36. OTDK Biológia Szekció

A Headcase fehérje funkciójának vizsgálata az ecetmuslica központi nyirokszervének velőállományában

Készítette:

Virág Nikolett

Biológia BSc III. évfolyam

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Témavezető:

Dr. Honti Viktor

tudományos főmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Belső konzulens:

Dr. Sinka Rita

egyetemi docens
SZTE TTIK Genetikai Tanszék

Tartalomjegyzék

1 BEVEZETÉS 2

1.1 VÉRSEJTKÉPZÉS ÉS VÉRSEJT TÍPUSOK AZ ECETMUSLICÁBAN 2
1.2 A KÖZPONTI NYIROKSZERV 4
1.2.1 A poszterior szignalizációs központ 5
1.2.2 A velőállomány 6
1.2.3 A kérgi zóna 7
1.3 A HEADCASE FEHÉRJE 8
1.4 AZ UAS-GAL4 RENDSZER 10

2 CÉLKITŰZÉS 11

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 13

3.1 FELHASZNÁLT ANYAGOK 13
3.1.1 Pufferek, vegyszerek 13
3.1.2 Ellenanyagok 13
3.1.3 Drosophila törzsek 13
3.2 MÓDSZEREK: 14
3.2.1 A keringő vérsejtek vizsgálata 14
3.2.2 Központi nyirokszerv preparátum készítése 14
3.2.3 UAS-hdcRNAi; domeMeso-Gal4,UAS-2xEGFP/TM6Tb törzsek létrehozása 15
3.2.4 gstD-GFP-t hordozó hdc mutáns vonal létrehozása 15
3.2.5 Mikroszkópia és képfelvétel 15
3.2.6 Sejtszámlálás és statisztika 16

4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 17

4.1 A *HDC* CSENDESÍTÉSÉNEK HATÁSA A VELŐÁLLOMÁNYBAN 17
4.2 A ROS SZINT EMELKEDÉSE A *HDC* FUNKCIÓVESZTÉSES NYIROKSZERVBEN 18
4.3 AZ INZULIN/MTOR, A HH ÉS AZ EGFR ÚTVONALAK SZEREPE A *HDC* FENOTÍPUSÁNAK KIALAKÍTÁSÁBAN 21
4.4 E-CAD SZEREPE A PROGENITOROK FENNTARTÁSÁBAN 24

5 ÖSSZEFOGLALÁS 27

6 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 29

7 IRODALOMJEGYZÉK 30

8 TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS 35

1 Bevezetés

1.1 Vérsejtképzés és vérsejt típusok az ecetmuslicában

A vérsejtképzés során a hematopoetikus őssejtek (hematopoietic stem cells, HSC) differenciálódásukkal biztosítják, hogy a szervezet rendelkezzen az immunrendszer működéséhez, a betolakodók elleni védekezéshez szükséges sejttípusokkal. Az ember embriogenezise során a vérsejtképzés a szikhólyagban kezdődik (primitív vérsejtképzés), majd fokozatosan a magzati máj, a lép, és a csecsemőmirigy is részt vesz a folyamatban (defenzív vérsejtképzés), végül pedig a születést követően a csontvelő válik a vérsejtképzés központjává (Mikkola és mtsai, 2006). A HSC-k a csontvelő speciális mikrokörnyezetében találhatók, az úgynevezett HSC niche-ben, ahol más hematopetikus- illetve, egyéb sejtekkel is kölcsönhatásba lépnek. Ezek a kölcsönhatások elengedhetetlenek a számuk és a differenciálódási képességük szabályozásához (Morrison és mtsai, 2014).

A hemociták, a *Drosophila* vérsejtjei, működésükben hasonlóak az emlős mieloid immunsejtekhez; az ecetmuslicában a limfoid vonalhoz tartozó sejtek nincsenek jelen (Hultmark és mtsai, 1994; Akira és mtsai, 2006; Kleino és mtsai; 2014). A lárva keringésében lévő hemociták három típusba sorolhatóak; ezek a plazmatociták, a kristálysejtek és a lamellociták (Honti és mtsai, 2014; Rizki és mtsai, 1978).

A plazmatociták kicsi, gömbölyű morfológiájú, makrofág-szerű sejtek, melyek a lárva keringésében lévő vérsejtek mintegy 90-95%-át teszik ki. Funkciójuk a mikrobák és apoptotikus sejtek fagocitózisa, valamint antimikrobiális peptidek és extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék szekréciója, amelyek közül ez utóbbiak nélkülözhetetlen szerepet játszanak a szövetkárosodások helyreállításában (Rizki és mtsai, 1978; Irving és mtsai, 2005; Kurucz és mtsai, 2007) (1.ábra).

A kristálysejtek a hemociták 2-5%-át teszik ki, morfológiájukat és méretüket tekintve hasonlóak a plazmatocitákhoz. Ezek a sejtek profenoloxidáz kristályokat hordoznak a citoplazmájukban, mely fontos szerepet játszik a sebgyógyuláshoz nélkülözhetetlen melanizációs folyamatban. Ezenkívül a kristálysejtek kulcsfontosságúak a kórokozók elleni védekezésben, mivel a melanizációs kaszkád melléktermékeiként citotoxikus reaktív oxigénformákat (ROS) termelnek (Rizki és mtsai, 1978; Nappi és mtsai, 1995) (1.ábra).

A lamellociták nagyméretű, kiterült sejtek, melyek a naív lárvában nincsenek jelen; de immunindukció hatására nagy tömegben, részben a központi nyirokszerv progenitoraiból,

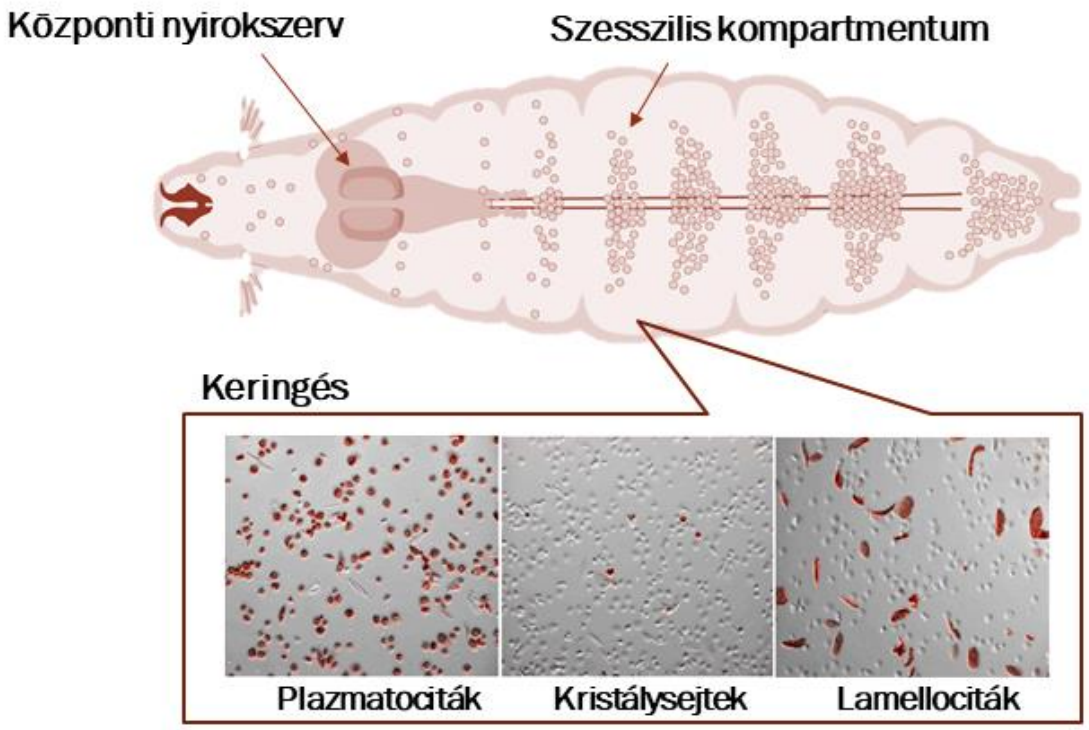
részben a keringő plazmatociták transzdifferenciálódásával keletkeznek (Honti és mtsai., 2010, 2014). Feladatuk a parazitoid darázs lárvája, vagy más, nem fagocitálható mérettartományba eső veszélyes részecske körüli többrétegű tok kialakítása. A tok melanizálódik és a folyamat során keletkező reaktív oxigénformák elpusztítják a parazitát (Nappi és Vass, 1998) (1.ábra). Érdekes módon, azok a mutációk, amelyek - például az egyes jelátviteli utak aktivációjával - vérsejt tumorokat idéznek elő, a magasabb fokú proliferáció mellett szinte mindig lamellociták képződéséhez is vezetnek (Asha és mtsai., 2003; Zettervall és mtsai., 2004; Minakhina és mtsai., 2006).

Az ecetmuslicában, akárcsak az emberben, a vérsejképzés két hullámban megy végbe. Először az ötödik embrió stádiumban keletkeznek hemociták, melyek két vérsejt populációt hoznak létre: az embrionális makrofágokat és az embrionális kristálysejteket. Az embrionális makrofágok migráló sejtek, a feji mezodermából az embrió poszterior részébe vándorolnak, majd innen tovább haladnak és bejárják a teljes embriót (Holz és mtsai, 2003; Brückner és mtsai, 2004; Wood és mtsai, 2006; Siekhaus éa mtsai, 2010; Parsons és Foley, 2013). Ezen sejtek fő feladata az apoptotikus törmelékek bekebelezése, de szükségesek az embrionális idegrendszer megfelelő fejlődéséhez is. Ezzel szemben az embrionális kristálysejtek nem vándorolnak, hanem két helyt ülő sejtcsoportot alkotnak a középbél anterior szakasza közelében. Funkciójuk ebben a stádiumban nem ismert (Franc és mtsai, 1996; Lebestky és mtsai, 2000; Kurant és mtsai, 2008; Evans és mtsai, 2010; Fujita és mtsai, 2012).

A második vérsejtképzési hullám az embrionális fejlődés középső szakaszában kezdődik. A laterális mezodermából indulva immunsejtek keletkeznek, amelyek csoportosulva alakítják ki a lárva vérképző szervének - a központi nyirokszerv - kezdeményét (Holz és mtsai, 2003).

Ezek alapján látható, hogy a vérsejtek - a gerincesekhez hasonlóan az ecetmuslicában is - minden egyes fejlődési stádiumban vérsejtképző kompartmentumokba rendeződnek, ahol a hematopoiezis folyamatai - az osztódás, illetve differenciálódás - zajlanak. A lárvában található vérsejképző kompartmentumok a központi nyirokszerv, a szesszilis vérsejtképző kompartmentum és a keringés (Holz és mtsai, 2003; Honti és mtsai, 2010 és 2014; Lanot és mtsai, 2001) (1.ábra).

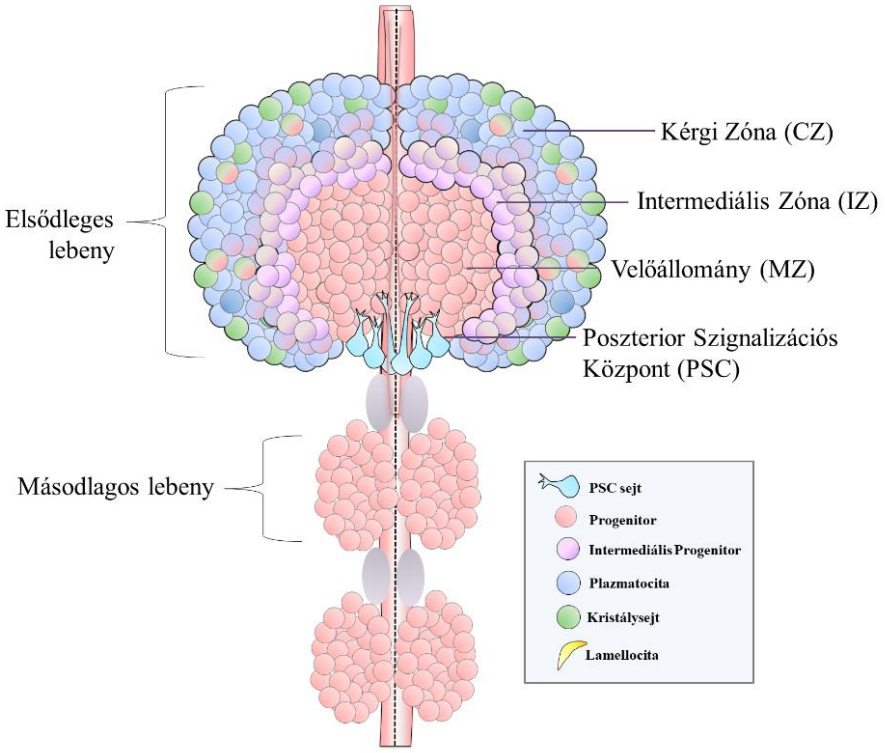
A fent említett hasonlóságokon túl, az ecetmuslica és a gerincesek vérképzését szabályozó jelátviteli útvonalak, transzkripciós és epigenetikai faktorok nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutatnak (Evans és mtsai., 2003).



