segítségével végeztük.

3.10. Baktériumok FITC jelölése

A fagocitózis kísérletekhez alkalmazott *Escherichia coli* (SzMC 0582) baktériumokat a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Karának Mikrobiológiai Tanszéke bocsájtotta rendelkezésünkre. A baktériumok Fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) történő jelöléshez a baktérium kultúrákat éjszakán át 20 ml LB médiumba rázatva 37 °C-on növesztettük, majd 1400xg-vel szobahőmérsékleten 15 percen át centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk és a baktérium üledéket 10 ml PSB oldatba szuszpendáltuk majd ismét centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszót ismét eltávolítottuk és a baktérium üledéket 1.5 ml PBS oldatban szuszpendáltuk és 1 órán keresztül főztük. A hővel elpusztított baktériumokat 15 percig 1400xg -vel szobahőmérsékleten centrifugáltuk és a baktérium üledéket 10 ml kötő-oldatban (1M Na₂CO₃; 1M NaHCO₃; 0.14M NaCl) vortex segítségével szuszpendáltuk. Mintánként 100 µl 5 mg/ml FITC oldatot állítottunk elő DMSO-ban, melyet cseppenként, keverés közben hozzáadtunk a baktérium szuszpenzióhoz. A baktériumok FITC tartalmú szuszpenzióját éjszakán át 4 °C-on kevertettük. Szobahőmérsékleten 15 percen át 1400xg-vel centrifugáltuk, majd a baktérium üledéket 7 alkalommal PBS oldattal mostuk. Végül a FITC jelölt baktériumokat 0.1 % Na-azidot-ot tartalmazó 1.5 ml PBS-ben szuszpendáltuk, majd 4 °C-on, sötétben tároltuk.

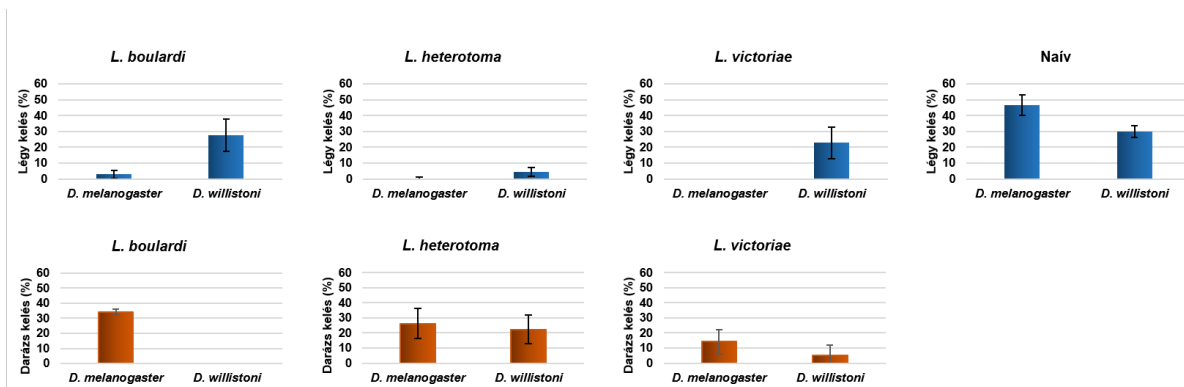
3.11. Fagocitózis teszt

A *D. willistoni* második stádiumos lárvákat *L. bouleari* nőstény parazitoid darazsakkal éjszakán át fertőztünk, majd 72 óra elteltével a kutikulán látható melanizált szúrásnyomot hordozó egyedeket kiválogattuk. A válogatott lárvákat háromszor mostuk *Drosophila* Ringer oldattal. A 4 °C-on 0.1 % Na-azidos PBS oldatban tárolt FITC jelölt baktériumokat háromszor mostuk PBS oldattal, úgy hogy 1400xg -vel szobahőmérsékleten centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk és újabb Na-azid mentes PBS oldatra cseréltük majd szuszpendáltuk és ismét centrifugáltuk. A mosott *Escherichia coli*-FITC baktérium üledéket 10 %-os töménységűre állítottuk be PBS oldat segítségével. Négy mosott, naiv vagy parazitoid darázzsal indukált *D. willistoni* lárvát tárgylemezen, 100 µl 5 % FBS-t és a melanizációs folyamatokat meggátoló néhány kristály fenil-tioureát (PTU) tartalmazó Schneider médiumban bontottuk, majd a kifolyatott vérsejteket 30 percen át tapasztottuk. Ezt követően a vérsejtekhez 5 µl 10%-os mosott FITC jelölt baktériumot adtunk, majd szuszpendáltuk és a fagocitózis folyamatának vizsgálata céljából 45 percig szobahőmérsékleten tovább inkubáltuk. Ezt követően óvatosan eltávolítottunk 75 µl médiumot, majd a maradék 30 µl táptalajhoz 30 µl, Schneider médiumban készített 0.4%-os tripánkék oldatot adtunk és óvatosan szuszpendáltuk. A mintákra fedőlemezt helyeztünk, majd a különböző morfológiával rendelkező vérsejtek fagocitáló képességét Zeiss Axioscope 2 MOT epifluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltuk. A tripánkék kioltja a vérsejtek által be nem kebeleztet baktériumok fluoreszcenciáját, azonban az ép sejtmembránnal rendelkező, élő vérsejtek belsejébe nem hatol be így a kiértékelés során a mintákban csupán a bekebeleztet baktériumok fluoreszkálnak.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. A *D. willistoni* hatékonyan védekezik a parazitoid darazsakkal szemben