1.ábra. A *Drosophila* lárva 3 hematopoietikus kompartmentumát ábrázoló sematikus ábra. A 3 kompartmentum közé tartozik: a központi nyirokszerv, a szesszilis kompartmentum és a keringés. A keringés 3 féle differenciált hemocitát tartalmaz: plazmatociták (P1 antitesttel jelölve), kristálysejtek (C1 antitesttel jelölve) és a lamellociták (L1 antitesttel jelölve) (Kurucz és mtsai., 2007; Banerjee és mtsai., 2019).

1.2 A központi nyirokszerv

A központi nyirokszerv a szívcső két oldalán elhelyezkedő páros lebenyes szerv, amely az embrionális központi nyirokszerv kezdeményből fejlődik ki. Az elsődleges lebeny három funkcionálisan különálló régióra osztható, melyek a poszterior szignalizációs központ (PSC), a kérgi zóna (CZ) és a velőállomány (MZ) (Jung és mtsai, 2005) Az MZ és a CZ között helyezkedik el az intermediális zóna (IZ). Az IZ köztes állapotú progenitorokat tartalmaz, amelyek érettebbek, mint az MZ-ben lévő progenitorok - mivel bizonyos CZ markert expresszálnak - ugyanakkor nem teljesen differenciált CZ sejtek, mert még expresszálnak néhány MZ markert (Spratford és mtsai, 2021; Girard és mtsai, 2021). (2. ábra).



2.ábra. A központi nyirokszerv felépítésének sematikus ábrája. Az elsődleges lebeny három funkcionális egységre tagolható: a kérgi zónában (CZ) differenciálódott vérsejtek, a velőállományban (MZ) progenitorok helyezkednek el; a poszterior szignalizációs központ (PSC) pedig maga a vérsejtképző niche. Az MZ és a CZ között helyezkedik el az intermediális zóna (IZ) hívnak. Az intermediális progenitorok az MZ és a CZ sejtjeire jellemző markereket egyaránt expresszálják (Spratford és mtsai, 2021; Girard és mtsai, 2021). A másodlagos lebenyek kisebb méretűek és normális körülmények között csak progenitorokat tartalmaznak. Szerepük az elsődleges lebenyek immunindukciót követő szétesése után van. Ekkor a másodlagos lebenyek megnagyobbodnak és a progenitoraik differenciált hemocitákat képeznek (Banerjee és mtsai., 2019; Kharrat és mtsai., 2022).

1.2.1 A poszterior szignalizációs központ

A poszterior szignalizációs központ (PSC) 20-40 sejtből épül fel. A PSC sejtek olyan jeleket bocsátanak ki, amelyek szabályozzák a progenitorok differenciálódását. Ezen tulajdonsága miatt a PSC-t vérképző niche-nek nevezték el a *Drosophilában* (Krzemień és mtsai; 2007; Benmimoun és mtsai., 2015)

A PSC-t az embrió korai szakaszában az *Antennapedia* (*Antp*) kifejeződése homeotikus gén határozza meg. A PSC sejtjei hosszú sejtnyúlványokat, ún. citonémákat bocsátanak a velőállomány sejtjei közé, és feltételezhetően ezeken keresztül továbbítják a differenciálódást gátló jeleket a prohemociták felé (Mandal és mtsai, 2007). A PSC-ből származó fontos szignálok közé tartoznak a Decapentapelagic (Dpp) és a Hedgehog (Hh) morfogének. Míg a

Dpp az embrionális stádiumtól kezdve keletkezik, a Hh csak később szintetizálódik. Feladatuk, hogy gátolják a hemocita prekurzorok korai differenciálódását a velőállományban a Thickveins (Tkv) és Patched (Ptc) receptoraihoz kötődve (Mandal és mtsai, 2007; Dey és mtsai, 2016). Ezenkívül a PSC a Pvf/Pvr jelátviteli útvonal ligandját is termeli (Pvf1), ami a kérgi zóna (CZ) receptoraihoz kötődve negatív visszacsatolást eredményez, amely elengedhetetlen az MZ-ben lévő progenitorok fenntartásához (Mondal és mtsai, 2011).

A PSC méretét több jelátviteli útvonal és transzkripciós faktor is szabályozza, beleértve magát az Antp-t is, amely a PSC fenntartásáért felelős (Mandal és mtsai, 2007). Ezen szabályozók közé tartozik a Dpp és a Wingless (Wg). A *wg* túltermelése, illetve a *dpp* csendesítése növeli a PSC méretét, míg a *wg* csendesítése, illetve a *dpp* túltermelése esetén pedig ellentétes hatás figyelhető meg (Pennetier és mtsai, 2012; Sinenko és mtsai, 2009). A PSC mérete szisztémás tényezőktől is függ, például az agy inzulintermelő sejtjeiből (IPC) szekretált inzulinszerű peptidek (DILP), amelyek aktiválják az inzulin útvonalat a PSC-ben, képesek növelni annak méretét is (Benmimoun és mtsai, 2012).

1.2.2 A velőállomány

A velőállomány (MZ) az elsődleges lebeny mediális régiójában található. Az MZ-ben található progenitorok differenciálódásával alakulnak ki a kérgi zónában (CZ) található funkcionális hemociták.

Az elsődleges lebenyeken belül számos faktor expressziós mintázata az MZ-re korlátozódik. Ilyen például, a Domeless (Dome), a JAK/STAT útvonal egyetlen receptora a *Drosophilában*. A JAK/STAT útvonal fontos szerepet játszik a progenitorok fenntartásában a MZ-ben. Az útvonal csendesítése a progenitorok differenciálódáshoz vezet, míg túlaktiválása megnöveli a progenitorok számát és az MZ méretét (Gao és mtsai, 2009; Krzemień és mtsai, 2007).

A MZ-ben található progenitorok közötti sejt-sejt kapcsolatok szintén hozzájárulnak a prohemocita állapot fenntartásához. Az E-cadherin (E-cad) adhéziós molekula egy adherens junction fehérje, amely magasabb szinten expresszálódik az MZ-ben, mint a PSC-ben és a CZ-ben, ezért ezen zóna markereként használható. Az *E-cad* elcsendesítése a progenitorok differenciálódását indukálja, míg túltermelése a progenitorokat differenciálatlan állapotban tartja (Gao és mtsai, 2013).

A MZ hemocitái képesek a PSC-től függetlenül is reagálni a környezeti jelekre. Például a felvett tápanyagok megváltozása a DILP-ek szintjének változásához vezetnek, ami aktiválja az inzulin/mTOR útvonalat a progenitorokban. Ennek az útvonalnak mind gátlása, mind

túlaktiválása kedvez a három hemocitatípus differenciálódásának a progenitorok rovására, ami arra utal, hogy a progenitorok fenntartása kiegyensúlyozott tápanyagbevitelt igényel (Sinenko és mtsai, 2009; Benmimoun és mtsai, 2012). A progenitorok képesek érzékelni az oxidatív stresszt, differenciálódásukhoz a reaktív oxigéngyökök (ROS) jelenléte szükséges. A ROS-molekulák MZ-sejtekből való eltávolítása blokkolja a progenitorok differenciálódását, míg a ROS-szint növelése differenciálódást és lamellocita termelést indukál a Jun N-terminális kináz (JNK) útvonal aktiválásával (Owusu-Ansah és mtsai, 2009).

Az MZ sejtek heterogének, a sejtmarkerek eltérő expressziója alapján három alpopulációra oszthatóak. Ezek a belső progenitorok, a disztális progenitorok és az intermedier progenitorok, melyek marker expressziójukat tekintve is elkülönülnek (Blanco-Obregon és mtsai, 2020; Sinenko és mtsai, 2009). A belső progenitorok az elsődleges lebenyek mediális részéhez közel, az intermedier progenitorok a kérgi zóna mellett, a disztális progenitorok pedig ezek között helyezkednek el (Blanco-Obregon és mtsai, 2020). A közelmúltban megjelent publikációk azt sugallják, hogy az intermedier sejtek különálló zónát, az „intermedier zónát” (IZ) alkotják (Spratford és mtsai, 2021; Girard és mtsai, 2021).

1.2.3 A kérgi zóna

A kérgi zónát (CZ) differenciált hemociták alkotják. Normális körülmények között itt plazmatociták és kristálysejtek találhatók, azonban immunindukció hatására lamellociták is megjelennek. A CZ a második stádiumú lárvában kezd kialakulni, majd a progenitorok differenciálódásával folyamatosan növekszik, végül a bebábozódás során szétesik és tartalmát a keringésbe juttatja, ahol ezek a sejtek segítik a baktériumok és sejttörmelékek fagocitózisát (Jung és mtsai, 2005).

A legkorábbi markerek ebben a zónában a Hml és a Pxn, míg más markerek az egyes effektor sejtvonalakra specifikusak, mint például a plazmatociták által expresszált NimC1 és Eater fagocitózis receptorok (Jung és mtsai., 2005; Kurucz és mtsai., 2007; Bretscher és mtsai., 2015). A kristálysejtek két profenoloxidáz (PPO) enzimet expresszálnak, a PPO1-et és a PPO2-t, specifikációjukhoz szükséges transzkripciós faktor a Lozenge (Lz) (Binggeli és mtsai., 2014; Dudzic és mtsai., 2015; Lebestky és mtsai., 2000). A lamellociták azonosíthatóak az Atilla (L1) nevű, ismeretlen funkciójú felületi antigén expressziójáról, a PPO3 enzim expressziójáról és a Misshapen (Msn) és Puckered (Puc) kifejeződéséről, amelyek a JNK jelátviteli útvonal komponensei. Ez az útvonal alapvető fontosságú a lamellociták differenciálódásában (Zettervall és mtsai., 2004; Nam és mtsai., 2008; Kurucz és mtsai., 2007; Honti és mtsai., 2009).

1.3 A Headcase fehérje

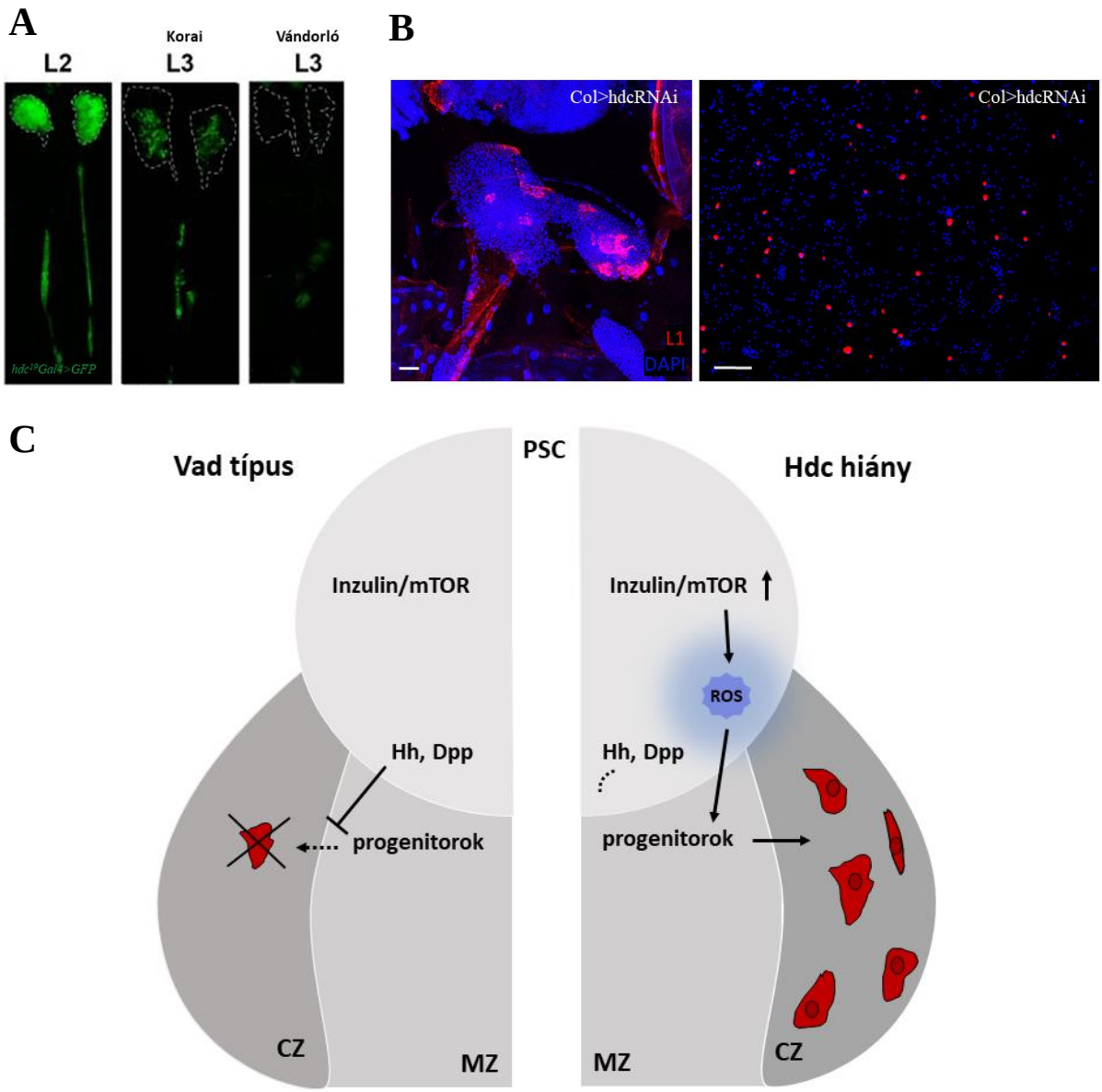
A Headcase (Hdc) citoplazmatikus fehérje, amely minden - a felnőtt állat testrészeit kialakító - imaginális szövetben jelen van, és sejtautonóm módon gátolja ezen szövetek sejtjeinek differenciálódását. A Hdc a fejlődő szervkezdeményekben az utolsó mitotikus osztódásig expresszálódik, majd a metamorfózis követően a gén aktivitása megszűnik, és a kifejlett egyedet kialakító szövetek sejtjei differenciálódásnak indulnak. A *hdc* letális fenotípusának feltehető oka ezen szövetek idő előtti differenciálódása (Weaver és White, 1995).

A Hdc fehérje humán homológja a HECA, amely tumorszuppresszor hatással rendelkezik. Sejtosztódást gátló hatását valószínűleg ciklinekkel való kölcsönhatása révén fejti ki (Chien és mtsai, 2006; Dowejko és mtsai; 2012).

A Hdc fehérje fontos szerepet játszik az ecetmuslica here őssejt niche fenntartásában; az ott fellelhető egyik szomatikus sejttípusnak az ún. „hub" sejteknek a túlélését szabályozza. A Hdc az mTOR jelátviteli útvonal szabályozásán keresztül hatással van a különböző szövetek növekedésére, sejtjeik osztódására és differenciálódására (Resende és mtsai, 2013; Avet-Rochex és mtsai, 2014).

Korábban megfigyelték, hogy a *hdc* az imaginális szöveteken kívül, a központi nyirokszervben is kifejeződik. A lárválís fejlődés során a központi nyirokszerv elsődleges lebenyében a *hdc* korai kiterjedt kifejeződési mintázata a lárva életszakasz végére fokozatosan csökken. Míg a második lárva stádiumban a gén a központi nyirokszerv minden sejtjében kifejeződik, a vándorló lárvák nyirokszervének első lebenyében teljesen megszűnik a gén aktivitása (Varga és mtsai., 2019) (3.ábra).

A homozigóta *hdc* mutáns lárvákban, - ahogyan a *hdc* PSC specifikus csendesítése során is - immunindukció hiányában, spontán lamellocita differenciálódás zajlik, ami arra utal, hogy a Hdc a lamellocita sejtsorsot gátló faktorként vesz részt a hematopoiezis szabályozásában. További kísérletek során kiderült, hogy a Hdc a niche-ben a Dpp, a Hh és a JAK/STAT jelátviteli útvonalakat szabályozva tartja fent az MZ progenitorainak differenciálatlan állapotát (Varga és mtsai., 2019). Legújabb eredményeink szerint a Hdc gátolja az inzulin/mTOR jelátviteli útvonal működését, ezáltal is hozzájárulva a progenitorok fenntartásához. A gátló hatás hiányában a PSC sejtek ROS szintje megemelkedik, ami a progenitorok differenciálódásához vezet (Bayan Kharrat személyes közlése) (3. ábra).



3.ábra. (A) A *hdc* expressziós mintázata a központi nyirokszervben a lárva fejlődés során. A szaggatott vonal az elsődleges lebenyt jelzi. Második stádiumú lárvában a *hdc* kifejeződik az elsődleges lebeny nagy részében és a másodlagos lebenyekben is. A mintázat a harmadik stádiumú lárva elsődleges lebenyében fokozatosan tűnik el. Vándorló lárvában a *hdc* expressziója az elsődleges lebenyben tovább csökken, és végül a PSC-ből is eltűnik. A másodlagos lebenyekben azonban megmarad *hdc* expressziója (Varga és mtsai., 2019). **(B)** Lamellocita differenciálódás a *hdc* funkcióvesztése esetén. A lamellociták (L1 immunfluoreszcencia, piros) megfigyelhetőek a központi nyirokszervben (bal oldali kép) és a keringésben (jobb oldali kép) egyaránt. Lépték: 20 µm **(C)** A Hdc jelenlétének és hiányának következményei a központi nyirokszervben. A Hdc a Hh, a Dpp és az inzulin/mTOR jelátviteli útvonalakon keresztül fejti ki a progenitorok differenciálódását gátló nem sejt-autonóm hatását. *hdc* csendesített, illetve mutáns lárvákban azonban az inzulin/mTOR jelátviteli útvonal túlzott aktivitása következtében megemelkedett ROS szint a progenitorok differenciálódását eredményezi, mely egyúttal - egy eddig ismeretlen mechanizmuson keresztül - befolyásolhatja a Hh és Dpp szekrécióját is.

Az eddigi eredmények alapján a Hdc PSC-ben betöltött szerepe megkérdőjelezhetetlen. Az a tény azonban, hogy a *hdc* korai lárvában a teljes központi nyirokszervben kifejeződik ugyanakkor azt sugallja, hogy a Hdc-nek a nyirokszerv más sejtjeiben, esetleg magukban a progenitorokban is - sejt-autonóm - szabályozó funkciója lehet. TDK munkám során a Hdc ezen lehetséges sejtautonóm szabályozó feladatának felderítésével foglalkoztam az ecetmuslica genetikai eszköztárának felhasználásával.

1.4 Az UAS-Gal4 rendszer

Az egyik legáltalánosabban használt genetikai eszköz *Drosophila*-genetikában az UAS-Gal4 rendszer, melynek segítségével megvalósítható az általunk kiválasztott gének sejt-, illetve szövet specifikus kifejeztetése, valamint csendesítése. A rendszer két komponensből áll: a Gal4-forrás tartalmazza a sejt-, illetve szövet specifikus kifejeződést biztosító promótert és a Gal4 transzkripciós faktor fehérjét kódoló szekvenciát, míg a második elem tartalmazza a Gal4 célpontjául szolgáló UAS szakaszt és a kifejeztetni kívánt gént. Mivel a rendszer két elemből áll szabadon kombinálhatóak a specificitást biztosító promóterek és a kifejeztetni kívánt gének (Brand és mtsai., 1993).

2 Célkitűzés

Mivel az ecetmuslica és az emlősök vérsejtképzése nagyfokú hasonlóság figyelhető meg, ezért fontos megérteni, hogy miként történik ezen folyamat szabályozása. A *Drosophila* vérképzésben szerepet játszó faktorok azonosítására szolgáló vizsgálatok során laboratóriumunk azt találta, hogy a *hdc* gén a központi nyirokszervben a hemocita progenitorok differenciálódásának szuppresszoraként működik. Korábban már megfigyelték, hogy a Hdc nem sejt-autonóm módon gátolja a progenitorok lamellocitává történő differenciálódását a PSC-ben aktív Hh és Dpp (Varga és mtsai., 2019), valamint az inzulin/mTOR jelátviteli útvonalokon keresztül (Bayan Kharrat személyes közlése). A Hdc sejt-autonóm funkcióját a progenitorokban azonban eddig még nem vizsgálták. TDK munkám célja, a Hdc fehérje sejt-autonóm szerepének tisztázása. Munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. Megvizsgálni, hogy a Hdc-nek van-e sejt-autonóm szerepe az MZ-ben a korai progenitor differenciálódás gátlásában. Ehhez MZ specifikus driver (*domeMESO*) segítségével csendesítettük a *hdc* gént. L1 lamellocita specifikus ellenanyaggal vizsgáljuk a lamellociták esetleges megjelenését a központi nyirokszervben, illetve a keringésben.
2. Mivel korábbi kísérletek arra utalnak, hogy a *hdc* a PSC specifikus csendesítése a ROS szint megemelkedéséhez vezet, megvizsgáltuk, hogy a *hdc* mutáns állatokban a MZ-ban is megnövekszik-e a ROS szintje.
3. Megvizsgálni, hogy a PSC-ben tapasztaltakhoz hasonlóan a Catalase (egy ROS-t lebontó enzim) és a FOXO (a ROS-t lebontó enzimeket szabályozó transzkripciós faktor) túltermelése az MZ-ban menekíti-e a hdc funkcióvesztése esetén megfigyelhető lamellocita differenciálódást. Ehhez olyan törzset állítottunk elő, amely hordozza mind a *domeMESO* meghajtóelemet, mind a *hdc RNSi*-t, majd ennek hátterében vizsgáljuk az *UAS-Cat* és az *UAS-foxo* hatását. A megfelelő lárvák kiválasztása után L1 ellenanyaggal immunfluoreszcens festést végzünk a lárvák központi nyirokszervén és keringő vérsejtjein.
4. Megvizsgálni, hogy a PSC-ben megfigyeltekhez hasonlóan menekíthető-e a *hdc* MZ specifikus csendesítése a Hh, a Dpp túltermelésével, illetve az inzulin/mTOR jelátviteli út gátlásával. Ehhez a korábban előállított - a *hdc* MZ specifikus csendesítését biztosító - vonalat, illetve a jelátviteli útvonalak komponenseit túltermelő, illetve gátló

konstrukciókat használjuk fel. A vizsgálatba más jelátviteli útvonalak (pl. EGFR) elemeit is bevonjuk. A lamellocitákat L1 festéssel detektáljuk.

5. Az E-cad adhéziós molekula túltermelésével megvizsgálni, hogy a progenitorokat összetartó sejtadhéziós erők megnövelésével menekíthető-e a progenitorok *hdc* funkcióvesztés következtében történő differenciálódása.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált anyagok

3.1.1 Pufferek, vegyszerek

Schneider's médium (Sigma S0146-500mL)

FBS (EuroClone ECS183L)

PBS: 0,13M NaCl, 7mM Na_2HPO_4, 3mM NaH_2PO_4, pH 7,4

BSA (Merck 126575-10GM): marha szérum-albumin

Fluoromount G (SouthernBiotech 0100-01): fedőmédium

PTU (Sigma-Aldrich P7629-10G): N-Phenylthiourea, gátolja a melanizációt

DAPI (Sigma-Aldrich D9542): 4',6'-diamidino-2-phenylindole 1 mg/ml, fluoreszcens DNS festék

TritonX-100 (Serva 37238.01)

Paraformaldehid (PFA) (Sigma-Aldrich P6148-500G)

Aceton

3.1.2 Ellenanyagok

Attila specifikus ellenanyag keverék (L1): H10/9, 7A6, 29D4 hibridóma felülúszók elegye (Kurucz és mtsai 2007), a lamellociták jelölésére használt elsődleges ellenanyag

Alexa Fluor 568 konjugált, kecskében termeltetett anti-egér IgG másodlagos ellenanyag (Invitrogen A11004), 1:1000 hígításban alkalmaztuk

3.1.3 *Drosophila* törzsek

A vizsgálatok során használt Drosophila törzsek:

w^{1118} *(BDSC#9505), UAS-hdcRNAi (VDRC#v45069), domeMeso-GAL4,UAS-2xEGFP* (Oyallon és mtsai., 2016), *UAS-hdcRNAi; domeMeso-Gal4,UAS-2xEGFP/Tm6Tb* (ebben a dolgozatban), $hdc^{\Delta 84}$ */TM3KrGFP (Varga és mtsai., 2019), gstD-GFP* (D. Bohmann, University of Rochester, USA), *gstD-GFP;* $hdc^{\Delta 84}$ */TM6Tb* (ebben a dolgozatban), *UAS-Cat (BDSC*#24621), *UAS-foxo (BDSC*#9575), *UAS-AktRNAi (BDSC*#31701), *UAS-RaptorRNAi (BDSC*#31528), *UAS-hh* (ajándék Matusek Tamástól), *UAS-EgfrDN (BDSC*#5364), *UAS-E-Cadherin* (ajándék G. Longmore-tól, Washington University)

A felhasznált törzsek tartását és a keresztezéseket standard kukaricaliszt-élesztő táptalajon végeztük 25˚C-on.

3.2 Módszerek:

3.2.1 A keringő vérsejtek vizsgálata

A vérsejteket naiv vándorló lárvákból izoláljuk 12 lyukú tárgylemezen (Hendley-Essex SM011). A lárvák kutikuláját feltépjük 30 µl PTU-t tartalmazó 5% FBS-sel kiegészített Schneider's médiumban, majd enyhén megrázzuk a lárvákat, így a vérsejtek a folyadékba kerülnek. A mintákat ezt követően szobahőmérsékleten, nedves kamrában egy órán keresztül inkubáljuk, hogy a sejtek a tárgylemez felszínéhez tapadhassanak. A PTU-t tartalmazó Schneider's médium cseppek eltávolítását követően a mintákat 6 percig fixáljuk acetonban szobahőmérsékleten. Ezután a preparátumokat 0,1% BSA-t tartalmazó PBS-ben telítjük és egy órán keresztül, nedves kamrában, szobahőmérsékleten inkubáljuk az elsődleges ellenanyaggal (elsődleges ellenanyagként három L1 specifikus ellenanyag keverékét használjuk a lamellociták jelölésére (H10/9, 7A6, 29D4)). Az inkubációs idő letelte után a mintákat 3x5 percig PBS-ben mossuk, majd ezt követően a másodlagos ellenanyaggal 45 percig szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáljuk. Másodlagos ellenanyagként Alexa Fluor 568 konjugált kecske anti-egér IgG-t alkalmazunk, melyet 1:1000 arányban hígítunk 0,1% BSA-PBS-ben. A sejtmagokat jelölő DAPI-t, 1:400 hígításban a másodlagos ellenanyaggal együtt adjuk a mintákhoz 1. A preparátumok fedéséhez FluoromontG fedőmédiumot használunk és a kész mintákat fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáljuk. A hemociták számát a DAPI jelölés, a lamellociták arányát pedig az L1 festődés alapján határozzuk meg az ImageJ szoftver segítségével.