A *D. willistoni* parazitoid darazsak elleni védekezési hatékonyságát vizsgáltuk. Három parazitoid darázstörzset használtunk: *L. bouleari* G486, *L. heterotoma* 14 és *L. victoriae* UNK. Kontrollként a jól ismert *D. melanogaster*-t alkalmaztuk. Ugyanakkor viszonyítási alapként, parazitoid darázzsal nem indukált, azonban ugyanolyan körülmények között növesztett állatok esetében is megvizsgáltuk az adultok kelési arányát. Eredményeink alapján kiderült, hogy mindhárom parazitoid darázsfaj esetében a *D. willistoni* hatékonyabban védekezik a parazitoidokkal szemben mint a *D. melanogaster* (1. Ábra).

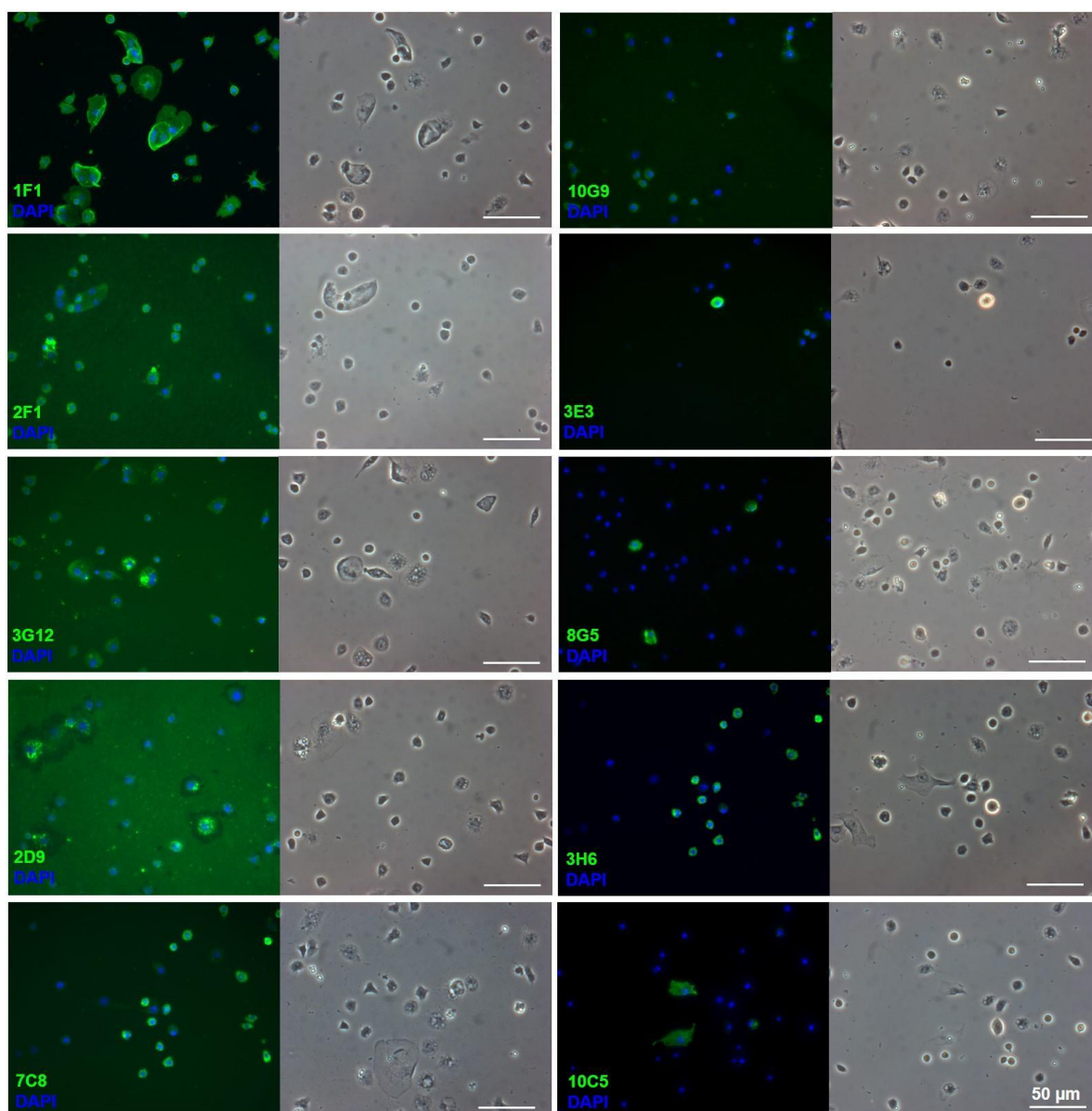


1. Ábra. Kelési arányok parazitoid darázsfertőzést követően. *D. willistoni* hatékonyan védekezik a parazitoidokkal szemben. A hibasávok három egymástól független kísérlet standard deviációja alapján készültek.