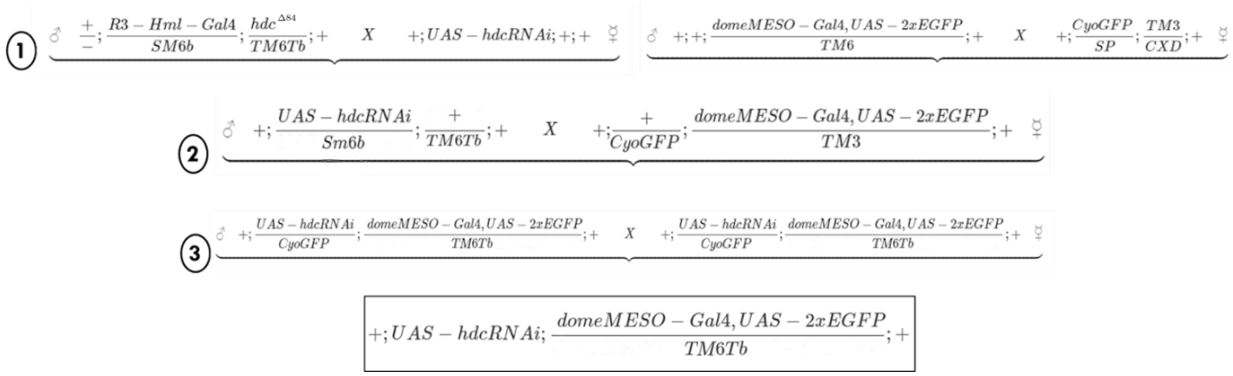
3.2.2 Központi nyirokszerv preparátum készítése

A harmadik stádiumú lárvákat fekete gumipárnán 30 µl, PTU-val és 5% FBS-sel kiegészített Schneider's médiumba helyezzük, feji és farki végüket tűk segítségével rögzítjük, majd csipesszel a feji-farki tengely mentén feltárjuk a kutikulájukat. A preparátumokat 2%-os paraformaldehidben 10 percig fixáljuk, majd a vizsgálni nem kívánt szerveket és szöveteket csipesz segítségével eltávolítjuk. A törmelékeket 3x5 perces PBS-es mosással eltávolítjuk aztán a mintákat mikrotiter lemez egy lyukába helyezzük, ami 0,01% Triton X-100-zal 0,1% BSA-PBS-t tartalmaz. Így telítjük a preparátumokat 20 percig, majd az elsődleges ellenanyagot hozzáadva 12-16 órán keresztül inkubáljuk 4°C-on. Ezt újabb 3x5 perces PBS-ben történő mosás követi, majd a mintákat 45 percig szobahőmérskleten inkubáljuk a DAPI-val kiegészített

(1:400) másodlagos ellenanyaggal (Alexa Fluor 568 konjugált kecske anti-egér IgG (1:1000)). Végül PBS-sel történő mosást követően a preparátumot tárgylemezre helyezzük, Fluoromount G fedőmédiumban fedőlemezzel lefedjük és konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáljuk.

3.2.3 *UAS-hdcRNAi; domeMeso-Gal4,UAS-2xEGFP/TM6Tb* törzsek létrehozása

A törzs elkészítését az alábbi keresztezési séma alapján végeztük el:

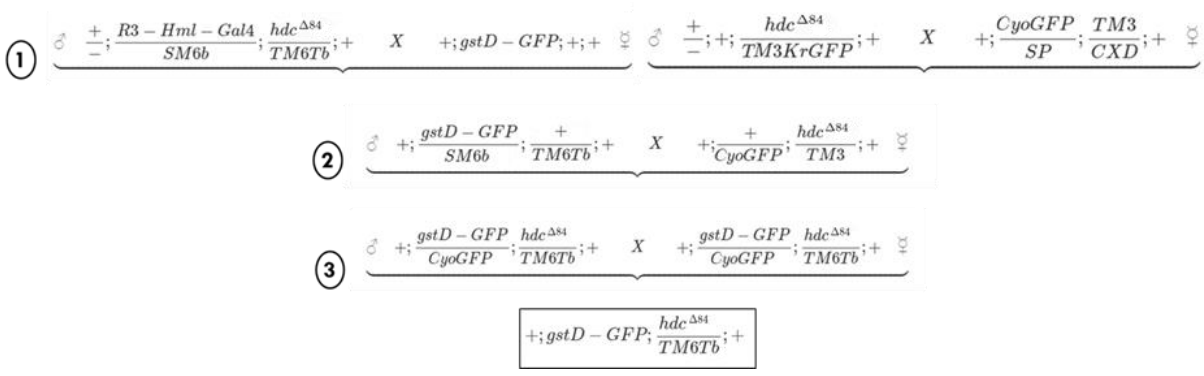


$$+;UAS-hdcRNAi;\frac{domeMESO-Gal4,UAS-2xEGFP}{TM6Tb};+$$

Mivel a *hdc* szerepet játszik a here őssejt niche fenntartásában, ezért a hímek gyakran sterilek, ami nagyban megnehezíti a törzs fenntartását. Az előbb említett okból adódóan minden szignalizációs útvonal teszteléséhez összeállított keresztezéshez *UAS-hdcRNAi; domeMeso-Gal4* szüzeket használtunk.

3.2.4 *gstD-GFP*-t hordozó *hdc* mutáns vonal létrehozása

A törzs elkészítését az alábbi keresztezési séma alapján végeztük el:



$$+;gstD-GFP;\frac{hdc^{\Delta 84}}{TM6Tb};+$$

3.2.5 Mikroszkópia és képfelvétel

A mintákról a képek a keringő vérsejtek esetében Zeiss Axio Imager Z1 mikroszkóppal, a központi nyirokszerv esetében pedig Zeiss LSM800 konfokális mikroszkóppal készültek. Mindegyik nyirokszervről 10 rétegben készültek képet, és a képeket az ImageJ/Fiji (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) képfeldolgozó szoftver segítségével egyesítettük.

3.2.6 Sejtszámlálás és statisztika

A lamellociták számlálása manuálisan történt az ImageJ/Fiji szoftver segítségével. A sejtmagok megszámolása a ‘cellcounter’ algoritmus felhasználásával automatikusan történt. Minden kísérletet legalább kétszer megismételtünk. Az eredmények kiértékelése a Microsoft Excel és GraphPad Prism szoftver 6.0-ás verziójával történt. Az átlagok összehasonlítása az egyes kísérletek és a megfelelő kontrollok között a Welches’s Student T-teszttel történt. A $p < 0,05$ értékeket szignifikánsnak fogadtuk el (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p< 0,0001$). ns: nem szignifikáns

4 Eredmények és értékelésük

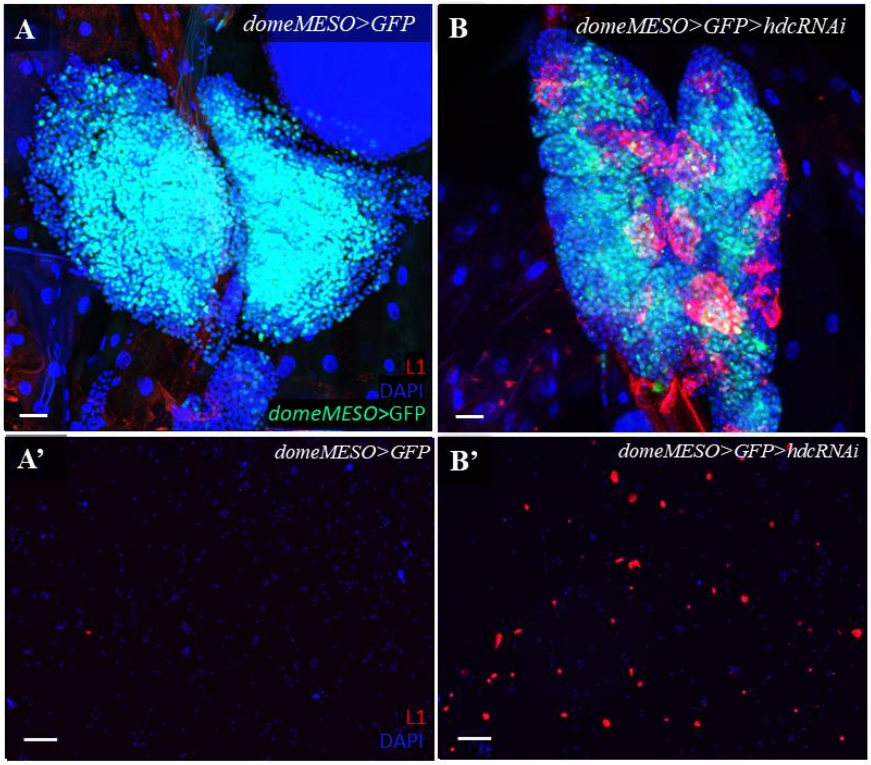
4.1 A *hdc* csendesítésének hatása a velőállományban

A szakirodalmi adatok szerint a *hdc* a vérsejtképző kompartmentumok közül egyedül a központi nyirokszervben fejeződik ki, azonban immunindukció hatására a nyirokszervből a keringésbe jutó és differenciálódó hemocitákban a gén aktivitása lecseng (Weaver és White, 1995; Márkus és mtsai., 2009). Azt is megfigyelték, hogy a gén kifejeződési mintázata a központi nyirokszerv fejlődése során fokozatosan csökken, a vándorló lárva stádiumra teljesen vissza is húzódik (Varga és mtsai., 2019).

A *hdc* funkcióvesztéses és a *hdc* csendesített naív lárvákban lamellocita differenciálódás megy végbe, emellett a keringésben csökken a plazmatociták aránya, amely megerősíti azt az elméletet, miszerint a *hdc* szerepet játszhat a lamellocita sejtsors visszaszorításában a központi nyirokszervben Kutatócsoportunk eredményei szerint a PSC-ben a Hdc nem-sejt-autonóm hatása révén, a Hh, a Dpp és az inzulin/mTor útvonalakon keresztül szabályozza az MZ progenitorainak fenntartását (Varga és mtsai., 2019; Bayan Kharrat személyes közlése).

Nem ismerjük azonban, hogy milyen sejt-autonóm szabályozási hatást fejt ki magunkban a MZ-ban elhelyezkedő prohemocitákban.

Hogy megvizsgáljuk a *hdc* hiányának hatását a velőállományban, *domeMESO* meghajtóelemet használtuk, melynek kifejeződése specifikus a nyirokszerv medulláris zónájára. A meghajtóelem segítségével csendesítettük a *hdc* gént, majd megvizsgáltuk a lárvák keringő hemocitáit, illetve központi nyirokszervét. A lamellociták detektálásához L1 antitesttel történő immunfestést alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy MZ specifikus csendesítés hatására mind a központi nyirokszervben, mind a keringésben lamellociták jelentek meg, ami arra utal, hogy a Hdc sejt-autonóm módon is részt vesz a MZ progenitorainak fenntartásában (4.ábra, Statisztika: 10.ábra).



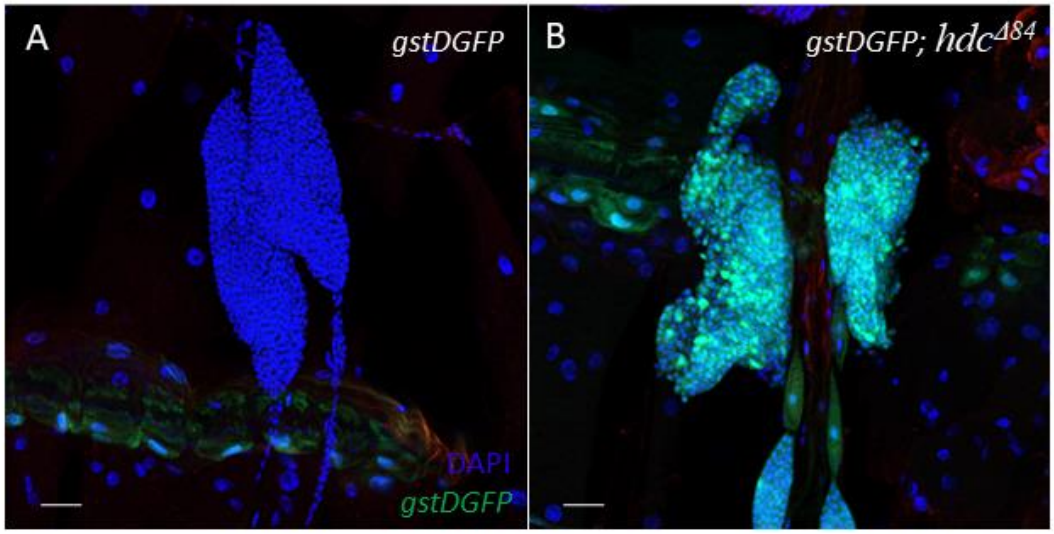
4.ábra. A *hdc* csendesítésének fenotípusa a központi nyirokszerv velőállományában. **(A-A')** A kontroll lárvákban sem a központi nyirokszervben (lamellocitát tartalmazó központi nyirokszervek százalékos aránya: 0% (n=6)) **(A)** sem pedig a keringésben (lamellociták százalékos aránya: 0,12%(n=34)) **(A')** nem tapasztaltunk lamellocita differenciálódást. **(B-B')** A *hdc* hiánya a velőállományban lamellociták differenciálódását eredményezte (lamellociták piros színnel), amelyek a központi nyirokszervben (lamellocitát tartalmazó központi nyirokszervek százalékos aránya: 80% (n=10)) **(B)** és a keringésben (lamellociták százalékos aránya: 4,4075% (n= 69)) **(B')** egyaránt megfigyelhetőek. A sejtmagokat a DAPI (kék) jelöli.
Lépték: 20 µm

4.2 A ROS szint emelkedése a *hdc* funkcióvesztéses nyirokszervben

A reaktív oxigénfajták (ROS) destruktív ágensként működnek. Abszolút szintjük és az általuk okozott oxidatív stresszre adott nem megfelelő válasz egyaránt felelős a degradáló hatásukért. Bár a pontos hatásmechanizmus továbbra sem ismert, a ROS számos élőlényben az öregedés felgyorsulásához vezet (Finkel és mtsi., 2000).

Az ecetmuslica központi nyirokszervében lévő progenitorok differenciálódásához szükséges a reaktív oxigénfajták (ROS) jelenléte. A ROS-szint emelkedése a Jun N-terminális kináz (JNK) útvonal aktiválásával indukálja, ugyanakkor a ROS-molekulák MZ-sejtekből való eltávolítása blokkolja a progenitorok lamellocitákká történő differenciálódását (Owusu-Ansah és mtsai, 2009).

Hogy megvizsgáljuk a ROS változását *hdc* funkcióvesztéses lárvák központi nyirokszervében, létrehoztunk egy olyan törzset, amely hordozza mind *gstD-GFP* a ROS-riportert, mind a $hdc^{\Delta 84}$ null allélt. Míg a kontroll állatokban a riporter expressziója nem volt megfigyelhető, a mutáns lárvák nyirokszervének csaknem minden sejtjében erős GFP expressziót tapasztaltunk (5. ábra). Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a *hdc* a ROS szint szabályozásán keresztül fejti ki hatását a MZ zóna progenitorainak fenntartása során.



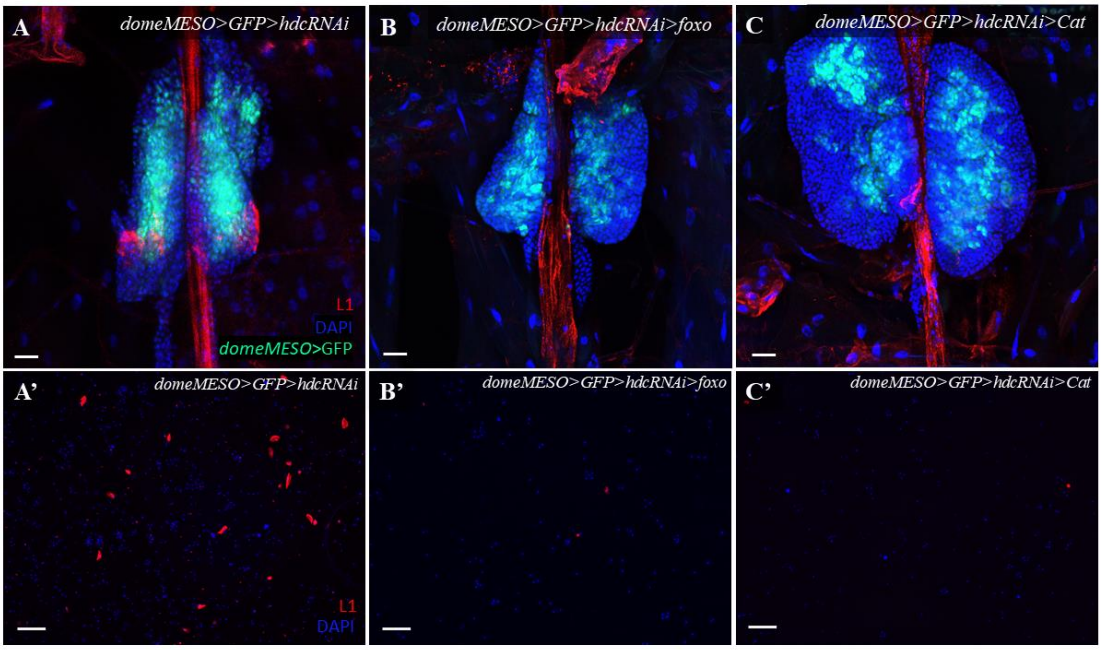
5.ábra. A *hdc* funkcióvesztése a ROS szintjének emelkedéséhez vezet. **(A-B)** Ellentétben a kontroll állatok nyirokszervével (megvizsgált központi nyirokszervek száma: n=5) **(A)** a ROS riporter expressziója megfigyelhető a *hdc* mutáns lárvák központi nyirokszervében (megvizsgált központi nyirokszervek száma: n=5) **(B)**.
Lépték: 20 µm

Mivel azt feltételeztük, hogy a PSC-ben megfigyeltekhez hasonlóan a MZ-ban is fontos szerepet játszik a ROS a progenitorok differenciálódásának indukálásában, megvizsgáltuk a ROS szint visszaszorításának hatását a *hdc* funkcióvesztéses lárvákban. Ehhez először a Forkhead box O (Foxo) transzkripciós faktor túltermelésének hatását vizsgáltuk meg. A Foxo olyan transzkripciós faktor, amely az antioxidáns enzimek expresszióját szabályozza (Nemoto és Finkel, 2002). Korábban már megfigyelték, hogy *foxo* funkcióvesztéses állatok rendelkeznek hiperszenzitívek az oxidatív stresszre (Jünger és mtsai., 2003).

A vizsgálathoz létrehoztunk egy törzset, amely hordozza mind a *domeMESO* meghajtóelemet (Anyagok és módszerek 3.2.3), mind a *hdc* RNSi-t, majd ennek hátterében vizsgáljuk a *foxo* túltermelésének hatását. A lamellociták differenciálódásának detektálásához a központi nyirokszervet és a keringő vérsejteket L1 immunfluoreszcenciával jelöltük. Azt tapasztaltuk,

hogy a *foxo* túltermelése menekítette a *hdc* MZ specifikus csendesítésének hatását, kontrollal szemben kevesebb lamellocita volt detektálható (6.ábra, Statisztika: 10.ábra).

Hogy hipotézisünket alátámasszuk, hasonló elrendezésben megvizsgáltuk a Catalase-t (Cat) - a hidrogén peroxidot vízzé és oxigénre bontó - antioxidáns enzim túltermelésének hatását is. Korábban kimutatták, hogy a *Cat* túltermelése megnövelte az ecetmuslicák élettartamát, továbbá csökkentette a fehérjék oxidatív károsodását (Orr és mtsai., 1994). A *hdc RNSi*-t és a *domeMESO* meghajtó elemet hordozó állatokat *UAS-Cat* ecetmuslicákkal kereszteztük, majd L1 festéssel vizsgáltuk a lárvák keringését és központi nyirokszervét. A *domeMESO>hdcRNAi* kontrollhoz képest azt tapasztaltuk, hogy a *Cat* túltermelése szintén menekíti a *hdc* hematopoietikus fenotípusát (6.ábra, Statisztika: 10.ábra).



6.ábra. A *hdc* mutáns fenotípus menekítése a *foxo* és a *Cat* túltermeléssel. **(A-A')** A *hdc* velőállományban történő elcsendesítésének fenotípusa. **(B-B')** A *foxo* túltermelése menekítette a lamellocita (pirossal) fenotípust a központi nyirokszervben (lamellocitát tartalmazó központi nyirokszervek százalékos aránya: 33,3% (n=9)) **(B)** és a keringésben (lamellociták százalékos aránya: 0% (n=22)) **(B')** egyaránt. **(C-C')** A *Cat* túltermelése szintén menekítette a fenotípust a központi nyirokszervben (lamellocitát tartalmazó központi nyirokszervek százalékos aránya: 50% (n=8)) **(C)** és a keringésben (lamellociták százalékos aránya: 0,2% (n=24)) **(C')**. A sejtmagokat a DAPI (kék) jelöli.
Lépték: 20 µm

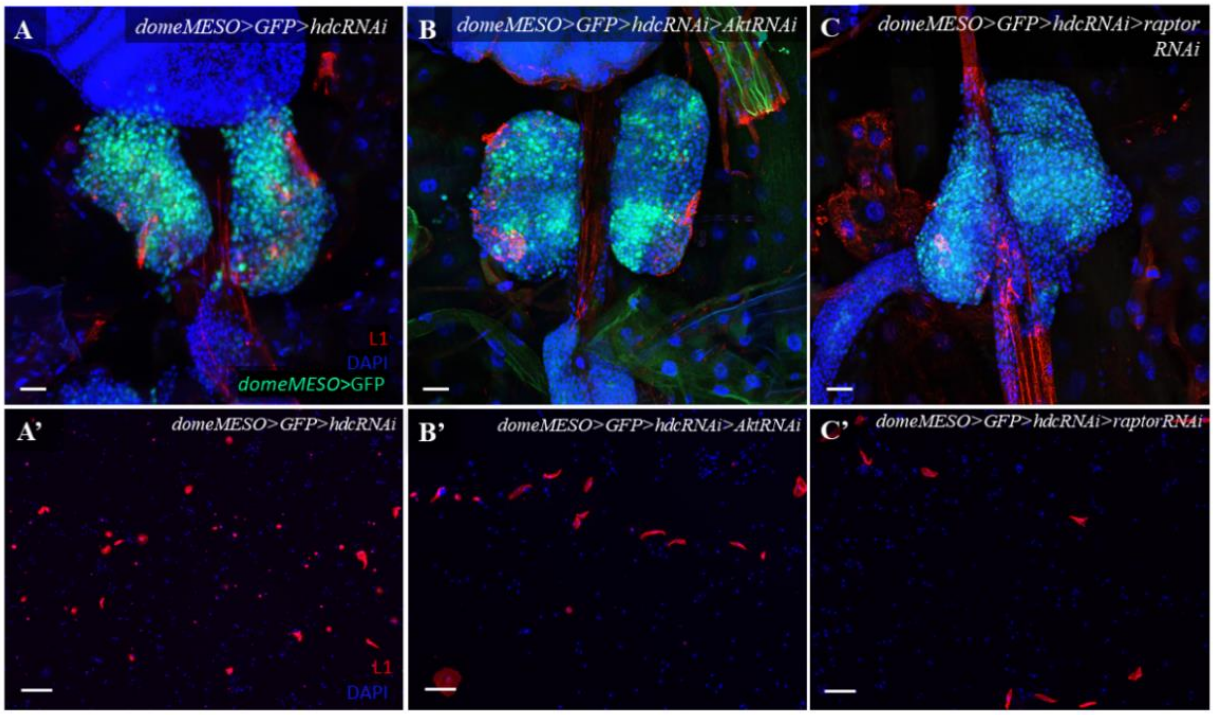
A fenti eredmények megerősítették azt a hipotézisünket, hogy a *hdc* funkcióvesztése a ROS szint emelkedésén keresztül idézi elő a progenitorok lamellocitává történő differenciálódását.

4.3 Az inzulin/mTOR, a Hh és az EGFR útvonalak szerepe a *hdc* fenotípusának kialakításában

Az inzulin/mTOR jelátviteli útvonal döntő szerepet játszik az ecetmuslica vérsejtképzésére a központi nyirokszervben. Ezen útvonal szabályozza, mind a niche méretét és aktivitását, mind pedig a progenitorok sejt-autonóm fenntartását. Működése a tápanyagbeviteltől függ (Benmimoun és mtsai., 2012). A szénhidrátban gazdag étrend az inzulin/mTOR útvonal aktivitását követően a mitokondriumok túlműködését eredményezi, amely következtében a reaktív oxigénfajták (ROS) jelennek meg (Rovenko és mtsai., 2015).

Mivel laboratóriumunk korábbi eredményei alapján az inzulin/mTOR útvonal aktivitásának gátlása - vélhetően a ROS szintjének csökkentésén keresztül - menekíti a *hdc* hematopoietikus fenotípusát a PSC-ben, megvizsgáltuk, hogy hasonló hatás megfigyelhető-e az MZ-ben is.