Megfigyeltük, hogy mindhárom parazitoiddal történő fertőzést követően *D. willistoni*-ból több légy (késsel jelölve) és kevesebb darázs (vörössel jelölve) kel ki, mint *D. melanogaster*-ból. Az észlelt hatékony védekezés következtében, kíváncsiak voltunk a *D. willistoni* vérésejtek szerkezeti és működési sajátosságaira. Ehhez a vérésejtek azonosítására alkalmas markerekre volt szükség. A vérésejtek különböző formái meghatározásának leghatékonyabb módja a sejttypusokat felismerő monoklonális ellenanyagok alkalmazása.

4.2. A *D. willistoni* vérésejtjeivel reagáló ellenanyagok különböző vérésejt alpopulációkat határoznak meg

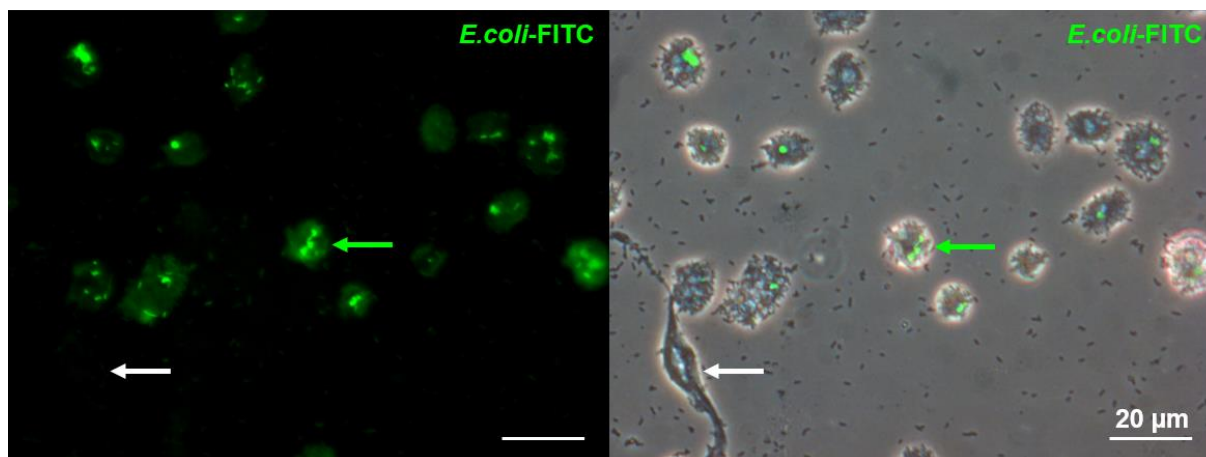
Monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómákat hoztunk létre, melyeknek felülúszóit a vérésejteken adott reakcióik alapján csoportokra (klaszterekre) osztottuk. *L. boulandi*-val fertőzött lárvák tárgylemezre kitapasztott vérésejtjein 960 hibridóma sejt felülúszóját teszteltük indirekt immunofluoreszcenciával melyek közül 824 reagált minden vérésejttel (pán-hemocita), 54 jelzett heterogenitást és 82 nem reagált. Az ellenanyagok egy része nemcsak vérésejtekkel, hanem a hemolimfa egyes fehérjeivel is reagált. A hasonló reakciót mutató ellenanyagokat egy klaszterbe soroltuk. Az egy klaszterbe tartozó ellenanyagok közül a legerőteljesebb reakciót adókat mutatom be (2. Ábra).



2. Ábra. A jellegzetes festődést mutató ellenanyagok reakciói.

1. Klaszter: minden hemocitával reagáló ellenanyag (1F1) a vérsejtek áttekintésére és a fénymikroszkópos morfológiai jegyekkel történő összehasonlításra alkalmas.
2. Klaszter: hemolimfával finom szemcsés reakciót adó és minden vérsejttel reagáló ellenanyagok (2F1, 3G12).
3. Klaszter: hemolimfával és egyes sejtekben vezikulákkal reagáló ellenanyagok (2D9).
4. Klaszter: hemolimfával és kis sejtekkel erősebben reagáló ellenanyagok, melyek a nagy sejtekkel gyengén reagálnak, vagy heterogenitást mutatnak (7C8, 10G9).
5. Klaszter: kristálysejtekkel reagáló ellenanyagok (3E3).
6. Klaszter: kerek morfológiájú sejtek alpopulációjával reagáló ellenanyagok (8G5).

7. Klaszter: kis sejtekkel reagáló ellenanyagok (3H6).
8. Klaszter: nagy sejtekkel reagáló ellenanyagok (10C5). Ezeknek a nagy sejteknek egy része két, vagy több sejtmaggal rendelkezik és nem jellemző rájuk a fagocitózis képessége (**3. Ábra**, fehér nyíl).