A vizsgálathoz a *hdcRNAi*-t és a *domeMESO* drivert hátterébe keresztezéssel bejuttattuk az *UAS-AktRNSi,* illetve *UAS-raptorRNSi* konstrukciókat. A kettős csendesített lárvákban (*hdc-Akt*, illetve *hdc-raptor*) L1 festéssel vizsgáltuk a központi nyirokszervet, illetve a keringő vérsejteket. Érdekes módon, az inzulin/mTOR vizsgált komponenseinek csendesítése az MZ-ben - a PSC-ben tapasztaltakkal ellentétben - nem menekítette a *hdc* funkcióvesztéses fenotípusát (7.ábra, Statisztika: 10.ábra).



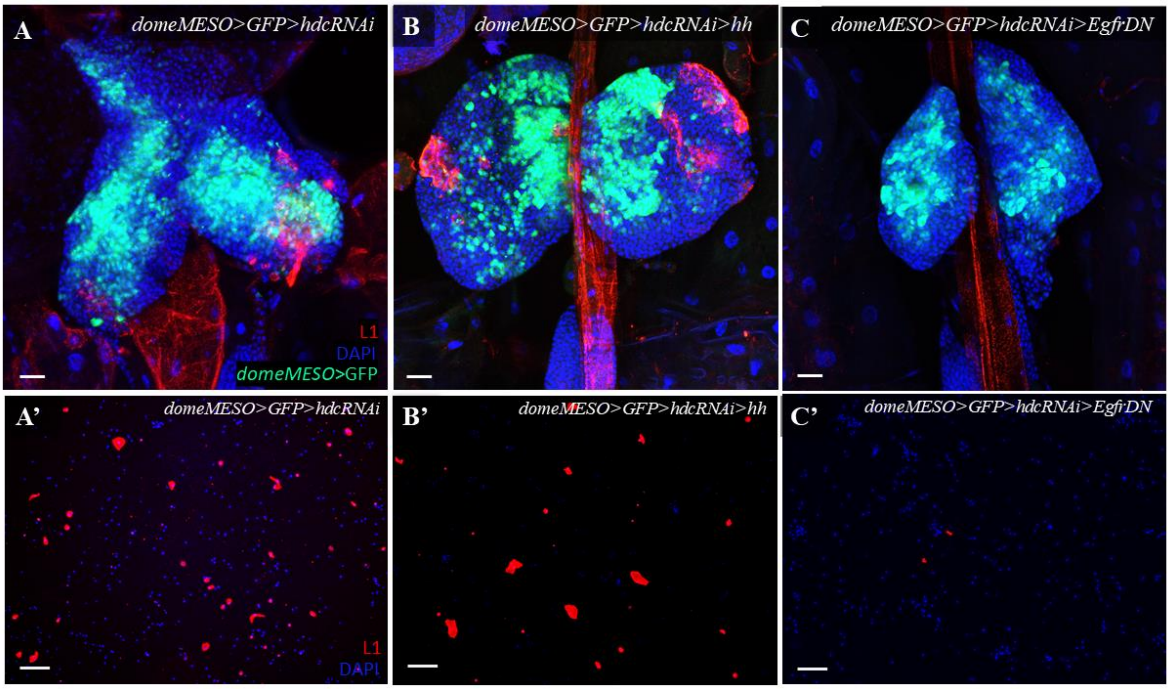
7.ábra. Az inzulin/mTOR útvonal vizsgálata *hdc* mutáns állatokban. **(A-A')** A *hdc* velőállományban történő elcsendesítésének fenotípusa. **(B-B', C-C')** Az inzulin/mTOR útvonal különböző komponenseinek (*Akt, raptor*) csendesítése nem menekíti a fenotípust. **(B-B')** Az *Akt* csendesítésekor lamellociták (pirossal) figyelhetőek meg mind a központi nyirokszervben (lamellocitát tartalmazó központi nyirokszervek százalékos aránya: 87,5% (n=8)) **(B)** mind a keringésben (lamellociták százalékos aránya: 5,37% (n=17)) **(B')**. **(C-C')** A *raptor* csendesítésekor is lamellociták (pirossal) jelennek meg a központi nyirokszervben (lamellocitát tartalmazó központi nyirokszervek százalékos aránya: 100% (n=7)) **(C)** és a keringésben (lamellociták százalékos aránya: 2,48% (n=22) **(C')**. A sejtmagokat a DAPI (kék) jelöli.
Lépték: 20 µm

A Hedgehog (Hh) a PSC-ből felszabadulva az MZ progenitorainak differenciálatlan állapotának fenntartásáért felelős. Hatását a velőállomány sejtjein lévő Patched (Ptc) transzmembrán receptorokhoz kötve fejti ki, amelyek aktiválják a Ci transzkripciós faktor. Ez utóbbi a prohemocita állapot fenntartásához szükséges expressziós mintázat kialakításáért felel (Jung és mtsai, 2005; Yao és mtsai, 2006; Mandal és mtsai, 2007). A *hh* túltermelése a PSC-ben menekítette a hdc mutáns fenotípust (Varga és mtsai., 2019).

Az jelátviteli útvonal aktiválásának hatását a MZ-ben is megvizsgáltuk. A *domeMESO>hdcRNSi* állatokat kereszteztük *UAS-hh* ecetmuslicákkal, majd az utód lárvák központi nyirokszervét és keringését az előzőekhez hasonlóan, L1 festéssel vizsgáltuk. A *domeMESO>hdcRNSi* kontrollhoz viszonyítva - a PSC-ben tapasztaltakkal ellentétben - a Hh túltermelése nem menekítette a lamellocita fenotípust (8.ábra, Statisztika: 10.ábra).

A továbbiakban - az előző kísérletek során alkalmazott módszerrel - megvizsgáltuk az EGF (epidermális növekedési faktor) jelátviteli útvonal szerepét is a *hdc* fenotípusának kialakulása során. Az EGFR jelátviteli útvonal szerepet játszik a progenitorok fenntartásában a velőállományban. Parazitoid darázsfertőzést követően a PSC-ből szekretálódó liganduma, a SPITZ aktiválja az MZ-ben kifejeződő receptort, ami lamellociták differenciálódásához vezet. Ez a fenotípus menekíthető az EGFR csendesítésével (Sinenko és mtsai., 2011).

Az EGFR jelátviteli útvonal vizsgálatához a *domeMESO>hdcRNSi* transzgéneket az *egfr* receptor domináns negatív variációját kódoló *UAS-EgfrDN* transzgénnel kombináltuk. A lárvák keringését és központi nyirokszervét megvizsgálva nem tapasztaltunk lamellocita differenciálódást a kontrollhoz képest. Ebből arra következtettünk, hogy az EGFR útvonal gátlása sikeresen menekíti a *hdc* fenotípust (8.ábra, Statisztika: 10.ábra).



8.ábra. A *hh* jelátviteli útvonal aktiválása nem, az *Egfr* gátlása azonban sikeresen menekíti a *hdc* fenotípusát. **(A-A')** A *hdc* velőállományban történő csendesítésének fenotípusa. **(B-B')** A *hh* túltermelése nem gátolja a lamellociták (pirossal) differenciálódását sem a központi nyirokszervben (lamellocitát tartalmazó központi nyirokszervek százalékos aránya: 100% (n=6)) **(B)** sem a keringésben (lamellociták százalékos aránya: 3,19% n=21)) **(B')**. **(C-C')** Az *Egfr* jelátviteli útvonal gátlása esetén nem tapasztalható lamellocita (pirossal) differenciálódás sem a központi nyirokszervben (lamellocitát tartalmazó központi nyirokszervek százalékos aránya: 0% (n=8)) **(C)**, sem pedig a keringésben (lamellociták százalékos aránya: 0% (n=24)) **(C')**. A sejtmagokat a DAPI (kék) jelöli.
Lépték: 20 µm

A kapott eredmények alapján a *hdc* MZ-ban megfigyelt funkció vesztéses fenotípusa - a PSC-ben tapasztaltaktól eltérően - nem kapcsolható sem az inzulin/mTOR, sem a Hh jelátviteli útvonalak hibás működéséhez. Az inzulin/mTOR gátlása esetében a hatás elmaradásának azonban elképzelhető egy másik magyarázata is. Ismert, hogy a progenitorok nagyon érzékenyek ezen útvonal aktivitásának változására, így lehetséges, hogy az útvonal gátlása a *hdc* hatásától függetlenül lamellocita differenciálódáshoz vezet, így az esetleges kompenzáló hatás nem érvényesül (Shim és mtsai., 2012; Benmimoun és mtsai., 2012). Annak vizsgálatára, hogy a ROS megemelkedett szintjének hatását az inzulin/mTOR útvonal működése közvetíti-e vagy sem, a jövőben olyan ellenanyagokat fogunk használni (foszfoAKT és foszfo s6k) a központi nyirokszervben végzett immunfestésekhez, amelyek az inzulin útvonal aktivitásának riportereiként szolgálnak.

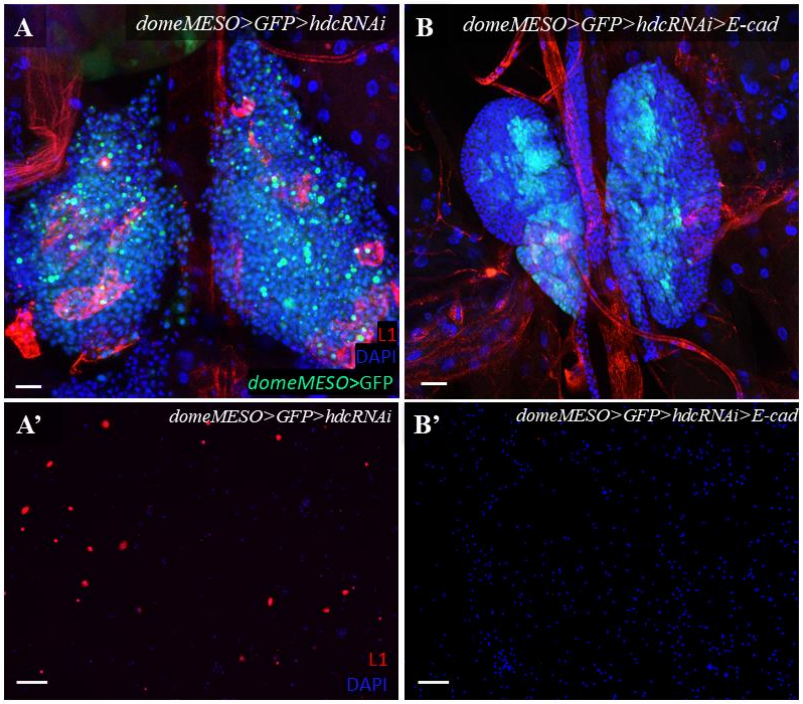
A *hh* túltermelése sem menekítette a *hdc* fenotípust a PSC-ben tapasztaltakhoz képest. Ennek oka feltételezhetően az, hogy a Hh, csak a PSC-n keresztül – nem sejt-autonóm módon - képes kifejteni hatását az MZ sejtjeire.

Az EGFR jelátviteli út gátlása azonban sikeresen menekítette a *hdc* fenotípusát, amiből arra következtetünk, hogy a Hdc részt vehet ezen útvonal szabályozásában a velőállományban található progenitorok állapotának fenntartása során.

4.4 E-cad szerepe a progenitorok fenntartásában

Az E-cadherin (E-cad) adhéziós molekula, amely szükséges az embrionális fejlődéshez és a szövetek integritásának megőrzéséhez a szervezet élete során (Van Roy és mtsai., 2008). Kimutatták, hogy az E-cad az embrionális őssejtek pluripotenciájának megtartásáért felel (Soncin és mtsai., 2009). Ecetmuslicában a csíravonal őssejteket a cadherinek a niche-hez kötik (Song és mtsai., 2002). A progenitorok szoros kapcsolódása a velőállományban az E-cadherin által közvetített sejtadhézió eredménye. Differenciálódás során az E-cad mennyisége csökken, míg a fehérje túltermelése az őssejteket differenciálatlan állapotban tartja (Gao és mtsai, 2013).

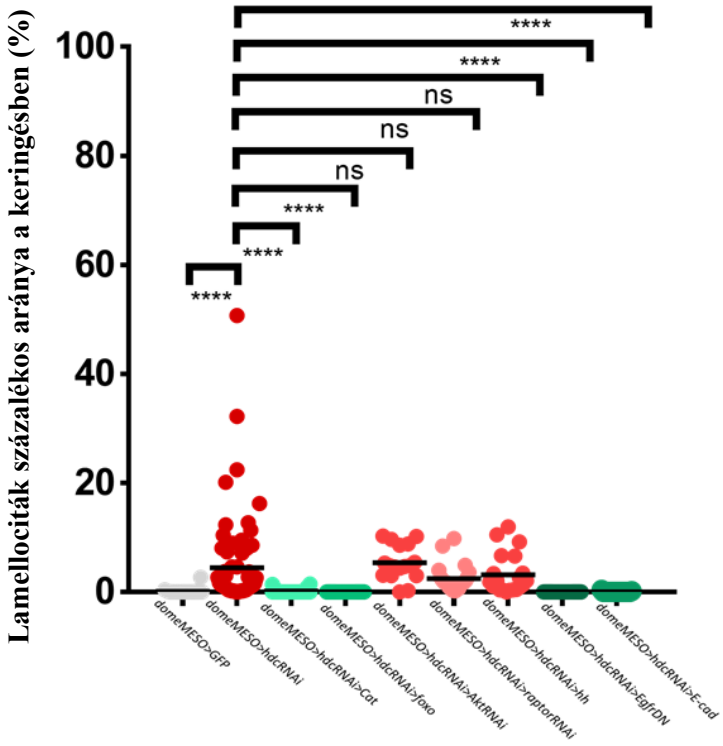
A vizsgálathoz az *UAS-E-cad* hatását vizsgáltuk *domeMESO>hdcRNAi* háttéren, a lárvák keringésének és központi nyirokszervének L1 festésével. Az *E-cad* túltermelése menekítette a *hdc* fenotípusát (9.ábra, Statisztika: 10.ábra).



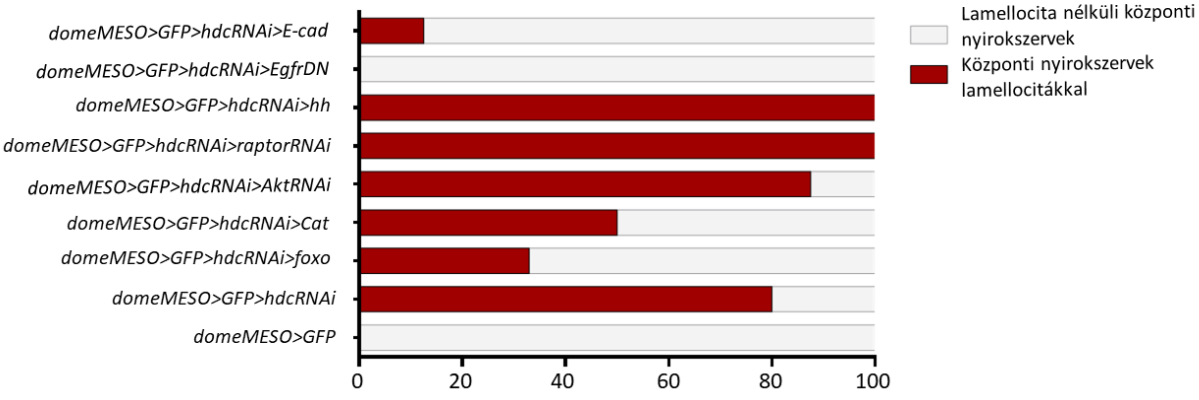
9.ábra. Az *E-cad* túltermelése menekíti a *hdc* fenotípust. **(A-A')** A *hdc* velőállományban történő elcsendesítésének fenotípusa. **(B-B')** Az *E-cad* túltermelésekor nem tapasztalható lamellocita (pirossal) differenciálódás a központi nyirokszervben (lamellocitát tartalmazó központi nyirokszervek százalékos aránya: 12,5% (n=8)) **(B)** és a keringésben (lamellociták százalékos aránya: 0,03% (n=19)) **(B')** egyaránt. A sejtmagokat a DAPI (kék) jelöli. Lépték: 20 µm

Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a velőállományban a sejtek közötti kapcsolatoknak nagy jelentősége van a progenitorok differenciálatlan állapotának megőrzésében, a fehérje túltermelése feltehetően a sejtek közötti kapcsolatok erősítése révén kompenzálja a *hdc* funkcióvesztéses fenotípusát. Korábban azt tapasztalták, hogy a megnövekedett ROS szint az *e-cad* szint csökkenéséhez vezet (Gao és mtsai., 2014), ami magyarázatot adhat kísérleti eredményeinkre. A jelenség további vizsgálatára a jövőben E-cad elleni antitestet, illetve *E-cad-GFP* transzgenikus riportert tervezünk használni.

A



B



10.ábra. Az interakciós kísérletek eredményei. **(A)** A vizsgált genotípusokban megjelenő lamellociták százalékos aránya a keringésben. Az átlagok összehasonlítását az egyes kísérleti csoportok és a megfelelő kontroll között Welches's Student T-teszttel végeztük, ahol $p < 0,05$ értékeket szignifikánsnak fogadtuk el (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). ns: nem szignifikáns **(B)** A lamellocitákkal rendelkező központi nyirokszervek százalékos aránya a különböző genotípusokban.

5 Összefoglalás

Kísérleteink során a Hdc sejt-autonóm funkcióját vizsgáltuk az ecetmuslica lárvák központi nyirokszervének velőállományában. A *hdc* gén velőállományra specifikus kifejeződésű *domeMESO* meghajtóval történő csendesítése lamellocita differenciálódást eredményezett, ami arra enged következtetni, hogy a Hdc sejt-autonóm működése szükséges a progenitorok differenciálatlan állapotának fenntartásához (4.ábra). Annak tesztelésére, hogy a Hdc funkcióját mely jelátviteli útvonalak szabályozásán keresztül látja el, létrehoztunk egy *hdcRNS*-interferenciát és a *domeMESO* meghajtó elemet egyaránt hordozó vonalat.

Hasonlóan ahhoz, ahogy a *hdc* csendesítése a ROS szint emelkedését okozza a PSC-ben (Bayan Kharrat személyes közlése), a null mutánsban emelkedett ROS szintet tapasztaltunk a teljes nyirokszervben, ami arra utal, hogy a *hdc* funkcióvesztése sejtszintű stresszhez vezet (5.ábra). Ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy a progenitorokban jelentkező magas ROS szint azok differenciálódását eredményezi, amit a Jun jelátviteli útvonal közvetít (Owusu-Ansah és mtsai, 2009) (11.ábra).

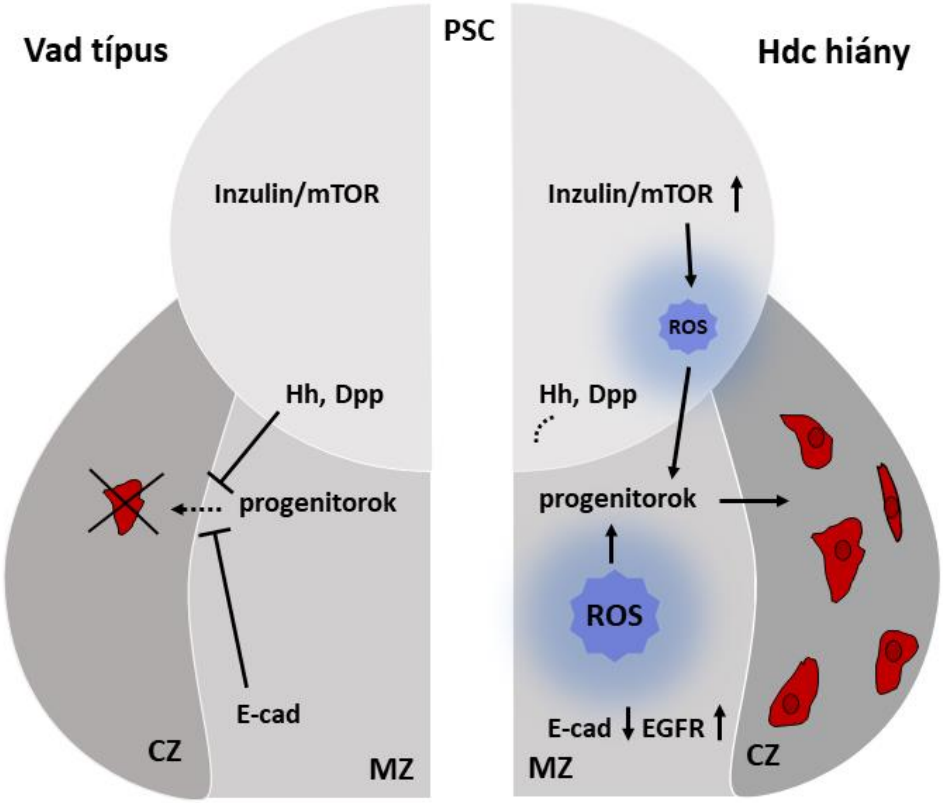
Eredményeink szerint a *Cat*, illetve a *foxo* túltermelése menekíti a *hdc* fenotípusát, mely vélhetőleg annak köszönhető, hogy - közvetlen, illetve közvetett módon - csökkentik a ROS szintjét, ami kompenzálja a *hdc* funkcióvesztésének hatását (6.ábra, 11.ábra).

Az inzulin/mTOR útvonal csendesítése - a PSC-ben megfigyeltekkel ellentétben - nem menekíti a Hdc mutáns fenotípust az MZ-ban (7.ábra). Ez magyarázható, hogy a progenitoroknak a jelátviteli út aktivitására való erős érzékenységével, ami a Hdc működésétől függetlenül lamellociták differenciálódásához vezethet (Benmimoun és mtsai, 2012) (11.ábra).

A PSC-ben tapasztaltaktól eltérően a *hh* túltermelése szintén nem menekítette a *hdc* fenotípusát (8.ábra). Ennek oka feltehetően a Hh nem sejt-autonóm működésében keresendő. Eredményeink alapján a Hh-nak a niche-ből kell szekretálódnia a progenitorok differenciálatlan állapotának fenntartásához, a progenitorok Hh termelése irreleváns (11.ábra).

Azt találtuk, hogy az EGFR jelátviteli útvonal gátlása menekíti a *hdc* mutáns fenotípusát, ami azt sugallja, hogy a Hdc az MZ-ben ezen útvonalon szabályozásába vehet részt (8.ábra, 11.ábra).

Azon eredményünk alapján, mely szerint az E-Cad túltermelése menekíti a *hdc* fenotípusát az MZ-ban, az arra következtetünk, hogy a *hdc* funkcióvesztése során megemelkedő ROS szint gyengítheti a progenitorok sejtkapcsolatait (9.ábra, 11.ábra). Ezen kapcsolatok elengedhetetlenek a differenciálatlan állapot fenntartásához (Gao és mtsai, 2013).



11.ábra. A Hdc jelenlétének és hiányának következményei a központi nyirokszervben. Vad típusban a Hdc gátolja az inzulin/mTOR jelátviteli útvonalat, illetve aktiválja a Hh és Dpp szignalizációt. Hdc mutáns állatokban azonban a megemelkedett ROS-szint a progenitorok differenciálódását okozza. A ROS megjelenéséért az inzulin/mTOR útvonal túlműködése, az EGFR útvonal aktiválódása, valamint a sejtkapcsolatok gyengülése felelős.

A TDK munkám eredményei azt sugallják, hogy a Hdc fehérje sejt-autonóm szabályozó funkciója a központi nyirokszerv velőállományában eltér a niche-ben betöltött -eddig megismert - szerepétől. A jövőbeni tervünk, hogy részletesen felderítsük a Hdc által szabályozott differenciálódási folyamatok mechanizmusait. Reméljük, hogy eredményeink mind a *Drosophila,* mind a gerinces vérsejtképző őssejt niche működésének alaposabb megértéséhez vezetnek.

6 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Honti Viktornak, hogy a csoportjában végezhettem a kutatásomhoz szükséges kísérleteket, és amiért szakmai segítségével támogatta a TDK munka elkészülését.

Köszönöm Bayan Kharratnak a kísérletek gyakorlati megvalósításában nyújtott segítségét, és a munka elkészítése során nyújtott szakmai tanácsokat.

Köszönettel tartozom a Veleszületett Immunitás Csoportnak (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetika Intézet) a rendelkezésre bocsátott ellenanyagokért.

Továbbá köszönettel tartozom a *Drosophila* Vérsejt Differenciálódás Csoport minden tagjának a közös munkáért, valamint SZBK Genetikai Intézetének.

Kutatásaink az OTKA K-131484 (HV) és 2022-2.1.1-NL-2022-00008 (Biotechnológiai Nemzeti Laboratórium) támogatásával valósultak meg.

7 Irodalomjegyzék

Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006, *124*, 783–801.

Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., Dearolf, C.R., 2003. Analysis of Rasinduced overproliferation in Drosophila hemocytes. Genetics 163, 203–215.

Avet-Rochex, A., Carvajal, N., Christoforou, C.P., Yeung, K., Maierbrugger, K.T., Hobbs, C., Lalli, G., Cagin, U., Plachot, C., McNeill, H., Bateman, J.M., 2014. Unkempt is negatively regulated by mTOR and uncouples neuronal differentiation from growth control. PLoS Genet. 10, e1004624.

Banerjee, U., Girard, J. R., Goins, L. M., & Spratford, C. M. (2019). *Drosophila* as a Genetic Model for Hematopoiesis. *Genetics*, *211*(2), 367–417.

Benmimoun B, Haenlin M and Waltzer L (2015) Haematopoietic progenitor maintenance by EBF/Collier: beyond the niche. *Cell Cycle* 14, 3517–3518.

Benmimoun B, Polesello C, Haenlin M and Waltzer L (2015) The EBF transcription factor Collier directly promotes *Drosophila* blood cell progenitor maintenance independently of the niche. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 9052–9057.

Benmimoun, B.; Polesello, C.; Waltzer, L.; Haenlin, M. Dual Role for Insulin/TOR Signaling in the Control of Hematopoietic Progenitor Maintenance in Drosophila. *Development* 2012, *139*, 1713–1717.

Binggeli, O.; Neyen, C.; Poidevin, M.; Lemaitre, B. Prophenoloxidase Activation Is Required for Survival to Microbial Infections in Drosophila. *PLoS Pathog.* 2014, *10*, e1004067.