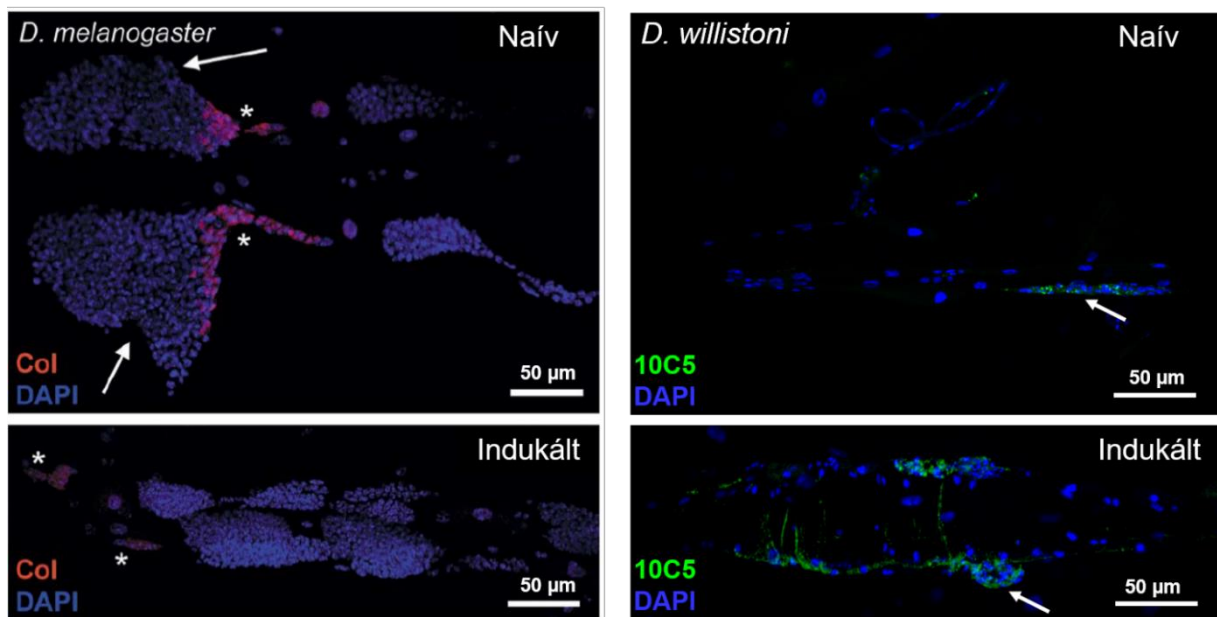
3. Ábra. A nagy sejtekre nem jellemző a fagocitózis képessége. A kerek morfológiájú sejtek baktériumokat fagocitálnak (zöld nyíl). A nagy, megnyúlt sejtek nem kebeleznek be *E. coli*-t (fehér nyíl).

A vérsejt alpopulációkat határozottan jelző ellenanyagok birtokában a további vizsgálatokat négy ellenanyaggal (7C8, 3E3, 8G5, 10C5) végeztük. Ezzel az ellenanyag kombinációval a parazitoid darazsakkal történt fertőzést követően a vérkép alakulása és a fő vérsejt populációk nyomon követhetők.

4.3. A központi nyirokszerv reakciója a fertőzést követően

A parazitoid darazsakkal történt fertőzést követően *D. melanogaster*-ben a központi nyirokszerv (6) megduzzad, a tokképző sejtekre jellemző differenciálódási antigének jelennek meg a sejtek felszínén, majd a szerv szétesik és a parazita körüli tok kialakításában résztvevő sejtek, lamellociták jutnak a keringésbe (13). Megvizsgáltuk, hogy a hasonló folyamat *D. willistoni*-ban is lezajlik-e, azaz speciális, feltehetően tokképzésben, vagy a parazitával szembeni védekezésben szerepet játszó sejtek jelen vannak-e a központi nyirokszervben. Mint a **4. Ábra** mutatja, a nagy sejtekkel reagáló ellenanyag a naiv egyedek központi nyirokszervének néhány sejtjével reagált. A fertőzést követően a szerv megduzzadt, sejtjes állománya gyarapodott, és a sejtek nagy részén megjelent a nagy sejtekre jellemző 10C5 antigén. A szerv felbomlását azonban nem észleltük. Ez arra utal, hogy - bár a központi nyirokszerv sejtjei reagálnak a fertőzésre, kifejezik a nagy sejtekre jellemző antigént - belőle

számottevő mennyiségű sejt nem jut a keringésbe. A **4. Ábrán** az is megfigyelhető, hogy a *D. willistoni* központi nyirokszerve jóval kisebb, és kevesebb sejtet tartalmaz, mint a *D. melanogaster* analóg szerve. A központi nyirokszerv *D. willistoni*-ban reagál a parazitával történt fertőzésre, azonban fő funkciója valószínűleg nem a védekezés, hanem a fejlődés későbbi szakaszaiban, a lárva-báb-imágó átalakulás során az elhalt szövetek emésztése és szabályozott fehérje-lebontás révén alapanyagok biztosítása az újonnan képződő szövetek számára.

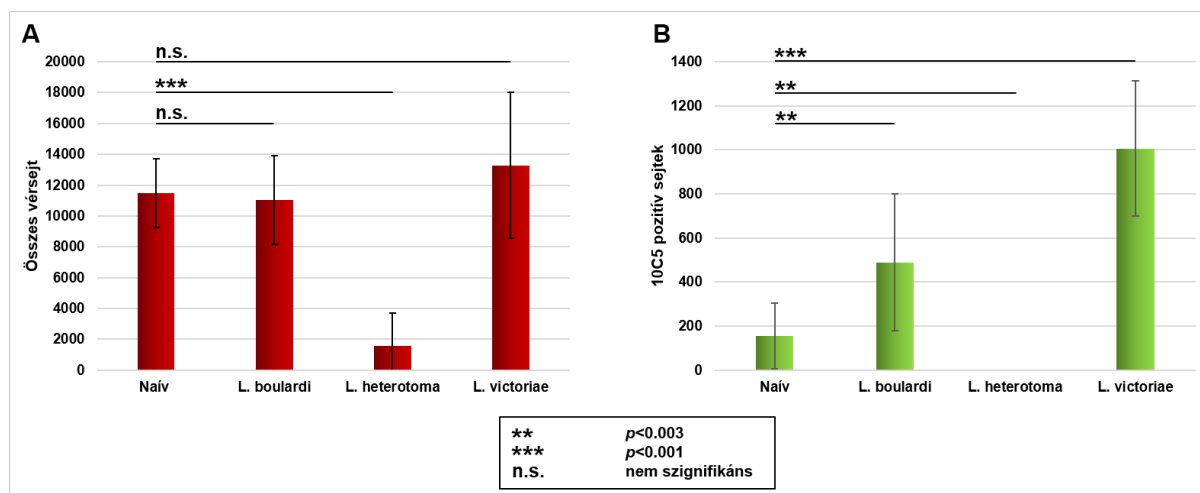


4. Ábra. A *D. willistoni* központi nyirokszerv különbözik a *D. melanogaster* analóg szervétől. A *L. bouhardi* darázsfertőzést követően megduzzad, azonban nem bomlik fel. Col: Collier, a *D. melanogaster* központi nyirokszervének első lebenyét - mely a fertőzést követően felbomlik - jelző marker.

4.4. A vérsejtek száma és az alpopulációk aránya a parazitoid darázsfertőzést követően megváltozik

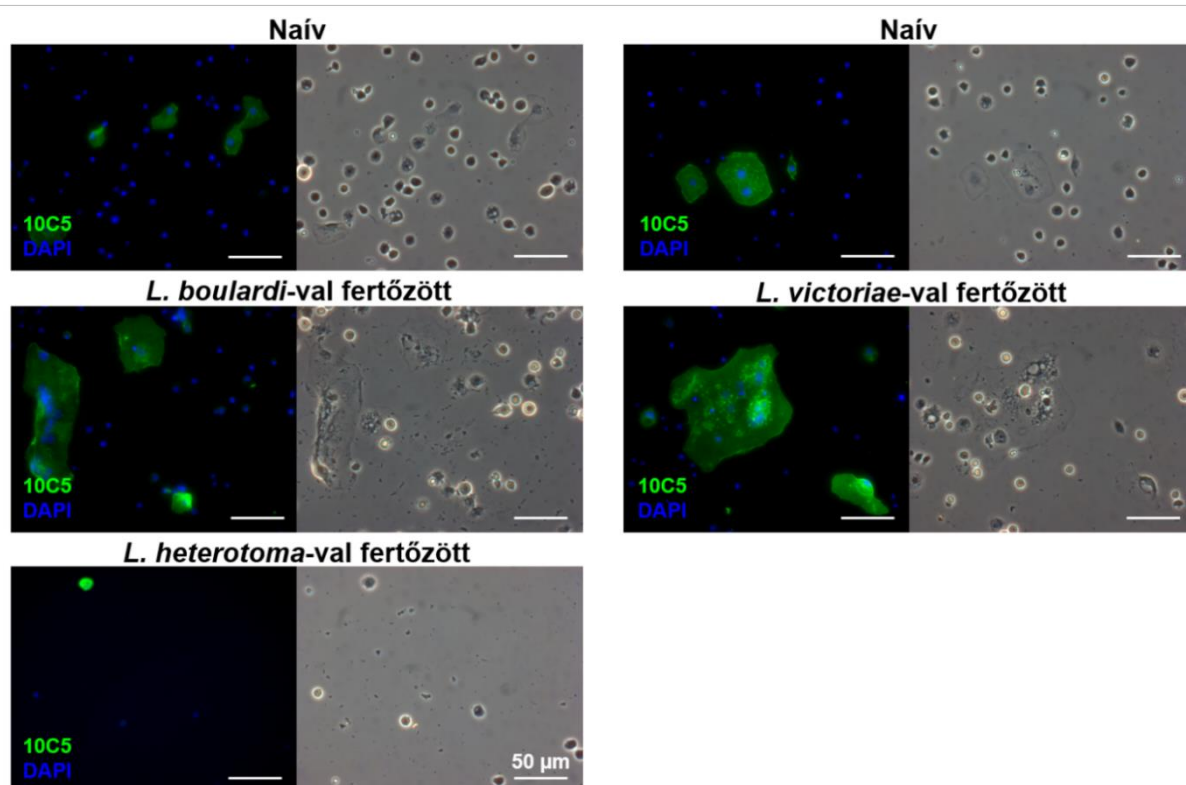
A természetben a szervezetek sokféle parazitával találkoznak, melyekkel történő kölcsönhatás alapvetően meghatározza az immunrendszer evolúcióját, valamint az immunválasz formáit és azok specifitását. Ezért a különböző parazitákkal történő fertőzésekre különböző védekező reakciók alakultak ki. Ennek ismeretében háromféle parazitoid darázssal fertőztük a *D. willistoni* lárvákat és jellemeztük a vérképben észlelhető változásokat. A három darázfaj közül kettő (*L. heterotoma* és *L. victoriae*) kozmopolita, azaz minden földrajzi régióban elterjedt, egy pedig endémiás, csak meghatározott régióban terjedt el (*L. bouhardi*). Az **5. Ábra A** részében

látható, hogy *L. boulandi* fertőzést követően a vérsejtszám nem változik, míg a *L. victoriae* fertőzés eredménye a vérsejtszám enyhe emelkedése. *L. heterotoma*-val történő fertőzés a vérsejtszám drámai csökkenését eredményezi és a megmaradt sejtek is a pusztulás jeleit mutatják.



5. Ábra. A *D. willistoni* vérsejtek száma és összetétele megváltozik parasitoid darázsfertőzést követően. **A.** A teljes vérsejtszám erősen lecsökkent *L. heterotoma*-val való fertőzés után, *L. victoriae* esetében pedig enyhén megemelkedik. **B.** A 10C5 pozitív sejtek száma szignifikánsan megnövekszik *L. boulandi* és *L. victoriae* fertőzést követően, számuk pedig lecsökken *L. heterotoma* fertőzés után. A hibasávok 12-24 lárvából számolt adatok standard deviációja alapján készültek. A statisztikai elemzéshez T-próbát alkalmaztunk. Amennyiben $p < 0.05$, a különbséget szignifikánsnak jelöltük.

A vérsejttípusonként vizsgálva markáns változásokat észleltünk. Elsősorban a 10C5 pozitív sejtek aránya és morfológiai jegyei változtak meg. *L. victoriae* és *L. boulandi* fertőzés hatására a 10C5 pozitív sejtek sokmagvú óriássejteké differenciálódtak, melyek száma is szignifikánsan megnövekedett a naiv állatokban megtalálható 10C5 pozitív sejtekéhez képest (5. Ábra B, 6. Ábra).

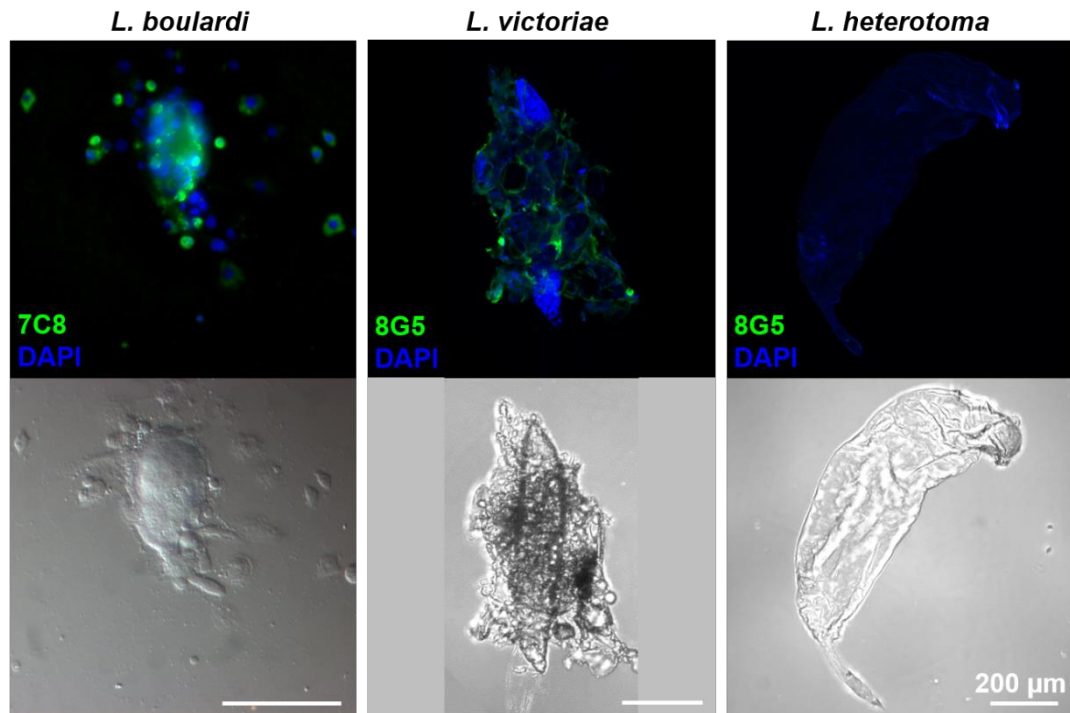


6. Ábra. A vérsejtek mintázata parazitoid darázsfertőzést követően megváltozik. A bemutatott képeken 10C5 ellenanyagot használtunk és a vérsejteket a fertőzést követő 72. órában vizsgáltuk. Naív, megfelelő korú lárvákban az ellenanyag egy vagy két sejtmaggal rendelkező sejtekkel reagált. *L. bouhardi* és *L. victorae* parazitoidokkal fertőzött lárvákban 10C5 pozitív sokmagvú óriás vérsejtek jelentek meg. *L. heterotoma* fertőzést követően a lárvákban nagymértékű sejtpusztulás volt észlelhető. A 10C5 ellenanyag elvértve 1-2 sejtet festett.

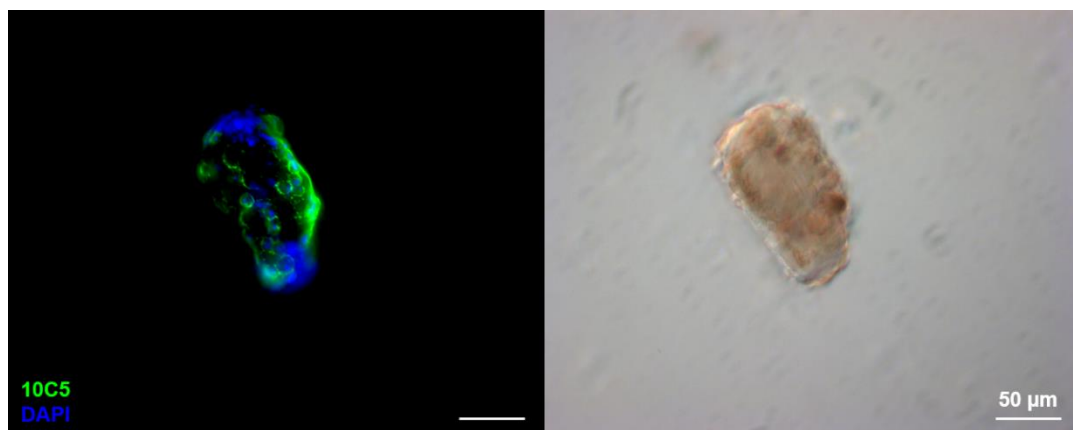
4.5. A vérsejtek reakciója a parazitoid darázsakkal történő fertőzést követően

Míg a *D. melanogaster* a parazitára szorosan simuló, melanizáló sejtes tokkal zárja körül a parazitoidot (14), *D. willistoni*-val végzett kísérleteinkben ehhez hasonló, kifejezett melanizációt mutató tokot nem észleltünk. *L. bouhardi* és *L. victorae* fertőzés esetében, ahol a vérképben nem látszódott a sejtek nagyarányú pusztulása, a vérsejteket kimutattuk a parazitoidok felszínén. A *L. bouhardi* fertőzést követő 72. órában a *D. willistoni* lárvákból szétválasztott, méretük alapján körülbelül 30 órás darázslárva fejlettségi fokának megfelelő, vérsejtekkel borított parazitoidot találtunk (7. Ábra). A *L. bouhardi* parazitoidok korai elpusztulása arra utal, hogy a védekező rendszer gyorsan és nagyon hatékonyan működik, melyben a 7C8 és 10C5 pozitív sejtpopulációk kiemelt szerepet játszhatnak (7. és 8. Ábra). *L. victorae* fertőzést követően a 72. órában *D. willistoni* lárvaként általában 3-5 elpusztult

parazitoidot izoláltunk, melyeket vérsejtek borítottak (7. **Ábra**). A *L. heterotoma* - mellyel történő fertőzés a vérsejtek drámai pusztulását okozta - túlélte a *Drosophila* lárvában, és vérsejtek sem borították a parazitoidot (7. **Ábra**).



7. **Ábra.** *D. willistoni* lárvából izolált parazitoidok a fertőzés után 72 órával.



8. **Ábra.** A 10C5 ellenanyag reakciója *L. bouhardi* lárván. Az elpusztult lárvát részlegesen melanizált vérsejtek borítják.

Eredményeink azt mutatják, hogy a parazitoidokkal történő fertőzés nemcsak a vérsejtek számának általános emelkedését vagy pusztulását idézi elő, hanem a vérsejt alpoulációk egymáshoz viszonyított arányát is megváltoztatja; különösen a 10C5 markerrel jellemezhető

sejtek arányának emelkedését idézte elő *L. bouhardi* és *L. victoriae* fertőzést követően. A *L. heterotoma* fertőzés ezzel szemben a vérsejtek pusztulását idézte elő, feltehetően a darázspetével a lárvába jutó, a vérsejteket specifikusan pusztító méreganyag által (15). Ezek a kísérleti eredmények rámutattak arra, hogy a vérsejtek, esetleg azoknak egy alpopulációja, mely a 10C5 ellenanyag reakciójával jellemezhető, lényeges szerepet játszanak a parazitoidok elleni sikeres védekezésben. Adataink megvilágítják a védekezés hatékonyságában mutatkozó különbségek okait és magyarázzák a *L. heterotoma*-val szembeni védekezés hiányát.

5. Összefoglalás

- A *D. willistoni* eddig ismeretlen módon, kivételes hatékonysággal védekezik a parazitoidokkal szemben.
- A védekezésben központi szerepet játszanak a vérsejtek, melyeknek fagocitáló, tokképző és melanizáló csoportjait különítettük el.
- A különböző funkciójú vérsejtek azonosítására alkalmas reagens-panelt hoztunk létre.
- A naiv *D. willistoni* egyedben a vérsejtek heterogenitást mutatnak. Parazitoid fertőzést követően a vérsejtek száma enyhén, nem szignifikánsan megemelkedik, új vérsejttípus nem jelenik meg. A keringésben jelenlévő, a markerekkel jellemzett vérsejt alpopulációk arányában lényeges változás áll be, mely korrelál a darázsfajokkal szembeni magas rezisztenciával. A tokképző sejt alpopulációban lényegesen megemelkedik a sokmagvú óriássejtek aránya. *L. heterotoma* fertőzést követően a tokképzésben résztvevő sejtek elpusztulnak, ami a darázsfajjal szembeni védekezés hiányával párosul.
- A parazitoid fertőzés a központi nyirokszervben sejtszaporodást és differenciálódást vált ki.
- A *D. willistoni* a különböző parazitoidokkal szemben különböző stratégiákat alkalmaz, melynek részletei ismeretlenek.
- A vérsejtek differenciálódásának és funkcióinak megismerése lehetőséget nyújt nemcsak a *D. willistoni* hatékony immunválaszának jobb megértéséhez, hanem egy olyan modellszervezet alkalmazásának lehetősége is körvonalazódik, mely lehetőséget nyújt a veleszületett immunitásban szerepet játszó, eddig ismeretlen és biológiailag hatékony faktorok vizsgálatára.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Andó Istvánnak, hogy elvállalta a szakdolgozatom téma vezetését. Emelett, hogy megtanított a veleszületett immunfolyamatok vizsgálataiban alkalmazott alapvető módszerekre, s hogy ötleteivel, tanácsaival támogatott munkám során és segített a dolgozat

megírásában. Köszönettel tartozom Dr. Cinege Gyöngyi Ilonának, hogy számos kísérlet elvégzésében és kiértékelésében a segítségemre volt, valamint, hogy segített a dolgozat ábráinak összeállításában és annak megírásában. Hálásan köszönöm Kovalcsik Olgának és Balázs Anitának az asszisztens segítséget. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kurucz Judit Évának, a Csoportvezetőnek, valamint Prof. Dr. Erdélyi Miklósnak, a Genetikai Intézet Igazgatójának, hogy engedélyezték a dolgozattal kapcsolatos kutatásoknak a Velezületett Immunitás Kutatócsoportban való elvégzését. Továbbá köszönöm az NKFI K135877 pályázat részéről a kutatómunka elvégzéséhez szükséges támogatást.

7. Irodalomjegyzék

1. Mayer A, Mora T, Rivoire O, Walczak AM. 2016. Diversity of immune strategies explained by adaptation to pathogen statistics. PNAS, 113 (31):8630-8635.
2. Banerjee U, Girard JR, Goins LM, Spratford CM. 2019. Drosophila as a genetic model for hematopoiesis. Genetics, 211:367-417.
3. Rizki MTM. 1957. Alterations in the haemocyte population of *Drosophila melanogaster*. J. Morphol., 100:437-458.
4. Márkus R, Laurinyecz B, Kurucz É, Honti V, Bajusz I, Sipos B, Somogyi K, Kronhamn J, Hultmark D, Andó I. 2009. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. PNAS, 106:4805-4809.
5. Nam HJ, Jang IH, Asano T, Lee WJ. 2008. Involvement of pro-phenoloxidase 3 in lamellocyte-mediated spontaneous melanization in *Drosophila*. Mol. Cells, 26:606-610.
6. Márkus R, Lerner Z, Honti V, Csordás G, Zsámboki J, Cinege G, Párducz A, Lukacsovich T, Kurucz É, Andó I. 2015. Multinucleated giant hemocytes are effector cells in cell-mediated immune responses of *Drosophila*. J. Innate. Immun., 7(4):340-353.
7. Kurucz, E, Váczai 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.
8. Zettervall CJ, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, Kurucz E, Andó I, Hultmark D. 2004. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. PNAS, 101:14192-14197.
9. Rizki MTM. 1955. Hereditary melanotic sclerosis in *Drosophila willistoni*. JEZ, 128(3):591-609.
10. Vass E, Nappi AJ, Carton Y. 1993. Comparative study of immune competence and host

susceptibility in *Drosophila melanogaster* parasitized by *Leptopilina boulardi* and *Asobara tabida*. J. Parasitol., 79(1), 106-112.

11. Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256:495-497.

12. Cinege G, Zsámboki J, Vidal-Quadras M, Uv A, Csordás G, Honti V, Gábor E, Hegedűs Z, Varga GIB, Kovács AL, Juhász G, Williams MJ, Andó I, Kurucz E. 2017. Genes encoding cuticular proteins are components of the Nimrod gene cluster in *Drosophila*. Insect Biochem Mol Biol., 87:45-54.

13. Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. Dev. Biol. 230:243-257.

14. Dudzic JP, Kondo S, Ueda R, Bergman CM, Lemaitre B. 2015. *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidasases. BMC biology, 13:81.

15. Konyoma TI, Kimura MT. 2015. Toxicity of venom of *Asobara* and *Leptopilina* species to *Drosophila* species. Physiol. Entomol. 40(4):304-308.

A 36. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE
TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Fodor Kinga** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **A *Drosophila willistoni* robusztus veleszületett immunválaszának egyedi és általános sajátosságai** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat*	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
<i>Vérsejtek izolálása D. willistoni-ból.</i>	5
<i>A vizsgálandó preparátumok előkészítése, feldolgozása.</i>	5
<i>Indirekt immunofluoreszcencia optimalizálása, végzése és az adatok kiértékelése.</i>	5
<i>Fagocitózis teszt végzése.</i>	5
<i>Az adatok statisztikai feldolgozása</i>	5
<i>Hibridóma tenyészet fenntartása, hibridsejt szelekció, felülhúzó gyűjtése indirekt immunofluoreszcencia végzéséhez.</i>	5
<i>Parazitoid darázs és Drosophila törzsek fenntartása</i>	5
<i>Drosophila willistoni és D. melanogaster törzsek fertőzése L. bouhardi, L. heterotoma és L. victoriae parazitoidokkal.</i>	5

Kelt: Szeged, 2022 november 14.

Fodor Kinga

Pályamunkát benyújtó hallgató (név) aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

István Andó *Cinege Gyöngyi*

Témavezetők (Prof. Dr. Andó István Ph.D., D.Sc., és
Dr. Cinege Gyöngyi Ph.D. tudományos főmunkatárs)