Blanco-Obregon, D.; Katz, M.J.; Durrieu, L.; Gándara, L.; Wappner, P. Context-Specific Functions of Notch in Drosophila Blood Cell Progenitors. *Dev. Biol.* 2020, *462*, 101–115.

Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, *118*(2), 401–415.

Bretscher, A.J.; Honti, V.; Binggeli, O.; Burri, O.; Poidevin, M.; Kurucz, É.; Zsámboki, J.; Andó, I.; Lemaitre, B. The Nimrod Transmembrane Receptor Eater Is Required for Hemocyte Attachment to the Sessile Compartment in Drosophila Melanogaster. *Biol. Open* 2015, *4*, 355–363.

Brückner, K., Kockel, L., Duchek, P., Luque, C.M., Rørth, P., Perrimon, N., 2004. The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in Drosophila. Dev. Cell 7, 73–84.

Chien, C.-C., Chang, C.-C., Yang, S.-H., Chen, S.-H., Huang, C.-J., 2006. A homologue of the Drosophila headcase protein is a novel tumor marker for early-stage colorectal cancer. Oncol. Rep. 15, 919–926.

Dey, N.S.; Ramesh, P.; Chugh, M.; Mandal, S.; Mandal, L. Dpp Dependent Hematopoietic Stem Cells Give Rise to Hh Dependent Blood Progenitors in Larval Lymph Gland of Drosophila. *eLife* 2016, *5*, e18295.

Dowejko, A., Bauer, R., Bauer, K., Müller-Richter, U.D.A., Reichert, T.E., 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.

Dudzic, J.P.; Kondo, S.; Ueda, R.; Bergman, C.M.; Lemaitre, B. Drosophila Innate Immunity: Regional and Functional Specialization of Prophenoloxidases. *BMC Biol.* 2015, *13*, 81.

Evans, C. J., Hartenstein, V., & Banerjee, U. (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in Drosophila and vertebrate hematopoiesis. Developmental Cell, 5(5), 673–690.

Evans, I.R., Hu, N., Skaer, H., Wood, W., 2010. Interdependence of macrophage migration and ventral nerve cord development in Drosophila embryos. Development 137, 1625–1633.

Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature, 408(6809), 239–247.

Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., Ezekowitz, R.A., 1996. Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. Immunity 4, 431–443.

Fujita, Y., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., Nakanishi, Y., 2012. Role of NPxY motif in Drapermediated apoptotic cell clearance in Drosophila. Drug Discov Ther 6, 291–297.

Gao H, Wu X, Simon L, Fossett N. Antioxidants maintain E-cadherin levels to limit Drosophila prohemocyte differentiation. PLoS One. 2014 Sep 16;9(9):e107768

Gao, H.; Wu, X.; Fossett, N. Drosophila E-Cadherin Functions in Hematopoietic Progenitors to Maintain Multipotency and Block Differentiation. *PLoS ONE* 2013, *8*, e74684.

Gao, H.; Wu, X.; Fossett, N. Upregulation of the Drosophila Friend of GATA Gene U-Shaped by JAK/STAT Signaling Maintains Lymph Gland Prohemocyte Potency. *Mol. Cell. Biol.* 2009, *29*, 6086–6096.

Girard, J.R.; Goins, L.M.; Vuu, D.M.; Sharpley, M.S.; Spratford, C.M.; Mantri, S.R.; Banerjee, U. Paths and Pathways That Generate Cell-Type Heterogeneity and Developmental Progression in Hematopoiesis. *eLife* 2021, *10*, e67516.

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, E., 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.

Honti, V.; Csordás, G.; Kurucz, É.; Márkus, R.; Andó, I. The Cell-Mediated Immunity of Drosophila Melanogaster: Hemocyte Lineages, Immune Compartments, Microanatomy and Regulation. *Dev. Comp. Immunol.* 2014, *42*, 47–56.

Honti, V.; Kurucz, É.; Csordás, G.; Laurinyecz, B.; Márkus, R.; Andó, I. In Vivo Detection of Lamellocytes in Drosophila Melanogaster. Immunol. Lett. 2009, 126, 83–84.

Hultmark, D. Ancient Relationships. *Nature* 1994, *367*, 116–117.

Irving, P.; Ubeda, J.M.; Doucet, D.; Troxler, L.; Lagueux, M.; Zachary, D.; Hoffmann, J.A.; Hetru, C.; Meister, M. New Insights into Drosophila Larval Haemocyte Functions through Genome-Wide Analysis. *Cell. Microbiol.* 2005, *7*, 335–350.

Jung, S.H.; Evans, C.J.; Uemura, C.; Banerjee, U. The Drosophila Lymph Gland as a Developmental Model of Hematopoiesis. *Development* 2005, *132*, 2521–2533.

Jünger, M. A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J. D., Végh, M., Radimerski, T., … Hafen, E. (2003). Journal of Biology, 2(3), 20.

Kharrat B, Csordás G, Honti V. Peeling Back the Layers of Lymph Gland Structure and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(14):7767.

Kleino, A.; Silverman, N. The Drosophila IMD Pathway in the Activation of the Humoral Immune Response. *Dev. Comp. Immunol.* 2014, *42*, 25–35.

Krzemień, J.; Dubois, L.; Makki, R.; Meister, M.; Vincent, A.; Crozatier, M. Control of Blood Cell Homeostasis in Drosophila Larvae by the Posterior Signalling Centre. *Nature* 2007, *446*, 325–328.

Kurant, E., Axelrod, S., Leaman, D., Gaul, U., 2008. Six-microns-under acts upstream of Draper in the glial phagocytosis of apoptotic neurons. Cell 133, 498–509.

Kurucz, É.; Márkus, R.; Zsámboki, J.; Folkl-Medzihradszky, K.; Darula, Z.; Vilmos, P.; Udvardy, A.; Krausz, I.; Lukacsovich, T.; Gateff, E.; et al. Nimrod, a Putative Phagocytosis Receptor with EGF Repeats in Drosophila Plasmatocytes. *Curr. Biol.* 2007, *17*, 649–654.

Kurucz, É.; Váczi, B.; Márkus, R.; Laurinyecz, B.; Vilmos, P.; Zsámboki, J.; Csorba, K.; Gateff, E.; Hultmark, D.; Andó, I. Definition of Drosophila Hemocyte Subsets by Cell-Type Specific Antigens. *Acta Biol. Hung.* 2007, *58*, 95–111.

Lanot, R.; Zachary, D.; Holder, F.; Meister, M. Postembryonic Hematopoiesis in Drosophila. *Dev. Biol.* 2001, *230*, 243–257.

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

Mandal, L.; Martinez-Agosto, J.A.; Evans, C.J.; Hartenstein, V.; Banerjee, U. A Hedgehog- and Antennapedia-Dependent Niche Maintains Drosophila Haematopoietic Precursors. *Nature* 2007, *446*, 320–324.

Mikkola, H.K.A.; Orkin, S.H. The Journey of Developing Hematopoietic Stem Cells. *Development* 2006, *133*, 3733–3744.

Minakhina, S., Steward, R., 2006. Melanotic mutants in Drosophila: pathways and phenotypes. Genetics 174, 253–263.

Mondal, B.C.; Mukherjee, T.; Mandal, L.; Evans, C.J.; Sinenko, S.A.; Martinez-Agosto, J.A.; Banerjee, U. Interaction between Differentiating Cell and Niche-Derived Signals in Hematopoietic Progenitor Maintenance. *Cell* 2011, *147*, 1589.

Morrison, S.J.; Scadden, D.T. The Bone Marrow Niche for Haematopoietic Stem Cells. *Nature* 2014, *505*, 327.

Nam, H.-J.; Jang, I.-H.; Asano, T.; Lee, W.-J. Involvement of Pro-Phenoloxidase 3 in Lamellocyte-Meidated Spontaneous Melanization in Drosophila. *Mol. Cells* 2008, *26*, 606–610.

Nappi, A.J., Vass, E., 1998. Hydrogen peroxide production in immune-reactive Drosophila melanogaster. J. Parasitol. 84, 1150–1157.

Nappi, A.J.; Vass, E.; Frey, F.; Carton, Y. Superoxide Anion Generation in Drosophila during Melanotic Encapsulation of Parasites. *Eur. J. Cell Biol.* 1995, *68*, 450–456.

Nemoto, S. (2002). Redox Regulation of Forkhead Proteins Through a p66shc-Dependent Signaling Pathway. Science, 295(5564), 2450–2452.

Orr, W., & Sohal, R. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster. Science, 263(5150), 1128–1130.)

Owusu-Ansah, E., & Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. Nature, 461(7263), 537–541.

Oyallon, J., Vanzo, N., Krzemien, J., Morin-Poulard, I., Vincent, A., and Crozatier, M. (2016). Two independent functions of collier/early B cell factor in the control of drosophila blood cell homeostasis. *PLoS One* 11:e0148978.

Parsons, B., Foley, E., 2013. The Drosophila platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor-receptor related (Pvr) protein ligands Pvf2 and Pvf3 control hemocyte viability and invasive migration. J. Biol. Chem. 288, 20173–20183.

Pennetier, D.; Oyallon, J.; Morin-Poulard, I.; Dejean, S.; Vincent, A.; Crozatier, M. Size Control of the Drosophila Hematopoietic Niche by Bone Morphogenetic Protein Signaling Reveals Parallels with Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, *109*, 3389–3394.

Resende, L.P.F., Boyle, M., Tran, D., Fellner, T., Jones, D.L., 2013. Headcase promotes cell survival and niche maintenance in the Drosophila testis. PLoS ONE 8, e68026.

Rizki, T.M. Circulatory System and Associated Cells and Tissues. *Genet. Biol. Drosoph.* 1978, *2*, 397–452.

Rovenko, B. M., Kubrak, O. I., Gospodaryov, D. V., Perkhulyn, N. V., Yurkevych, I. S., Sanz, A., … Lushchak, V. I. (2015). High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in Drosophila melanogaster. Journal of Insect Physiology, 79, 42–54.

Shim, J., Mukherjee, T., & Banerjee, U. (2012). Direct sensing of systemic and nutritional signals by haematopoietic progenitors in Drosophila. *Nature cell biology*, *14*(4), 394–400.

Siekhaus, D., Haesemeyer, M., Moffitt, O., Lehmann, R., 2010. RhoL controls invasion and Rap1 localization during immune cell transmigration in Drosophila. Nat. Cell Biol. 12, 605–610.

Sinenko, S. A., Shim, J., & Banerjee, U. (2011). Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in Drosophila. *EMBO reports*, *13*(1), 83–89.

Sinenko, S.A.; Mandal, L.; Martinez-Agosto, J.A.; Banerjee, U. Dual Role of Wingless Signaling in Stem-like Hematopoietic Precursor Maintenance in Drosophila. *Dev. Cell* 2009, *16*, 756.

Soncin, F., Mohamet, L., Eckardt, D., Ritson, S., Eastham, A. M., Bobola, N., … Ward, C. M. (2009). Abrogation of E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Contact in Mouse Embryonic Stem Cells Results in Reversible LIF-Independent Self-Renewal. STEM CELLS, 27(9), 2069–2080.

Song, X. (2002). Germline Stem Cells Anchored by Adherens Junctions in the Drosophila Ovary Niches. Science, 296(5574), 1855–1857.

Spratford, C.M.; Goins, L.M.; Chi, F.; Girard, J.R.; Macias, S.N.; Ho, V.W.; Banerjee, U. Intermediate Progenitor Cells Provide a Transition between Hematopoietic Progenitors and Their Differentiated Descendants. *Development* 2021, *148*, dev200216.

Van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. Cellular and Molecular Life Sciences, 65(23), 3756–3788.

Varga, G.I.B.; Csordás, G.; Cinege, G.; Jankovics, F.; Sinka, R.; Kurucz, É.; Andó, I.; Honti, V. Headcase is a Repressor of Lamellocyte Fate in *Drosophila melanogaster*. *Genes* 2019, *10*, 173

Weaver, T.A., White, R.A., 1995. headcase, an imaginal specific gene required for adult morphogenesis in Drosophila melanogaster. Development 121, 4149–4160.

Wood, W., Faria, C., Jacinto, A., 2006. Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in Drosophila melanogaster. J. Cell Biol. 173, 405–416.

Yao, S., Lum, L., Beachy, P., 2006. The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. Cell 125, 343–357.

Zettervall, C.-J., Anderl, I., Williams, M.J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I., Hultmark, D., 2004. A directed screen for genes involved in Drosophila blood cell activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 14192–14197.

8 Tételes szerzői hozzájárulás

A 36. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Virág Nikolett** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **A Headcase fehérje funkciójának vizsgálata az ecetmuslica központi nyirokszervének velőállományában** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	**A részvétel mértéke**
UAS-hdcRNAi; domeMeso-Gal4, UAS-2xEGFP/TM6Tb törzs létrehozása	*5*
gstd-GFP-t hordozó hdc mutáns vonal létrehozása	*5*
Központi nyirokszerv preparátum készítése	*5*
Keringő vérsejtek izolálása	*5*
Mikroszkópia és képfelvétel	*5*
Az adatok statisztikai feldolgozása	*5*

Kelt: 2022.11.11.

Virág Nikolett

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Dr. Honti Viktor, tudományos főmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet