

**A veleszületett immunitás vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben**

**Ph.D. értekezés**

Kari Beáta

Témavezető: Dr. Kurucz Judit Éva

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi  
és Informatikai Kar

2016.

Szeged

<b>1. Bevezetés</b> .....	4
1.1. A <i>Drosophila</i> immunrendszere.....	4
1.2. Humorális immunválasz <i>Drosophilában</i> .....	4
1.2.1. A humorális immunválasz vizsgálata <i>Drosophilában</i> – fertőzési modellek.....	5
1.2.2. A humorális immunválasz folyamatai.....	6
1.2.2.1. Antimikrobiális peptidek termelése.....	6
1.2.2.2. Hemolimfa koaguláció.....	9
1.2.2.3. Melanizáció.....	11
1.3. Sejt-közvetítette immunválasz <i>Drosophilában</i> .....	12
1.3.1. Fagocitózis.....	15
1.3.2. Tokképzés.....	17
1.4. Inozin-monofoszfát-dehidrogenáz (IMPDH).....	20
<b>2. Célkitűzések</b> .....	22
<b>3. Anyagok és módszerek</b> .....	23
3.1. Oldatok, pufferek, anyagok.....	23
3.2. Felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek.....	23
3.3. A baktérium törzsek és a baktérium pázsit előállítása.....	24
3.4. A szeptikus sérülés kiváltására alkalmazott módszer.....	24
3.5. A kísérleti eredmények értékelése.....	25
3.6. Antibiotikum kezelés.....	25
3.7. A fagocitózis vizsgálata <i>in vitro</i> .....	25
3.8. A fagocitózis vizsgálata áramlási citometriával.....	26
3.9. Parazitoid darázzsal történő immunindukció.....	26
3.10. Az ecetmuslica és a parazitoid darázs túlélésének vizsgálata.....	26
3.11. A tokképzési reakció vizsgálata.....	27
3.12. A tokok immunfestése.....	27
3.13. A hemocitaszám meghatározása.....	27
3.14. A keringő hemociták izolálása. Indirekt immunfluoreszcencia.....	28
3.15. A filopódium képződés vizsgálata.....	28

<b>4. Eredmények</b> .....	29
4.1. A szeptikus sérülést követő immunválaszban résztvevő gének azonosításának új módszere <i>Drosophilában</i> .....	29
4.1.1. A laboratóriumi körülmények között létrehozott sérülésen keresztül a baktériumok bejutnak a <i>Drosophila</i> testüregébe.....	29
4.1.2. A steril és szeptikus sérülés hatása az <i>D. melanogaster</i> túlélésére.....	30
4.1.3. A szeptikus sérülés hatása a <i>Drosophila</i> immunválaszában szerepet játszó gének mutáns alléljait hordozó törzsek túlélésére.....	31
4.1.4. A <i>Drosophila</i> humorális immunválasza a szeptikus sérülés során a testüregébe jutó baktériumokra.....	35
4.1.5. Az antibiotikum kezelés hatása a szeptikus sérülést követő túlélésre.....	36
4.2. A <i>raspberry</i> gén szerepének vizsgálata a <i>Drosophila melanogaster</i> immunválaszában.....	36
4.2.1. A <i>ras</i> <sup>2</sup> mutáns életképességének változása szeptikus sérülést követően.....	36
4.2.2. A <i>ras</i> <sup>2</sup> mutáns véresejtek baktérium fagocitózisa.....	38
4.2.4. A <i>raspberry</i> szerepének vizsgálata a parazitoid darázsfertőzés leküzdésében.....	39
4.2.5. A <i>raspberry</i> gén szerepe a parazitoid darázsfertőzést követő tokképzésben.....	43
4.2.6. A keringő hemociták száma és a lamellocita differenciálódás vizsgálata a <i>ras</i> <sup>2</sup> mutánsban.....	47
4.2.7. A lamellociták darázs petéhez történő kitapadásának vizsgálata a <i>ras</i> <sup>2</sup> mutánsban.....	49
4.2.8. A <i>raspberry</i> szerepe a véresejtek filopodium képzésében.....	51
<b>5. Az eredmények megvitatása</b> .....	53
<b>6. Összefoglalás</b> .....	60
<b>7. Summary</b> .....	63
<b>8. Köszönetnyilvánítás</b> .....	66
<b>9. Irodalomjegyzék</b> .....	67
<b>10. Rövidítések jegyzéke</b> .....	79

# 1. Bevezetés

## 1.1. A *Drosophila* immunrendszere

A többsejtű szervezetek folyamatosan ki vannak téve a patogén mikroorganizmusok és paraziták fertőzésének. Az immunrendszer fő feladata a patogének kiküszöbölése és a szervezet számára hasznos baktériumokkal történő együttélés biztosítása. A patogénnel szemben a veleszületett immunitás képezi az első védelmi vonalat, melynek több funkcionális egysége is megőrződött az evolúció során [Buchon és mtsai., 2014]. A veleszületett immunitás filogenetikailag konzervált elemeket tartalmaz, ezért vizsgálatában az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) az egyik leggyakrabban használt gerinctelen modellszervezet. A veleszületett immunitás két részből, a szolubilis faktorok kibocsátásán alapuló humorális immunválaszból, és az immunsejtek által végrehajtott sejt-közvetítette immunválaszból tevődik össze [Lemaitre, 2007].

A humorális immunválasz során a patogén mikroorganizmusok ellen antimikrobiális peptidek képződnek, valamint koagulációs és melanizációs folyamatok lépnek működésbe [Lemaitre, 2007]. A humorális immunitással szorosan összefügg a sejt-közvetítette immunválasz, amelynek végrehajtó elemei a *Drosophila* immunsejtjei, a hemociták. A plazmatociták a mikrobák fagocitózisát végzik. A kristálysejteknek alapvető szerepe van a sebgyógyulás és a tokképzés során végbemenő melanizációs folyamatokban. Lárvában, a parazitoid fürkészdarazsak fertőzését követően egy harmadik véresejt-típus, a lamellocita differenciálódik, amely a plazmatocitákkal és kristálysejtekkel együtt többrétegű tokot képez a darázspete körül [Ferrandon és mtsai., 1998; Ulvila és mtsai., 2011; Mortimer, 2013]. A veleszületett immunválasz két fontos jellemzője az immunmemória hiánya, valamint a gyorsaság, mivel közvetlenül a fertőzést követően működésbe lép.

## 1.2. Humorális immunválasz *Drosophilában*

A *Drosophila* természetes élőhelye mikroorganizmusokban különösen gazdag, ezért a kórokozók általában a tápcsatormán, a trachea rendszeren illetve a sérült kutikulán keresztül jutnak az ecetmuslica szervezetébe [Ferrandon és mtsai., 2007]. A táplálékkal az emésztőrendszerbe kerülő mikroorganizmusokat különböző enzimek (pl. a lizozim), a

légzőnyílásokon behatoló kórokozókat pedig a hámsejtek által termelt antimikrobiális peptidek támadják. A patogénekkal szemben az első, mechanikai védelmi vonalat a testet borító kitin kutikula képezi. Sérülése esetén a betolakodók először lokális immunválaszt váltanak ki. A sérülés helyén gyülekező vérsejtek antimikrobiális peptideket (AMP) termelnek, valamint megindítják a hemolimfában zajló, a sebgyógyulásban nélkülözhetetlen koagulációs és melanizációs láncreakciókat [Nehme és mtsai., 2007; Stramer és Dionne, 2014; Tang, 2009; Theopold és mtsai., 2014]. A lokálisan zajló immunreakciók sok esetben leküzdik a fertőzést, azonban ha ez nem jár sikerrel, a kórokozókkal szemben szisztémás immunválasz jön létre. A szisztémás immunválasz során a hemociták általi sejt-közvetítette folyamatok szoros együttműködésben zajlanak a humorális immunválasz folyamataival [Ferrandon és mtsai., 1998, 2007].

### **1.2.1. A humorális immunválasz vizsgálata *Drosophilában* – fertőzési modellek**

A humorális immunválasz tanulmányozására különböző fertőzési modelleket dolgoztak ki, amelyek természetes úton történő (tápcsatorna, trachea) fertőzésen, illetve szeptikus sérülésen alapszanak [Nehme és mtsai., 2007; Akhouayri és mtsai., 2011; Neyen és mtsai., 2014]. A tápcsatorna epitéliumán a szervezetbe jutó mikroorganizmusok ellen kialakuló immunválasz tanulmányozása során, a fertőzést megelőzően a kísérleti állatokat éheztetik, utána baktériumokat tartalmazó fiolákba helyezik, majd meghatározzák az egyedek túlélési arányát. *Erwinia carotovora ssp. carotovora* és *Pseudomonas entomophila* baktériumokkal a tápcsatornán keresztül történő fertőzést követően, a humorális immunválasz elemeit kódoló gének aktiválódását figyelték meg (lipázok, peroxidázok, szerin proteázok, szerpinek) [Vodovar és mtsai., 2005]. *Serratia marcescens* Db11 baktériummal történő fertőzést követően lokálisan a bélben antimikrobiális peptidek termelődését tapasztalták, míg a tápcsatorna falán át a testüregbe jutott baktériumokat fagocita sejtek kebelezték be [Nehme és mtsai., 2007].

Laboratóriumi körülmények között az *ecetmuslica* szeptikus sérülését általában úgy váltják ki, hogy tömény baktérium szuszpenzióba mártott tűvel vagy mikropillárisal szúrják be a baktériumokat a kifejlett *ecetmuslicák* testüregébe a torlemezek találkozásánál. Ezt követően vizsgálják túlélésüket. Mikropillárisal történő fertőzés esetén a bejuttatott baktériumok mennyisége jól kontrollálható, viszont a tűnél nagyobb méretű sérülést okoz, ami erősebb melanizációs reakciót vált ki és az állatok gyógyulása is lassabb [Lemaitre és mtsai.,

1997]. Ugyanakkor ezek a módszerek lehetővé teszik a különböző patogének virulencia faktorainak azonosítását és a gazdaszervezet védekezési mechanizmusában szerepet játszó faktorok tanulmányozását is. A mechanikai sérülések azonban önmagukban is sokszor az egyed pusztulásához vezetnek, és nem modellezik a természetben előforduló sérülések során kialakuló sebeken keresztüli fertőzést akadályozó alvadási és egyéb sebgyógyulási folyamatokat.

Gombákkal történő fertőzés esetén a spórákat, a baktériumokhoz hasonlóan, tüvel szűrik az állatok testébe. A sporuláló entomopatogén gombák esetében, mint például a *Beauveria bassiana*, a széndioxiddal altatott ecetmuslicákat a gombaspórát tartalmazó lemezen rázogatják, amíg a testfelületüket a spórák egyenletesen befedik. A gombaspórák, csírázásuk során, az ép kutikulán keresztül hifákat növesztenek az állatok testüregébe [Tzou és mtsai., 2002; Lemaitre és mtsai., 1997].

Az ecetmuslica, *in vivo* vizsgálatokra alkalmas modellszervezetként, a szeptikus sérülést követő túlélésben szerepet játszó faktorok azonosítására is felhasználható. Ez mutáns vonalak egyedek túlélési arányának meghatározásával végezhető el. Az egyedek fertőzést követő túlélését nagyban befolyásolja az állatok genotípusa, az alkalmazott baktériumok virulenciája és a fertőzést okozó mikroorganizmusok csíraszama, valamint a fertőzést kiváltó különböző módszerek minősége és reprodukálhatósága.

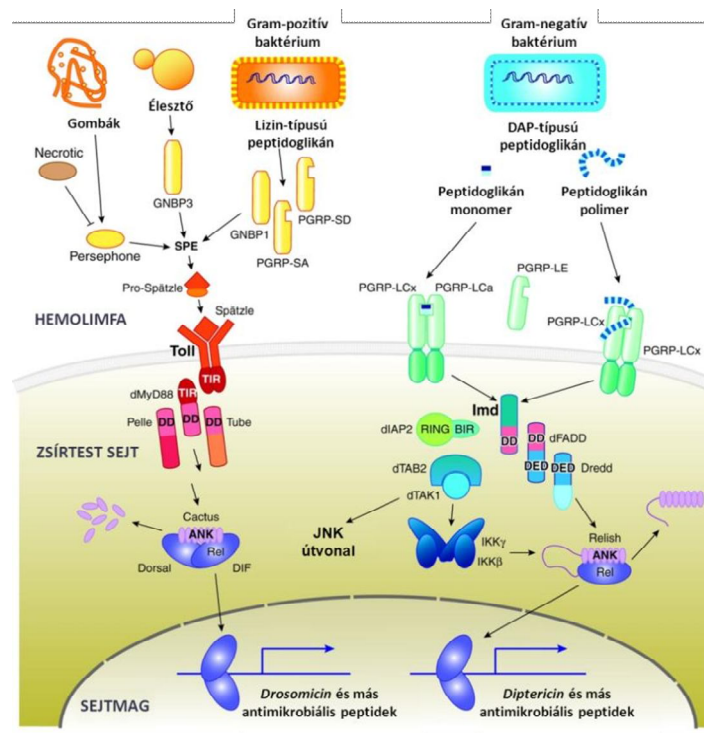
## **1.2.2. A humorális immunválasz folyamatai**

### **1.2.2.1. Antimikrobiális peptidok termelése**

A kitin kutikula sérülése következtében kórokozók kerülhetnek a szervezetbe, melyek lokális immunválaszt váltanak ki. Ennek során a trachea és a tápcsatorna hámsejtjei, valamint a sérülés helyére toborzódó vérsejtek antimikrobiális peptidok termelésével, a fagocita vérsejtek pedig bekebelezéssel pusztítják a patogéneket [Ferrandon és mtsai., 2007; Nehme és mtsai., 2007; Akhouayri és mtsai., 2011].

A lokális immunreakciókat túlélő baktériumok a testüregbe jutva szisztémás immunválaszt váltanak ki. Ennek során a zsírtestben antimikrobiális peptidok (AMP) termelődnek, melyek a hemolimfába szekretálódnak és napokig védelmet nyújthatnak az

újrafertőződés ellen [Boman és mtsai., 1972]. A hemolimfában legalább húsz féle AMP-t azonosítottak, melyeknek támadáspontja a bakteriális sejtmembrán, ahol ioncsatornához hasonló szerkezeteket hoznak létre és felborítják a kórokozók ionegyensúlyát, vagy rendszertelen beépülésükkel szétzilálják a sejtmembrán szerkezetét [Sharma és mtsai., 2015]. Az ioncsatornák általános biológiai szerepe miatt az antimikrobiális peptidekkel szemben ritkán alakul ki rezisztencia [Méndez-Samperio, 2014]. *Drosophilában* a fertőzést követő AMP szintézist a Dorsal, Dif és Relish NF- $\kappa$ B-szerű transzkripciós faktorok szabályozzák két különböző jelátviteli útvonalon keresztül, melyek a Toll és az Immune deficiency (Imd) jelátviteli útvonalak (3. Ábra) [Engstrom és mtsai., 1993; Ip és mtsai., 1993; Dushay és mtsai., 1996; Lemaitre és Hoffman, 2007].



**3. Ábra.** Immungének transzkripciójának szabályozása a Toll és az Imd jelátviteli útvonalakon keresztül [Lemaitre és Hoffman, 2007 alapján]

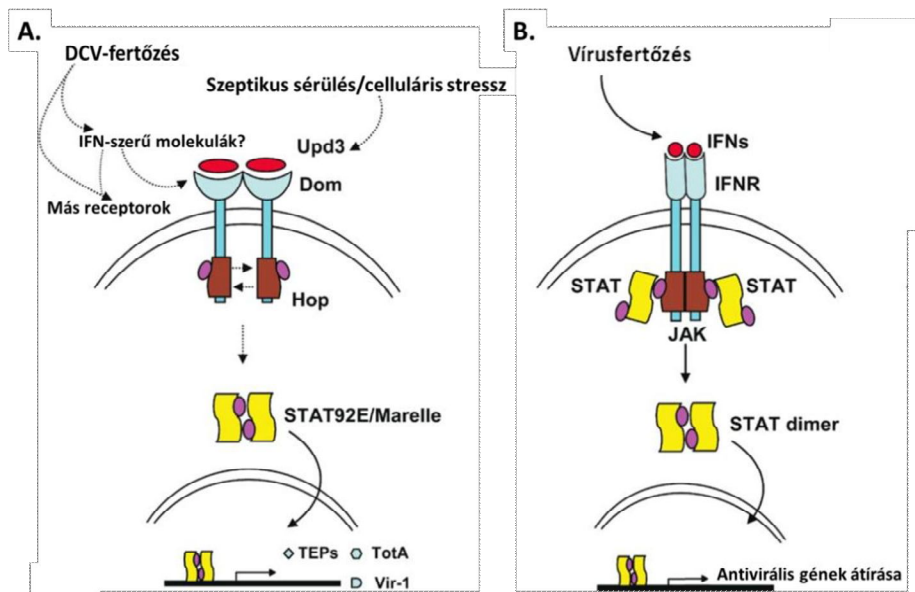
A Toll útvonal szerepét elsőként a *Drosophila* embrionális fejlődése során, a hát-hasi (dorsoventralis) tengely kialakításában írták le [Anderson és Nüsslein-Volhard, 1984]. Az immunválasz során a Toll jelátviteli útvonalat többnyire a Gram-pozitív, lizin-típusú

peptidoglikánnal rendelkező baktériumok, valamint a gombák aktiválják (3. Ábra). A Toll jelátviteli útvonal kiindulási komponense egy proteolitikus kaszkád során hasítódó citokin-szerű molekula, a Spätzle [Arnot és mtsai., 2010], melynek kötődése következtében a Toll receptor dimerizálódik [Schneider és mtsai., 1994]. A dimerizált citoplazmatikus doménhez a MyD88 adaptor fehérje kötődik, amely lehetővé teszi a Tube molekula és a Pelle kináz kötődését. Ez a jelátviteli egység foszforilálja és eltávolítja a Dorsal fehérjéhez kapcsolódó Cactus molekulát, ezáltal felszínre kerül a Dorsal fehérje addig elfedett NLS szekvenciája (nuclear localization signal). A Dorsal bejut a sejtmagba, és mint transzkripciós faktor antimikrobiális peptidok génjeinek átírását szabályozza. Lárzában a Dorsal fehérjével megegyező transzkripciós aktivátor szerepe van a Dif molekulának (Dorsal-related immunity factor) [Ip és mtsai., 1993], míg a kifejlett ecetmuslicában az antimikrobiális peptid gének átírásának szabályozását (pl. *drosomycin*, *defensin*) főleg a Dif molekula végzi [Meng és mtsai., 1999].

Az Imd [Georgel és mtsai., 2001] jelátviteli útvonal legfőbb aktivátorai a diaminopimelinsav-típusú (DAP-típusú) peptidoglikánok, amelyek a Gram-negatív, valamint a *Bacillus* és *Listeria* génuszba tartozó Gram-pozitív baktériumok sejtfalának alkotó elemei (3. Ábra) [Leulier és mtsai., 2003; Neyen és mtsai., 2012]. Az Imd útvonalat a Peptidoglycan-recognition protein-LC (PGRP-LC) transzmembrán receptor aktiválja, az ún. halál-domént tartalmazó Imd adaptor fehérje közreműködésével. Az Imd molekula jelátviteli felületként működik, szabályozza a Relish fehérje foszforilációját, valamint a kaspáz homológ Dredd fehérje (Death related ced-3/Nedd2-like caspase) általi hasítását. A hasítást követően a Relish bejut a sejtmagba és transzkripciós faktorként antimikrobiális gének átírását szabályozza [Dushay és mtsai., 1996]. A folyamatban a Tak1 és TAB2 molekulák is részt vesznek, melyek szükségesek az NF- $\kappa$ B és a JNK (c-Jun N-terminális kináz) jelátviteli útvonalak aktiválásához. A JNK jelátviteli útvonal az apoptózisban, sebgyógyulásban és stresszválaszban szerepet játszó immungének átírását szabályozza [Royet és Dziarski, 2007].

Bakteriális illetve vírus fertőzést követően *Drosophilában* (4. Ábra. A) az emlősökéhez hasonló (4. Ábra. B) JAK/STAT útvonal is aktiválódik. *Drosophilában* az aktiváció során a hemociták által termelt citokin-szerű molekula, az Upd3 a JAK/STAT útvonal receptorához, a Domeless (Dome) fehérjéhez kötődik a zsírtestben és antivirális gének átírását szabályozza [Agaisse és mtsai., 2003] (4. Ábra).



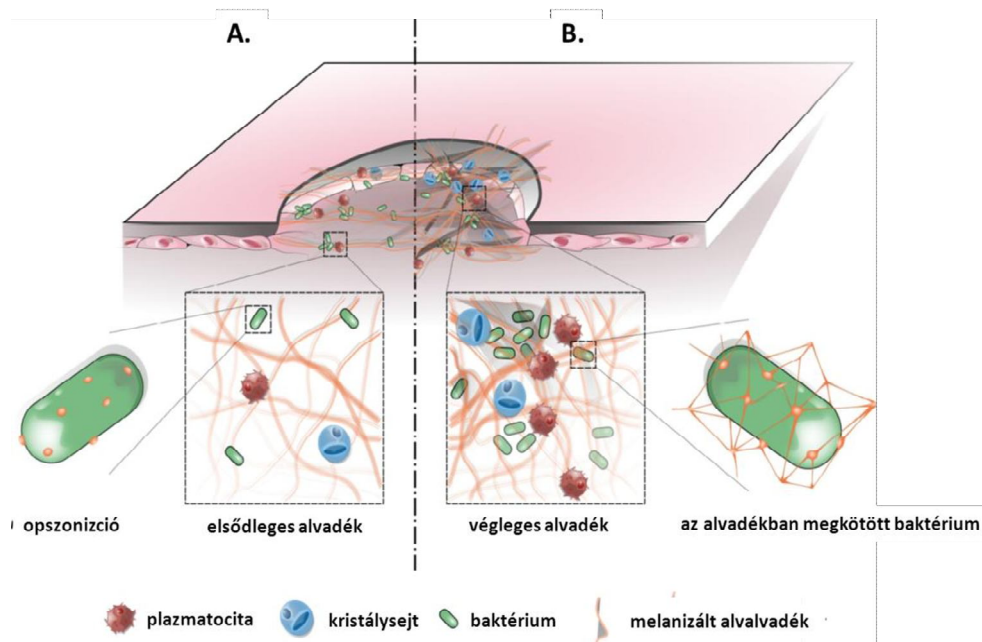


4. Ábra. A JAK/STAT jelátviteli útvonal szerepe a *Drosophila* (A) és az emlősök (B) immunválaszában [Agaïsse és mtsai., 2003 alapján].

#### 1.2.2.2. Hemolimfa koaguláció

A nyílt keringési rendszerű rovarok kutikula sérüléseinek zárása létfontosságú az egyed túlélése szempontjából. A sérülést követően aktiválódó koagulációs kaszkád reakció eredményeként, a sérülés helyén, a hemolimfa megalvad és a keletkező alvadék elzárja a sebet [Theopold és mtsai., 2014]. A koaguláció, a hemolimfa vesztés megakadályozása mellett, az immunvédekezésben is fontos szerepet tölt be, ugyanis a hálózatos szerkezetű alvadék megköti a baktériumokat és ezáltal megakadályozza azok bejutását és elszaporodását a testüregben [Bidla és mtsai., 2005 és 2009; Krautz és mtsai., 2014]. A *Drosophila* hemolimfa koagulációjában a gerincesek májával analóg szerv, a zsírtest által termelt és hemocita eredetű alvadási faktorok vesznek részt, amelyek más ízeltlábúakban pl. selyemhernyó (*Bombix mori*), atlanti törfarkú rák (*Limulus polyphemus*) azonosított alvadási faktorokkal mutatnak szerkezeti és funkcionális hasonlóságot [Iwanaga és mtsai., 1998; Theopold és mtsai., 2004; Jiravanichpaisal és mtsai., 2006; Loof és mtsai., 2011]. A hemolimfa alvadékban legnagyobb mennyiségben a fagocitáló vörsejtek, a plazmatociták által termelt Hemoelectin fehérje, amely az emberi XIIIa/von Willebrand véralvadási faktor homológja, valamint a transzglutamináz enzim és annak szubsztrátja a Fondue molekula van jelen [Goto és mtsai., 2001; Lesh és mtsai., 2007; Lindgren

és mtsai., 2008]. Az alvadékban többek között kis mennyiségben kimutatták a zsírtest fehérjét (fat body protein-1, FBP1), a tiggrint, a lipoforint, valamint a lárvális szérumban fehérjét (larval serum protein, Lsp) is [Scherfer, 2004]. A sérülést követően a hemolimfa fehérjék rövid időn belül koagulálódnak, majd a laza szerkezetű elsődleges alvadékot alkotó fehérjék között a transzglutamináz enzim keresztkötéseket létesít a fehérjék glutamin és primer aminjai között (1. Ábra. A) [Lorand és Graham, 2003; Wang és mtsai, 2010]. Alacsony transzglutamináz szint a hemolimfa baktériumkötő képességének csökkenéséhez vezet és a septicus sérülést követően csökken a túlélő lárvák aránya [Wang és mtsai., 2010].

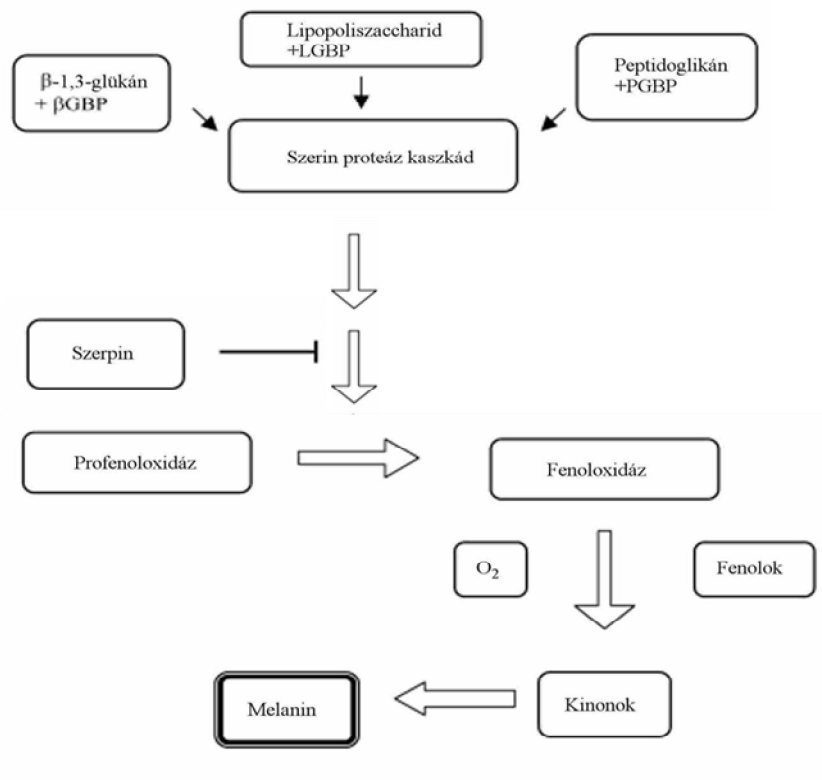


**1. Ábra. A hemolimfa koagulációja** [Theopold és mtsai., 2014 alapján]

A végleges hemolimfa alvadék a kristálysejtek citoplazmájából felszabaduló profenoloxidáz (proPO) enzim közreműködésével alakul ki, melynek során az alvadékba melanin épül be majd a keresztkötött fehérjealvadék megszilárdul (1. Ábra, B) [Bidla és mtsai., 2005; Dushay és mtsai, 2009; Kounatidis és mtsai., 2012].

### 1.2.2.3. Melanizáció

Az ízeltlábúak szeptikus sérülése, valamint a parazitoid darazsak általi fertőzés a sérülés közvetlen környezetében gyors melanin szintézist vált ki [Tang, 2009]. A melanizációs kaskád reakciót (2. Ábra) a patogénekre jellemző molekulák aktiválják. Ezek a gombákban előforduló  $\beta$ -1,3-glükánok, a baktériumok sejtfalában lévő lipopoliszacharid (LPS) és peptidoglikán (PG), valamint a sérült szövetekből felszabaduló foszfolipidek [Cerenius és mtsai, 2004; 2008]. A melanizációs kaskád kulcsenzime a profenoloxidáz, amely enzimatikus hasítást követően aktív fenoloxidázzá alakul és a fenolok kinonokká történő oxidációját katalizálja, melyek ezután melaninná polimerizálódnak és a sérülés helyén, valamint a parazitoid petéket körülvevő tokban rakódnak le (2. Ábra) [Cerenius és mtsai, 2004; 2008]. A melanizáció során citotoxikus intermedierek is képződnek, melyek mérgezőek az alvadékba ragadó mikroorganizmusok számára, ezáltal szerepet játszanak a szisztémás fertőzés megelőzésében [Eleftherianos és Revenis, 2011].



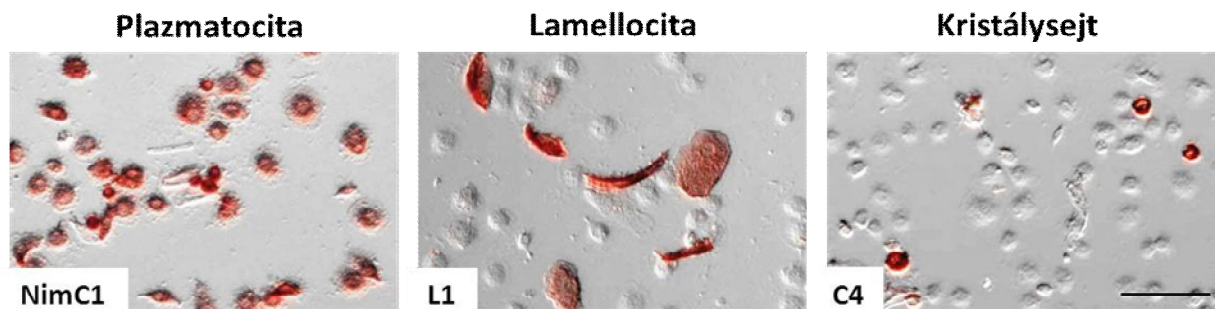
2. Ábra. Szerin proteáz-profenoloxidáz láncreakció [Cerenius és Söderhäll, 2004 alapján].

A *Drosophila* genomja három profenoloxidáz enzimet kódol. A *proPO54* gén által kódolt proPO1 és a *proPO45* gén által kódolt proPO2 a kristálysejtekben, míg a *proPO59* által kódolt proPO3 lamellocitákban fejeződik ki. A proPO1 és a proPO2 a kutikula sérülését követő melanizációban játszik szerepet [Dudzik és mtsai., 2015]. A proPO3 a lamellociták által mediált spontán melanizációs folyamatokban vehet részt a tokképzés során [Irving és mtsai., 2005; Nam és mtsai., 2008]. A *Drosophila* proPO enzimek részlegesen átfedő szereppel bírnak, mivel a parazitoid darazsak petéinek melanizálásában a proPO2 és a proPO3 is részt vesz [Dudzik és mtsai., 2015].

*Drosophilában* a proPO1 és a proPO2 a kristálysejtek szétesése során jut ki a citoplazmából; felszabadulásukat a c-Jun N-terminális kináz (JNK) szabályozza [Cerenius és mtsai., 2008]. A melanizáció során felszabaduló toxikus vegyületek a környező szöveteket is károsíthatják, ezért a kaszkád aktiválódását specifikus szerin proteáz inhibitor fehérjék, a szerpinek térben és időben szigorúan szabályozzák (2. Ábra). *Drosophilában* a legismertebb szerpin fehérje, a szerpin27A azt a profenoloxidáz aktiváló enzimet gátolja, amely az enzym kaszkád végső elemeként az inaktív profenoloxidázt aktív fenoloxidázzá alakítja, így biztosítva, hogy a toxikus melanin kizárólag a sérülés közelében termelődjön [Ligoxygakis és mtsai., 2002; DeGregorio és mtsai., 2002 Tang és mtsai., 2006]. A szerpin27A mutációja következtében a melanizáció kontroll nélkül zajlik, áttérjed a környező szövetekre és az állat pusztulásához vezet. A lárvákba történő szerpin27A molekula injektálását követően a *Leptopilina boulardi* parazitoid darazsak petéje körül nem alakul ki melanizált tok, mivel a szerpin27A nemcsak a melanizációt gátolja, hanem a plazmatociták és a lamellociták darázs peték felszínére történő kitapadását is megakadályozza [Nappi és mtsai., 2005]. Egyes patogének (pl. *Photorhabdus luminescens*) a fenoloxidáz enzimet gátló faktorok termelésével növelik túlélési esélyeiket a gazdaszervezetben (dohányszender, *Manduca sexta*) [Eleftherianos és mtsai., 2007].

### **1.3. Sejt-közvetítette immunválasz *Drosophilában***

A sejt-közvetítette immunitás végrehajtó elemei a vérsejtek - a hemociták -, amelyek morfológiai jegyeik alapján és molekuláris markerek segítségével három csoportba sorolhatóak: plazmatociták, kristálysejtek és lamellociták (5. Ábra.) [Rizki és Rizki, 1980; Kurucz és mtsai., 2007a; Kurucz és mtsai., 2003; Rus és mtsai., 2006; Vlisidou és mtsai., 2015].



**5. Ábra. A *Drosophila* lárva keringő hemocitái.** A képek bal alsó sarkában az adott vérsajtípust specifikusan felismerő ellenanyag nevét tüntettük fel. Lépték: 50  $\mu\text{m}$  [Kurucz és mtsai., 2007a alapján].

Az ecetmuslica lárva vérsajtjei, az emlősökhöz hasonlóan, különböző vérsajt kompartmentumokban helyezkednek el; a nyílt keringési rendszerben, a központi nyirokszervben (lymph gland, LG), és a szövetekhez kitapadva az ún. szesszilis szövetben. A keringésben, azaz a hemolimfában a plazmatociták és a kristálysejtek találhatóak, valamint steril sérülés, vagy parazitoid darázsfertőzést követően differenciálódó lamellociták [Márkus és mtsai., 2009; Nappi és mtsai., 2004]. A központi nyirokszerv az ecetmuslica legrészletesebben megismert vérsajt képző szöve. A szívcső elülső végén elhelyezkedő több lebenyből álló páros szerv. Medulláris állományában differenciálatlan prohemociták, kortikális régiójában pedig differenciálódott hemociták, a plazmatociták és a kristálysejtek találhatóak [Mandal és mtsai., 2004]. A szesszilis szövet (ST) a lárva teljes hosszában végighúzó, szelvényekénti sávozott mintázatú vérsajt kompartmentum, melyben plazmatociták és vérsajt prekursorok egyaránt megtalálhatók [Márkus és mtsai., 2009].

A plazmatociták kisméretű, 8-10  $\mu\text{m}$  átmérőjű, gömbölyded sejtek, a teljes vérsajt populáció közel 95%-át alkotják. Az emlősök granulocitáihoz/makrofágjaihoz hasonló szereppel bíró fagocita sejtek, bekebelezik a baktériumokat és az apoptotikus sejteket, részt vesznek a noduláció folyamatában, amely során a baktériumokkal mikroaggregátumokat képeznek, valamint antimikrobiális peptideket termelnek [Gandhe és mtsai., 2007]. Az embrionális fejlődés során a plazmatociták nélkülözhetetlenek az extracelluláris mátrix fehérjék termelésében, valamint az idegrendszer és a tápcsatorna kialakulása során képződő apoptotikus törmelék bekebelezésében [Tepass és mtsai., 1994; Defaye és mtsai., 2009; Samakovlis és mtsai., 1990; Wood és Jacinto, 2007; Martinek és mtsai., 2008]. A kristálysejtek méretüket és

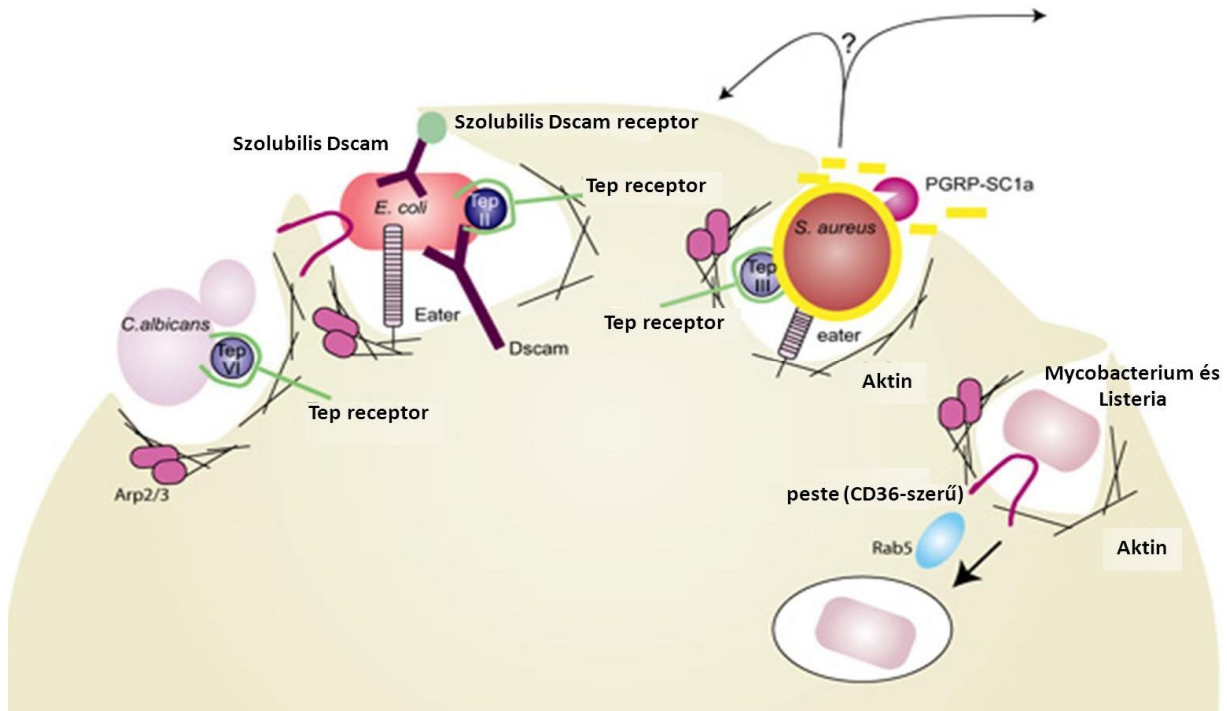
morfológiai sajátosságait tekintve a plazmatocitákhoz hasonlóak, de citoplazmájukban kristályszerű zárványokat, melanizációban és a sebgyógyulásban szerepet játszó fenoxidáz enzim zimogén formáját tartalmazzák [Rizki és Rizki, 1959; Bidla és mtsai., 2009].

A lamellociták nagy számban a parazitoid darázs fertőzést követően differenciálódnak a lárvában. Megnyúlt, lapos, nagyméretű vérsejtek, átmérőjük megközelíti a 40 µm-t. Adhezív tulajdonsággal rendelkeznek, a plazmatocitákkal együtt több rétegben körülveszik a nem fagocitálható nagyméretű testidegen részecskéket, pl. a parazitoid fűrészdarazsak petéit [Cartoon és Nappi, 1997]. A parazitoid darazsak által kiváltott vérsejt proliferációt és lamellocita differenciálódást a JAK/STAT, valamint a Toll jelátviteli útvonalnak szabályozzák [Wertheim és mtsai., 2005]. A *hemipterous* (*hep*) (JNK útvonal) illetve a *hopscotch* (*hop*) (JAK/STAT útvonal) gének hemocita specifikusan történő túltermelése esetén spontán lamellocita differenciálódást figyeltek meg immunindukció hiányában is [Zetterwall és mtsai., 2004]. Egyes tumorsuppresszor (*l(3)mbn<sup>1</sup>*) és lamellocita túltermelő (*Hop<sup>Tum1</sup>*) mutánsokban melanizálódott tumorok figyelhetők meg, amelyek a lárvális szövetek körül képzett tok, vagy a lamellociták aggregációja során keletkeznek [Harrison és mtsai., 1995; Zetterwall és mtsai., 2004].

A *Drosophila* immunsejtjeinek molekuláris szintű jellemzésére előállított monoklonális ellenanyagok [Kurucz és mtsai., 2007a], valamint egy GAL4-alapú *in vivo* sejtvonajelölő rendszer [Honti és mtsai., 2010] lehetővé tették a sejt-közvetítette immunitásban résztvevő lárvális vérsejtek leszármazási vonalainak meghatározását és a vérsejtek immunfunkcióinak minden eddigénél részletesebb megismerését. Parazitoid darázzsal (*Leptopilina boulardi* G486) történő immunindukciót követően a vérsejteken kifejeződő molekuláris markerek mintázatában megnyilvánuló időbeni változások arra utalnak, hogy a hemociták differenciálódásuk során génexpressziós változásokon mennek keresztül. A baktériumok bekebelezésére specializálódott fagocita sejtek, a plazmatociták egy alpopulációja tokképző lamellocitákká alakulhat. Ezt a átalakulást a lamellocita specifikus antigének megjelenése és a fagocita funkció elvesztése jellemzi [Honti és mtsai., 2010]. A korábban terminálisan differenciálódott vérsejteknek vélt plazmatociták plaszticitásának pontos szabályozását még nem ismerjük, a differenciálódási folyamat sejtautonóm illetve nem-sejtautonóm voltára további vizsgálatok deríthetnek fényt [Honti és mtsai., 2010; Honti és mtsai., 2014].

### 1.3.1. Fagocitózis

A fagocitózis a törzsfejlődés során konzerválódott folyamat, amely többsejtűekben nélkülözhetetlen a patogén mikroorganizmusok és az apoptotikus törmelék eltávolításához [Ulvila és mtsai., 2011]. A fagocitózis során intenzív sejtmembrán és citoszkéletális átrendeződések, valamint vezikuláris transzport folyamatok zajlanak [Shim és mtsai., 2010]. A fagocitózis első lépése a fagocitálandó részecskék felismerése és megkötése, amelyben a plazmatociták sejt felszíni receptorai vesznek részt. Ezek evolúciósan konzerváltak és a patogénekre általánosan jellemző molekuláris mintázatokat (PAMP) ismernek fel, ezért mintázat felismerő receptoroknak nevezzük őket [Kurata, 2014]. A felismert ligandok lehetnek a bakterális sejtfa esszenciális alkotóelemei, mint a lipopoliszacharid, a lipoteikolsav és a peptidoglikán vagy a gombákra specifikus  $\beta$ -1,3-glükán. A felismerést követően a fagocita sejtek a felveendő részecskéket megkötik, majd a plazmamembrán egy kis részével együtt bekebelezik (endocitózis). Ezt követően a felvett részecskék a lizoszómákban lebomlanak (6. Ábra) [Shim és mtsai., 2010; Ulvila és mtsai., 2011]. *Drosophilában* a fagocitózis receptorok szerkezetük és az általuk felismert ligand alapján több csoportba sorolhatóak (6. Ábra).



6. Ábra. A *Drosophila* fagocitózisában szerepet játszó receptormolekulák [Cherry és Silverman, 2006 alapján].

A a peptidoglikán felismerő receptorok (peptidoglycan recognition proteins, PGRP) nagyfokú filogenetikai konzerváltságot mutatnak [Yoshida és mtsai., 1996; Kang és mtsai., 1998]. Egy részük transzmembrán fehérje, másik részük szolubilis molekula, amelyek lehetnek intracellulárisak vagy a hemolimfába szekretálódnak. A PGRP-LC az *E. coli* felismerése mellett az Imd útvonalat is aktiválja. Ez a tény is rávilágít a sejt-közvetítette és a humorális immunválasz folyamatainak összehangolt működésére [Choe és mtsai., 2002; Rämét és mtsai., 2002].

Az EGF (epidermal growth factor) doménhez hasonló NIM domén tartalmú receptor fehérjék közül az Eater [Kocks és mtsai., 2005] és a NimC1 [Kurucz és mtsai., 2007b] receptorok mind a Gram-negatív mind a Gram-pozitív baktériumok felismerésében részt vesznek. A szintén NIM domént hordozó Draper fehérje a kifejlett ecetmuslicában részt vesz a *S. aureus* baktériumok fagocitózisában, valamint *Drosophila* embriókban az apoptotikus sejtek bekebelezésében [Hashimoto és mtsai., 2009; Manaka és mtsai., 2004]. A *draper* mRNS csendesítése csökkentette a hemociták *E. coli* és *S. aureus* fagocitáló képességét is [Cuttell és mtsai., 2008; Hashimoto és mtsai., 2009].

*Drosophilában* eddig két, a humán CD36-hoz hasonló receptor molekulát azonosítottak. A Croquemort (CRQ), az embrió egyedfejlődése során természetes sejthalált szenvedett sejtek eltávolításában vesz részt [Franc és mtsai., 1999; Philips és mtsai., 2005]. A Croquemort kifejlett ecetmuslicában részt vesz a *Staphylococcus aureus* felismerésében. Ez vezetett el ahhoz, hogy emlőskben is kimutatták a CD36 molekula *S. aureus* kötő képességét és közreműködését a TLR2 és TLR6 jelátviteli útvonalakban. A másik CD36-szerű molekula a Peste [Philips és mtsai., 2005], amely a sejten belül szaporodó opportunistá patogén *Mycobacterium fortuitum* megkötését végzi *Drosophilában*, és mint később kiderült, emberben is [Philips és mtsai., 2005; Stuart és mtsai., 2005].

A a peptidoglikán felismerő receptorok (peptidoglycan recognition proteins, PGRP) nagyfokú filogenetikai konzerváltságot mutatnak [Yoshida és mtsai., 1996; Kang és mtsai., 1998]. Egy részük transzmembrán fehérje, másik részük szolubilis molekula, amelyek lehetnek intracellulárisak vagy a hemolimfába szekretálódnak. A PGRP-LC az *E. coli* felismerése mellett az Imd útvonalat is aktiválja [Choe és mtsai., 2002; Rämét és mtsai., 2002].

Az immunglobulin (Ig) szupercsaládba tartozó Dscam fehérjének (Down syndrome cell adhesion molecule) is szerepe az *E. coli* felismerésében és megkötésében van szerepe. A Dscam



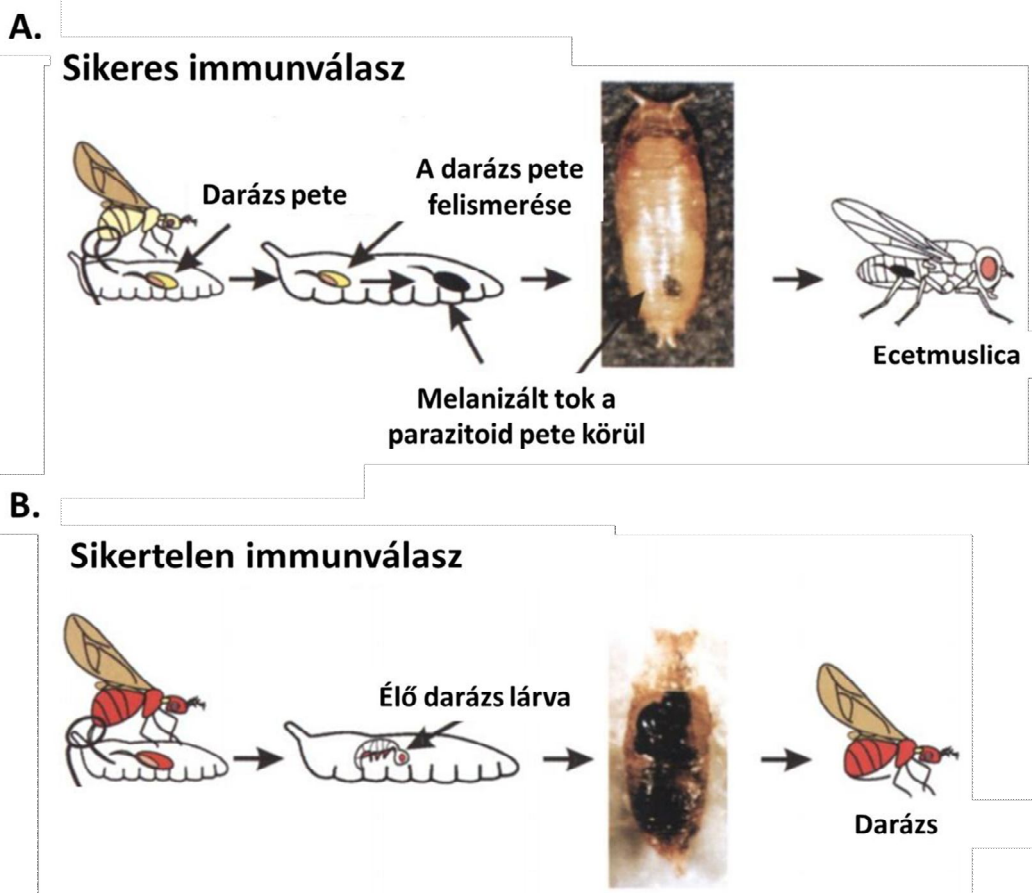
fehérje elméletileg harmincnyc-ezerféle fehérje izoformát képes létrehozni, rendkívüli diverzitását négy exonjának alternatív kivágódása biztosítja [Watson és mtsai., 2005].

A *Drosophila* TEP (thiolester-containing protein) fehérjék olyan szolubilis molekulák, melyek szintén képesek a mikroorganizmusok kötésére, részt vesznek a baktériumok és a gombák opszonizációjában, növelve a fagocitózis hatékonyságát. A TEP fehérjék a gerincesek komplement C3/ $\alpha$ 2-makroglobulin molekulákkal mutatnak szerkezeti hasonlóságokat [Lagueux és mtsai., 2000; Stroschein-Stevenson és mtsai., 2006; Bou és mtsai., 2011].

### 1.3.2. Tokképzés

A tokképzés a méretük miatt nem fagocitálható nagyobb, nem sajátként felismert részecskék elhatárolását jelenti. Ilyen idegenként felismert részecskék lehetnek a parazitoidok, illetve a megváltozott saját szövetek.

Természetes élőhelyén a *Drosophila* lárva különböző parazitoid fürkészdarazsak fertőzésének van kitéve, amelyek többnyire a lárva testüregébe helyezik petéiket, és fejlődésük során a gazdaszervezet szöveteivel táplálkoznak. Sikeres immunválasz esetén a *Drosophila* lárva a darázspetét testidegen részecskeként érzékeli és hemocitákból álló töbrétegű melanizálódott tokot képez körülötte (7. Ábra. A). Sikertelen immunválasz esetén az *ecetmuslica* bábbőréből a darázs kel ki (7. Ábra. B) [Nappi és mtsai., 2004]. A *Drosophila* tokképzése az emlősök granulóma képzéséhez hasonló folyamat [Helming és Gordon, 2009].



7. Ábra. Sikeres (A) illetve sikertelen (B) immunválasz a parazitoid darázs fertőzést követően [Nappi és mtsai., 2004 alapján].

A darázipete egy új véresejt-típus, a tokképző lamellociták differenciálódását aktiválja mindhárom véresejtkompartimentumban, a keringésben, a szesszilis szövetben, és a központi nyirokszervben [Cartoon és Nappi, 1997; Lanot és mtsai., 2001; Márkus és mtsai., 2009; Honti és mtsai., 2010; 2014]. A lamellociták a plazmatocitákkal együttműködve a tokképzés folyamatának végrehajtó sejtjei. A darázipete felismerésének molekuláris mechanizmusa még kevésbé ismert. A darázipete köré gyülekező plazmatociták kitapadnak a darázs pete korion burkára, szétterülnek annak felületén és rekeszes dezmoszómákkal (septate junction) egymáshoz kapcsolódnak. Ezt követően több rétegben lamellociták tapadnak a darázs petét beborító plazmatocita rétegre [Williams és mtsai., 2005; 2006]. A kitapadás során megváltozik a hemociták adhéziós képessége és morfológiája, citoskeletális átrendeződések mennek végbe. A véresejteken a motilitásához és az adhézióhoz szükséges plazmamembrán kitérkedések,

lamellipódiumok és filopódiumok képződnek. Ezen folyamat szabályozásában a Rho, Rac1, Rac2 és Cdc42 kis GTP-ázok vesznek részt [BurrIDGE és Wennerberg, 2004; Raftopoulou és Hall, 2004; Wertheim és mtsai., 2005; Williams és mtsai., 2005; 2006]. Mutációjuk esetén a tokképzés zavara figyelhető meg. A *Rac2<sup>d</sup>* mutáns lárvákban a plazmatociták és a lamellociták ugyan kitapadnak a darázs petére, de nem terülnek ki azok felületén és a filopódium képződésük sem megfelelő, a parazitoid pete nem melanizálódik [Williams és mtsai., 2005].

A tokképzés utolsó szakaszában aktiválódik a melanizációs kaszkád, amelynek aktiválásban a *Drosophila* kis GTP-ázok mellett a JNK jelátviteli útvonalban résztvevő *Basket* (*Bsk*) és *hemipterous* (*hep*), valamint a TNF (tumor necrosis factor) homológ Eiger is szerepet játszik [Russo és mtsai., 1996; Bidla és mtsai., 2007]. Azt is megfigyelték, hogy a melanizációs folyamatok aktiválásában a Rac2 is résztvesz, mivel a *Rac2<sup>d</sup>* null-mutánsokban sem a tok sem a hemolimfa alvadék nem melanizálódik, vagyis a Rac2 egy olyan Rho GTP-áz jelöltnek tűnik, amely az immunfolyamatok során a melanizációs kaszkád aktiválását végzi [Bidla és mtsai., 2007].

A gazdaszervezet és a paraziták, illetve parazitoidok koevolúciója során különböző virulencia faktorok és immunszuppresszív stratégiák alakultak ki. Vannak olyan parazitoid darázs fajok, amelyek a gazdaszervezet immunválaszának gátlását különböző immunszuppresszív faktorokkal végzik, melyeket a petével együtt juttatnak be a gazdaszervezet testüregébe, ezáltal elősegítik a parazitoid fejlődését és túlélését [Prévost és mtsai., 2009; Small és mtsai., 2012]. Ezek a molekulák megakadályozhatják a pete felismerését, a hemociták aktiválódását, proliferációját, differenciálódását és a különböző citotoxikus molekulák szintézisét [Small és mtsai., 2012]. Például a *Ganapsis sp. 1* parazitoid darázs a petével együtt egy SERCA-típusú Ca-pumpát (sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase) injektál a lárva testüregébe, amely a kalcium homeosztázisban játszik szerepet. Ez a citoplazmában lévő  $Ca^{2+}$  ionokat az endoplazmatikus retikulum kalcium raktáraiba juttatja, ezáltal gátlódnak a  $Ca^{2+}$ -mediálta jelátviteli folyamatok. Az alacsony citoplazmatikus  $Ca^{2+}$  szint esetében elmarad a parazitoid elleni immunválasz kialakulásához szükséges plazmatocita aktiváció, a darázs kifejlődik.

A *Leptopilina victorinae* egy másik stratégiát fejlesztett ki a gazdaszervezet immunválaszának elnyomására, toxinja a lamellociták sejt-sejt kapcsolatainak kialakulásához szükséges membrán fehérjék N-glikozilációját gátolja [Mortimer és mtsai., 2012].

A *Leptopilina heterotoma* által termelt vírusszerű részecskék (VLP-virus like particles) a lamellociták pusztulását okozzák, bejutva a lamellocitákba megváltoztatják azok morfológiáját. A kiterült lapos lamellociták helyett csökkent adhéziós képességű, elongeált, orsó alakú sejtek keletkeznek, melyek nem tapadnak ki a darázs petére és nagy részük még a bebábozódás előtt elpusztul [Ritzki és Ritzki, 1984; 1990a; 1990b; 1994].

A *Leptopilina bouhardi* virulens törzse a hemociták citoskeletális átrendeződését és a melanizációban szerepet játszó Rho-GTP-ázok működését gátló Rho-GAP homológot, a P4 fehérjét juttatja a gazda szervezetébe [Zhang és mtsai., 2004].

Az immunválasz enzimeinek, mint például a kis-GTP-ázok és a G-proteinek, működéséhez szükséges GTP két útvonalon keletkezhet, *de novo* szintézis és a menekítő útvonalakon keresztül [Hedstrom, 2009]. A *de novo* GTP szintézis egyik kulcsenzime az inozin-monofoszfát dehidrogenáz (IMPDH) enzim.

#### **1.4. Inozin-monofoszfát dehidrogenáz (IMPDH)**

Az IMPDH az inozin-monofoszfát (IMP)  $\text{NAD}^+$ -függő, xantozin monofoszfáttá (XMP) történő oxidációját katalizálja. A törzsféjlődés során konzerválódott enzim, amely minden eukariótában és a legtöbb prokariótában is megtalálható [Hedstrom, 2009]. Létfonosságú szerepe miatt az IMPDH az immunosuppresszív, antivirális és rákellenes terápiás szerek célpontja [Ratcliffe, 2006; Chen és Pankiewicz, 2007; Shu és Nair, 2008].

Katalitikus aktivitása mellett az IMPDH szekvencia-specifikus DNS-kötő transzkripciós represszorként is működik [Kozhevnikova és mtsai., 2012]. Citoplazmatikus fehérje, viszont a sejtciklus G2 fázisában, illetve replikatív vagy oxidatív stresszt követően bejut a sejtmagba és a bizonyos, a sejtproliferációhoz szükséges gének átírását gátolja [Kozhevnikova és mtsai., 2012]. Tehát, mint a guanin nukleotid bioszintézis egyik kulcsenzime és mint transzkripciós faktor, az IMPDH képes összehangolni a sejt proliferációját a sejt metabolikus állapotával [Kozhevnikova és mtsai., 2012].

A *Drosophila melanogaster* IMPDH-t a *raspberry* gén kódolja. A *Drosophila* IMPDH fehérje a Rho jelátviteli útvonal által szabályozott citokinezisben [Gregory és mtsai., 2007], valamint a fotoreceptor sejtek axon projekciójában vesz részt [Long és mtsai., 2006]. A *raspberry* génre specifikus dupla szálú RNS kezelést követően a *Drosophila* S2 sejtvonal kevésbé fagocitálta az *Escherichia coli*, a *Candida albicans* és a latex gyöngyöket [Stroschein-

Stevenson és mtsai., 2006]. *Drosophila* lárzában az IMPDH fehérje túlermelése esetében a plazmatociták felhalmozódtak a szívcső mentén, melyet a hemociták megváltozott adhéziós és migrációs képességével magyaráztak [Stofanko és mtsai., 2008].

## 2. Célkitűzések

Kísérleteink során célul tűztük ki:

1. Egy, a természetben is előforduló szeptikus sérülést imitáló modell kidolgozását, amely alkalmas a fertőzések elleni védekezésben résztvevő gének azonosítására, a mikrobák patogenitásának meghatározására és antimikrobiális szerek *in vivo* körülmények között történő tesztelésére.
2. Egy olyan modell létrehozását, amelynek eredményei reprodukálhatóak, továbbá könnyen kivitelezhető és tömeges vizsgálatokra is alkalmas.
3. A szeptikus sérülési modell validálását ismert aktivációs utak és standard baktériumtörzsek segítségével.
4. Egy irányított screen elvégzését eddig ismeretlen védekezési útvonalak azonosítására.
5. A védekező reakció - vizsgáló rendszerünk segítségével azonosított - egyik új elemének, a *Drosophila* sejt-közvetítette immunválaszában, a tokképzésben játszott szerepének jellemzését.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Oldatok, pufferek, anyagok

**Drosophila Ringer oldat:** 7,5g NaCl, 0,35g KCl, 0,21g CaCl<sub>2</sub>, 1000ml dH<sub>2</sub>O, pH 7,0

**Mounting (dermedő) fedő médium:** Flouromount G (Southern Biotech)

**DAPI:** 4'6'-diamidino-2-phenylindole (3mg/ml).

**PBS:** 0,13M NaCl, 7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3mM Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2.

**PTU:** 1-fenil-2-tiourea (Sigma-Aldrich).

**KRPMI:** RPMI 1640 szövettenyésztő tápfolyadék, 5% magzati borjúsérum (FBS-fetal bovine serum), 2 mM glutamin, 100 µg penicillin, 100 µg streptomycin.

**LB táptalaj:** 10 g triptont, 5 g élesztőkivonatot, 5g NaCl-t adtunk 1 liter desztillált vízhez, majd az oldat pH-ját 7,0-7,5-re állítottuk be NaOH-val, és autoklávoztuk. Szilárd LB táptalajhoz literenként 20 g Bacto-agart adtunk.

**AttoRho6G phalloidin:** (Sigma-Aldrich)

**Gentamicin: antibiotikum** (Sigma-Aldrich)

#### Ellenanyagok:

**NimC1 (P1):** (Kurucz és mtsai., 2007a)

**L1:** 7A6, H10/9 és 29D4 keveréke (Kurucz és mtsai., 2007a)

**L4:** 1F12 (Kurucz és mtsai., 2007a)

**C4:** (Kurucz és mtsai., 2007a)

**Alexa-488:** fluoreszcens festékekkel konjugált anti-egér Ig (1:1000) (Sigma-Aldrich)

**CF-568:** fluoreszcens festékekkel konjugált anti-egér Ig (1:1000) (Sigma-Aldrich).

#### 3.2. Felhasznált *Drosophila* törzsek

A *Drosophila* törzseket 25°C-on, standard ecetmulica táptalajon tenyésztettük, a kísérleteket 25°C-on és 29°C-on végeztük.

Kísérleteink során a következő ecetmuslica törzseket használtuk:

*Oregon-R* - vad típus

*w<sup>1118</sup>*

*spz<sup>2</sup>, ca<sup>1</sup>/TM1*

*ru<sup>1</sup>, th<sup>1</sup>, st<sup>1</sup>, kni<sup>ri-1</sup>, rn<sup>roe-1</sup>, p<sup>p</sup>, e<sup>1</sup>, spz<sup>4</sup>/TM3* [Levashina és mtsai., 1998]  
*P{EP}Dredd<sup>EP1412</sup>, w<sup>1118</sup>* [Leulier és mtsai., 2000]  
*w<sup>1118</sup>; Rel<sup>20</sup> e<sup>s</sup>* [Hedengren és mtsai., 1999]  
*w<sup>1118</sup>; PBac{WH}Hml<sup>f03374</sup>* [Exelixis] [Lesch és mtsai., 2007]  
*defensin-GFP* [Tzou és mtsai., 2000]  
*ras<sup>2</sup>*  
*Hemese-Gal4, UAS-GFP* [Zetterwall és mtsai., 2004]  
*w<sup>1118</sup>; HemolentinΔ-Gal4, UAS-2XEGFP; HemolentinΔ-Gal4 UAS-2XEGFP (Hml<sup>Turbo</sup>)*  
*Rac2<sup>A</sup>*  
*ras<sup>2</sup>; Rac2<sup>A</sup>*  
*msnF9mo-Gal4*  
*y<sup>1</sup>, sc<sup>\*</sup> v<sup>1</sup>; P{TRIP.HMC03250} attP2*  
*y<sup>1</sup>, v<sup>1</sup>; P{TRIP.JF01446} attP2*  
*lz-Gal4: w, P{GawB}lz* [Crew és mtsai., 1997]

### 3.3. A baktérium törzsek és a baktérium pázsit előállítása

A Gram-negatív *Serratia marcescens* SZMC 0567, *Escherichia coli* SZMC 0582 és a Gram-pozitív *Bacillus cereus* var. *mycooides* SZMC 0042 (Szeged Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény, Szegedi Tudományegyetem) baktériumokat éjszakán át 37 °C-on Lysogeny Broth (LB, DIFCO) médiumban tenyésztettük. A baktérium pázsit elkészítése során a hősterilizett fiolákba 2 ml 2%-os LB táptalajt öntöttünk. A megszilárdult LB médium felszínén szétszélesztettünk 20 µl baktérium szuszpenziót, majd éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. A GFP fehérjét termelő baktérium törzs a *gfp* transzgént pET vektorban hordozta (*E. coli*-GFP, BL21 (DE3) törzs).

### 3.4. A szeptikus sérülés kiváltására alkalmazott módszer

A sérülést 1-5 napos *D. melanogaster* nőstények első pár végtagja tarzális ízeinek eltávolításával idéztük elő szemsebészeti ollóval, szén-dioxidos altatásban. Fiolánként 30 sérült egyed helyezettünk az *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* illetve *Serratia marcescens* baktérium pázsitot tartalmazó fiolákba. Az állatokat standard *Drosophila* táptalajt tartalmazó fiolákra helyeztük 5 óra elteltével, majd a túlélő egyedek számát 3 napig rögzítettük. A sérülésnek az



életképességre gyakorolt hatását steril LB táptalajt tartalmazó fiolák alkalmazásával határoztuk meg. Ezt követően megvizsgáltuk a baktérium kezelésnek a nem sérült egyedek életképességére gyakorolt hatását: az egyedeket *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* illetve *Serratia marcescens* alkotta baktériumpázsitra helyeztük és a továbbiakban a sérült egyedek csoportjaihoz hasonlóan kezeltük őket.

### 3.5. A kísérleti eredmények értékelése

A túlélési görbék készítéséhez használt adatok legalább három egymástól független kísérletből származtak. A különböző kísérleti csoportokban, amelyeket különböző baktérium törzsekkel fertőztünk, legalább 100 egyed túlélését vizsgáltuk. A mutáns állatok túlélését a kontrollként használt  $w^{1118}$  egyedek túléléséhez viszonyítottuk. A kontroll és a mutáns állatok túlélésének vizsgálatát egymással párhuzamosan végeztük. A statisztikai értékelést a Microsoft Excel Student's *t*-test (nem egyenlő mintaeloszlás) programjának segítségével végeztük. A túlélési görbéket Charroux és Royet (2009) munkája alapján készítettük. A hibavonalak (error bars) a standard hibát jelölik.  $p < 0.05$  érték esetében a különbséget szignifikánsnak tekintettük.

### 3.6. Antibiotikum kezelés

A *D. melanogaster* nőstények antibiotikum kezelésének alapjául Lionakis és munkatársainak [2012] módszere szolgált. Nőstény ecetmuslicákat (csoportonként 30 egyed) 4 órán át éhezettünk üres fiolákban. Ezt követően az egyedeket 24 órára standard *Drosophila* táptalajt tartalmazó fiolákba helyeztük, amelyre száraz élesztő granulátumot szórtunk és 60 µl gentamicin (Sigma-Aldrich, 40 mg/ml) oldatot cseppentettünk. A gentamicin előkezelést követően etávolítottuk az egyedek első pár lábának tarzális ízeit, majd 5 órán át inkubáltuk *S. marcescens* alkotta baktérium pázsiton. Ezt követően az állatokat 24 órára ismét gentamicint tartalmazó fiolákra helyeztük, majd standard médiumra és három napon át rögzítettük a túlélő egyedek számát. A kontroll állatokat hasonlóan kezeltük, gentamicines kezelés nélkül. Mind a gentamicin kezelt, mind a kontroll kísérleti csoport 240 ecetmuslicát tartalmazott.

### 3.7. A fagocitózis vizsgálata *in vitro*

A véresejtek izolálásához az ecetmuslica lárvákat jégre helyezett 96 lyukú U-fenekű lemezen (Corning) és 360 µl 1-fenil-2-tioureát (PTU) tartalmazó Schneider's médiumban

bontottuk. A hemocita szuszpenzióhoz hővel előlt, FITC-tal konjugált *E. coli* baktériumsuszpenziót adtunk és 20 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A nem fagocitált baktériumok fluoreszcenciáját tripán kék oldattal kioltottuk, majd a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

### **3.8. A fagocitózis vizsgálata áramlási citometriával**

A véresejtek izolálásához az ecetmuslica lárvákat 96 lyukú U-fenekű lemezen 360 µl PTU-t tartalmazó Schneider's médiumba bontottuk. A mintákat 1 órán át inkubáltuk az elsődleges ellenanyagot tartalmazó felülúszóval, háromszor 5 percig mostuk PBS-ben, és 45 percig sötétben inkubáltuk a 0,1%-os BSA-PBS-ben hígított (1:1000) Alexa-488 (Sigma-Aldrich) másodlagos ellenanyaggal (1:1000). A PBS-ben történő háromszor 5 perces mosást követően a minták fluoreszcencia intenzitását FACSCalibur áramlási citométerrel határoztuk meg.

### **3.9. Parazitoid darázzsal történő immunindukció**

A *Drosophila* lárvák sejt-közvetítette immunválaszát *Leptopilina boulardi* G486 nőtény parazitoid darazsakkal történő fertőzéssel váltottuk ki. Az ecetmuslicákat petéztettük, majd 72 óra elteltével 50 lárvát 8 nőtény darázzsal 2 órán át inkubáltuk 25°C-on, majd a darazsakat eltávolítottuk. A lárvákat standard *Drosophila* táptalajon tartottuk 25°C-on. A *raspberry* RNS interferenciával csendesített egyedek egy részét, az RNS interferencia hatékonyságának növelése érdekében, az immunindukciót követően a bebábozódásig 29°C-on tartottuk. A lárvákat a kísérleti elrendezéstől függően különböző időpontokban vizsgáltuk. A fertőzött lárvákat a darázsszűrő helyén látható melanizált heg [Small és mtsai., 2012], vagy a lárvákban található melanizált darázs peték/tokok alapján azonosítottuk. Kontrollként darázzsal nem immunindukált, a fertőzött lárvákkal egykorú egyedeket használtunk.

### **3.10. Az ecetmuslica és a parazitoid darázs túlélésének vizsgálata**

A darázs fertőzést követően 48 órával a darázzsal szűrt lárvákat ecetmuslica táptalajt tartalmazó fiolákra helyeztük. Két nap elteltével rögzítettük a fiolákban fellelhető bábok, majd a bábokból kikelő ecetmuslicák illetve darazsak számát. A kísérleteket legalább háromszor megismételtük és genotípusonként legalább 150 egyedet vizsgáltunk.

### 3.11. A tokképzési reakció vizsgálata

A darázsszűrást követő 48 illetve 72 óra után a lárvákat 12 lyukú tárgylemezen boncoltuk és rögzítettük az élő, nem melanizált, a részlegesen melanizált és a teljesen melanizált darázslárvák számát. Meghatároztuk azoknak a tokoknak a számát, amelyeket a lamellociták lazán, illetve szorosan vettek körül. Azokat a lárvákat, amelyekben nem volt melanizált tok, vagy nem figyeltünk meg melanizált pontokat a kutikulán szintén kiboncoltuk és megvizsgáltuk, hogy van-e bennük élő darázs lárva. Ezt követően genotípusonként meghatároztuk az élő, nem melanizált darázs lárvák, illetve a részlegesen melanizált és a teljesen melanizált darázs peték számát. Meghatároztuk a fertőzöttség mértékét is, vagyis az *ecetmuslica* lárvájában lévő parazitoidok számát. Az átlag darázs lárva számot a következő képlettel számoltuk ki: átlag darázs lárva=összes darázs lárva/összes *ecetmuslica* lárva.

### 3.12. A tokok immunfestése

A *Leptopilina bouleari* G486 darázsszűrást követő 48 illetve 72 óra után a lárvákat kiboncoltuk és izoláltuk a parazitoid darázs petéket 5% magzati borjú szérumot (FBS) és PTU-t tartalmazó Schneider's médiumban, majd 5 percig mostuk PBS-ben. 12 percig fixáltuk 2%-os paraformaldehidben majd háromszor mostuk PBS-ben. A mintákat 20 percig telítettük 0,1%-os marha szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS-ben és éjszakán át 4°C-on inkubáltuk az elsődleges ellenanyagot tartalmazó hibridoma felülűszóban, majd háromszor mostuk PBS-ben. Ezután 45 percig inkubáltuk a CF-568 (Sigma-Aldrich) másodlagos ellenanyaggal (1:1000 hígítás). A sejtmagvakat 1:400 hígított DAPI-val (Sigma-Aldrich) jelöltük. A mintákat három alkalommal 5 percig mostuk PBS-ben, ezután a mintákat fedőmédiummal fedtük (Fluoromount G, SouthernBiotech) és Zeiss Axioscope 2 MOT fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

### 3.13. A hemocitaszám meghatározása

A nem immunindukált és immunindukált harmadik stádiumú vándorló lárvákat 30 µl 5% FBS-t és PTU-t tartalmazó Schneider's médiumban véreztettük. Az így kapott hemocita szuszpenziót Bürker kamrába pipettáztuk és megszámloltuk a véresejteket. Genotípusonként 8-8 lárvát használtunk a hemocita szám meghatározásához. A szignifikancia érték meghatározásához a Student's *t*-tesztet használtuk.

### 3.14. A keringő hemociták izolálása. Indirekt immunfluoreszcencia

Genotípusonként 30 állatot 96 lyukú U-fenekű lemezen 360 µl PTU-t tartalmazó Schneider's médiumban csipesszel boncoltuk, a véresejteket izoláltuk, majd a hemocita szuszpenziót 30 µl-enként szétosztottuk 12 lyukú tárgylemezre (SM-011, Hendley-Essex). Egyedi lárvák vizsgálata során az állatokat 12 lyukú tárgylemezen 30 µl PTU-t tartalmazó Schneider's médiumban véreztettük. A hemocitákat 45 percen át tapasztottuk nedves kamrában, 6 percig acetonnal fixáltuk, majd 20 percig telítettük 0,1% BSA-PBS-ben. A telített mintákat 1 órán át inkubáltuk az elsődleges ellenanyagot tartalmazó felülúszóval szobahőmérsékleten, nedves kamrában, majd háromszor 5 percig mostuk PBS-ben, és 45 percig sötétben inkubáltuk a 0,1%-os BSA-PBS-ben hígított DAPI-val és a CF-568 másodlagos ellenanyaggal. A PBS-ben történő háromszor 5 perces mosás után a mintákra fedőmédiomot cseppentettünk, mikroszkópos fedőlemezrel fedtük és Zeiss Axioskope 2 MOT fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A mikroszkópos felvételek készítése során az Axiovision 2.4 programot használtuk. A fluoreszcens képsatornákat az Adobe Photoshop programmal illesztettük egymásra.

### 3.15. A filopódium képződés vizsgálata

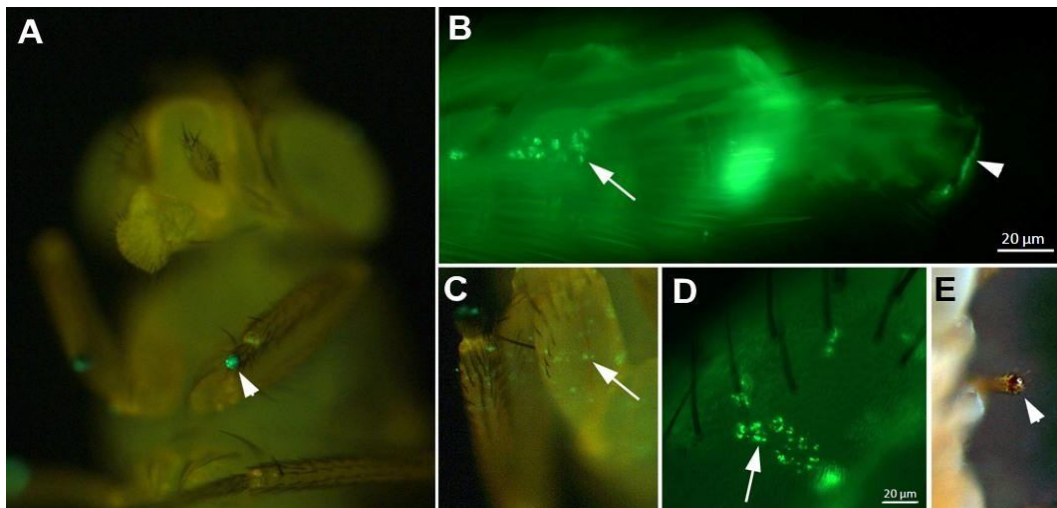
*Leptopilina bouvardi* G486 darázsszúrás követően 24 órával genotípusonként 6 lárvából véresejteket izoláltunk 12 lyukú tárgylemezen PTU-t és 5% FBS-t tartalmazó Schneider's médiumban és egy órán át nedves kamrában tapasztottuk a sejteket az üvegfelületre. Ezután a preparátumokat 12 percig 2%-os paraformaldehid-PBS-ben fixáltuk, háromszor 5 percig mostuk PBS-ben, majd 20 percig telítettük 0,1% BSA-t és 0,01% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben. Az aktin vázat 1:1000 hígított Atto Rho6G konjugált phalloidinnel jelöltük (Sigma-Aldrich) és a mintákat háromszor 5 percig mostuk PBS-ben. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük. Kontrollként az immunindukált lárvákkal egykorú nem immunindukált lárvákat használtunk. A mintákat 5 percig mostuk PBS-ben, három alkalommal. Ezután a mintákat fedőmédiummal fedtük és Zeiss Axioscope 2 MOT fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A kísérleteket legalább háromszor megismételtük. A szignifikancia érték meghatározásához a Student's *t*-test-et használtuk és a  $p < 0.05$  alatti értékeket szignifikánsnak tekintettük.

## 4. Eredmények

### 4.1. A szeptikus sérülést követő immunválaszban résztvevő gének azonosításának új módszere *Drosophilában*.

#### 4.1.1. A laboratóriumi körülmények között létrehozott sérülésen keresztül a baktériumok bejutnak a *Drosophila* testüregébe

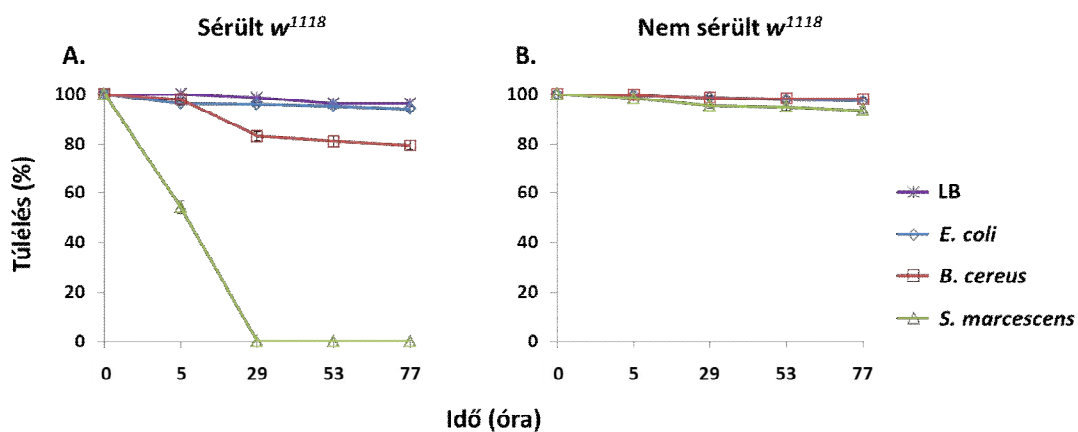
Az acetmuslica természetes élőhelyén ki van téve a patogén mikroorganizmusok fertőzésének, amelyek a tápcsatornán, illetve kisebb sérüléseken juthatnak be a testüregébe. Kísérleteink során egy olyan szeptikus sérülési módszert kívántunk kidolgozni, amely a természetben is előforduló sérülést imitálja. Ezért sérülést idéztünk elő a  $w^{1118}$  adult egyedek első pár láb tarsális ízeinek eltávolításával, majd zöld fluoreszcens fehérjét (GFP-green fluorescent protein) termelő *E. coli* baktériumpázsitra helyeztük őket. Az állatok testüregébe jutó baktériumok jelenlétét négy óra elteltével fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy a melanizált seb (8. Ábra. E, nyílhegy) felszínén (8. Ábra. A, nyílhegy), valamint a testüregben (8. Ábra. B, C, D nyilak) fluoreszcens baktériumok voltak jelen. Az ezt követő 24 óra eltelte után a sérült állatokban GFP jelet már nem észleltünk. Eredményünkből arra következtettünk, hogy a baktériumok a sérülésen keresztül bejutottak az állatok testüregébe.



8. Ábra. *E. coli*-GFP baktériumok a laboratóriumi körülmények között okozott sérülésen keresztül bejutnak a *Drosophila* testüregébe. *E. coli*-GFP baktériumok jelen vannak a sérülés helyén képződött alvadékban (A, B nyílhegyek) és a testüregben (B, C, D nyilak). A sérülés helyén képződött alvadék melanizálódása látható fényben (E nyílhegy) (Leica MZFLIII).

#### 4.1.2. A steril és szeptikus sérülés hatása az *D. melanogaster* túlélésére

Megvizsgáltuk, hogy az okozott sérülés hatással van-e az ecetmuslicák életképességére. Ezért a sérült állatokat öt órára steril LB táptalajt, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, illetve *Serratia marcescens* baktériumokat tartalmazó fiolákra helyeztük, majd három napon át rögzítettük a túlélő egyedek számát. A laboratóriumi körülmények között létrehozott lábsérülés önmagában nem befolyásolta a  $w^{1118}$  egyedek túlélését (9. Ábra. A lila), míg a az *E. coli* (9. Ábra. A kék), illetve *B. cereus* (9. Ábra. A barna) a fertőzést követő 77 óra eltelte után az állatok 93,9%-a, illetve 80,1%-a maradt életben. A *D. melanogaster*re erősen patogén *S. marcescens* baktérium fertőzés 29 órán belül az állatok pusztulását okozta (9. Ábra. A zöld). Ebből arra következtettünk, hogy a sérült és baktérium pázsitra helyezett ecetmuslicák mindegyike megfertőződött és a  $w^{1118}$  egyedek túlélésére a baktériumok patogenitása volt hatással. A sértetlen  $w^{1118}$  állatok túlélését az *E. coli* (9. Ábra. B kék) és a *B. cereus* (9. Ábra. B barna) baktériumkezelés nem befolyásolta, míg a *S. marcescens* (9. Ábra. B zöld) kezelést követő 77 óra elteltével az állatok 10%-a pusztult el. Tehát az ecetmuslicák életképességét a sérülésen keresztül bejutó baktériumok befolyásolták.



**9. Ábra.** Sérült és sértetlen  $w^{1118}$  állatok életképességének vizsgálata baktériumfertőzést követően. A sérült (A) és nem sérült (B)  $w^{1118}$  állatokat 5 órán át *E. coli* (kék), *B. cereus* (barna) illetve *S. marcescens* (zöld) baktérium pázsiton tartottuk, majd standard *Drosophila* táptalajra helyezve követtük az állatok túlélését. A kísérleteket háromszor ismételtük meg, a diagram a három kísérlet adatait foglalja össze. Minden csoport kísérletenként legalább száz egyed tartalmazott. A hibavonalak a standard hibát jelölik.

#### 4.1.3. A szeptikus sérülés hatása a *Drosophila* immunválaszában szerepet játszó gének mutáns alléljait hordozó törzsek túlélésére

A kifejlesztett szeptikus sérülési modellünk további, az immunitásban szerepet játszó gének azonosítására való alkalmazhatóságát először olyan gének mutáns alléljait hordozó ecetmuslicákon teszteltük, amelyek ismert módon játszanak szerepet a *Drosophila* immunválaszában. A szeptikus sérülési tesztben *E. coli*, *B. cereus* és *S. marcescens* fertőzést követően négy mutáns vonal egyedeinek túlélését vizsgáltuk:  $spz^2/spz^4$ ,  $Rel^{E20}$ ,  $Dredd^{E141}$  és  $Hml^{f033742}$ , kontrollként a  $w^{1118}$  törzset használtuk. A *spätzle* ( $spz^2/spz^4$ ) a Toll jelátviteli útvonalban vesz részt, a *Relish* ( $Rel^{E20}$ ) és *Death related ced-3/Nedd2-like protein* ( $Dredd^{E1412}$ ) az Imd jelátviteli útvonalban játszik szerepet. Mindhárom gén az antimikrobiális peptidek termelődését szabályozza. A negyedik vizsgált gén a vérsejtek által termelt Hemolectin fehérjét kódolja, amelynek koagulációs faktorként fontos szerepe van az ecetmuslica lárva véralvadásában [Goto és mtsai., 2001], viszont szerepe kevésbé ismert a kifejlett ecetmuslica hemolimfa koagulációjában.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a sértetlen állatok esetén az *E. coli*, *B. cereus* és *S. marcescens* baktériumkezelés nem befolyásolta szingifikánsan sem a  $w^{1118}$  kontroll, sem a vizsgált mutánsok túlélését (10. Ábra. B, D, F).

A laboratóriumi körülmények között előidézett sérülés önmagában kizárólag a hemolimfa koagulációban érintett  $Hml^{f03374}$  mutáns állatok túlélését csökkentette szignifikánsan (10. Ábra. A világoskék).

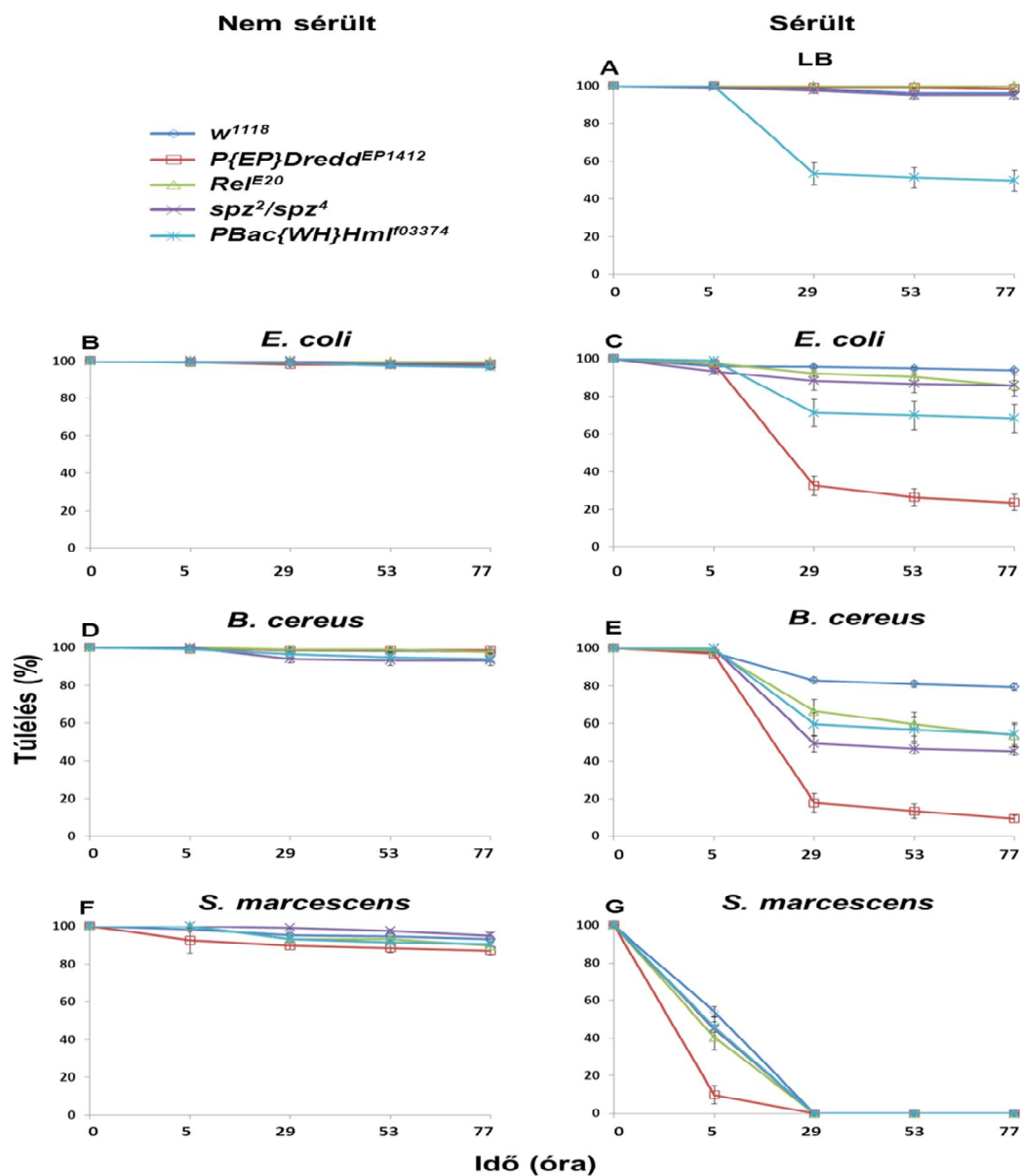
*E. coli* fertőzést követően a  $Dredd^{EP1412}$  (10. Ábra. C barna) és a  $Hml^{f03374}$  (10. Ábra. C világoskék) mutánsok életképességének szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, míg a *B. cereus* fertőzést követően a  $Dredd^{EP1412}$  (10. Ábra. E barna), a  $spz^2/spz^4$  (10. Ábra. E lila), a  $Hml^{f03374}$  (10. Ábra. E világoskék) és a  $Rel^{E20}$  (10. Ábra. E zöld) mutáns egyedek túlélése csökkent szignifikánsan.

A  $Hml^{f03374}$  mutánsok életképességét a sérülés önmagában is csökkentette, amelyet a fertőzés nem csökkentett tovább, vagyis a „vérzékenység” miatt a sérülés nagyobb hatással volt az életképességre, mint az *E. coli* vagy a *B. cereus* fertőzés, tehát a koagulációnak nemcsak a lárva, hanem a kifejlett ecetmuslica esetében is szerepe van a sérülést követő túlélésben. A  $Dredd^{EP1412}$ ,  $Rel^{E20}$  és a  $spz^2/spz^4$  mutánsok életképességét a baktérium fertőzés csökkentette,

sérülés nem, tehát az általunk kidolgozott módszer alkalmas az immunválaszban szerepet játszó új gének azonosítására, amelynek a koaguláció és az antimikrobiális peptidok termelése is fontos része. A kapott eredmény alapján arra is következtetni lehet, hogy az adott gén melyik védekezési útvonalban vesz részt.

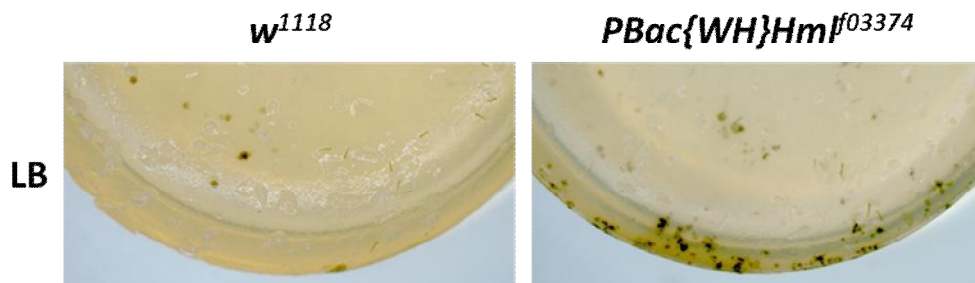
A sérülésen keresztül az állatokba jutó *S. marcescens* (10. Ábra. G) a vizsgált törzsek mindegyikében 29 órán belül az egyedek pusztulását okozta, tehát a baktérium kezelést követően minden állat megfertőződött. Mivel ugyanazt a kezelési módszert alkalmaztuk az *E. coli* és a *B. cereus* esetében is, így arra következtettünk, hogy ebben esetben is minden egyed megfertőződött és a túlélést a baktériumok patogenitása és a ecetmuslicák immunrendszerének hatékonysága befolyásolta.





10. Ábra. Vad típusú és immunitásban szerepet játszó gének mutáns alléljait hordozó állatok életképességének változása sértetlen és sérült állatokban az *E. coli*, *B. cereus* illetve *S. marcescens* fertőzést követően. A bal oldalon a sértetlen egyedek túlélési görbéit tüntettük fel *E. coli* (B), *B. cereus* (D), *S. marcescens* (F) baktérium kezelést követően. A jobb oldalon ábrázoltuk a sérült állatok túlélését steril LB táptalajon (A) illetve *E. coli* (C), *B. cereus* (E), *S. marcescens* (G) fertőzést követően. A kísérleteket háromszor ismételtük meg, a diagramok a három kísérlet adatait foglalják össze. Minden kísérleti csoport legalább száz egyed tartalmazott. A statisztikai analízist a fertőzést követően 77 órával rögzített adatok felhasználásával végeztük. A  $p < 0.05$  alatti értékeket szignifikánsnak tekintettük. A hibavonalak a standard hibát jelölik.

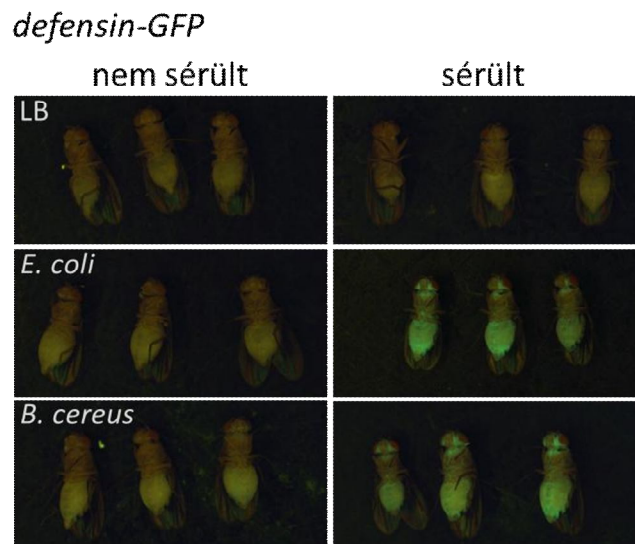
A *Hml*<sup>f03374</sup> mutáns állatok túlélési aránya csökkent steril sérülést követően, bakteriális fertőzés hiányában is. Mivel a *Hml* szerepet játszik a véralvadásban, megvizsgáltuk az ecetmuslicák hemolimfa vesztését. A laboratóriumi körülmények között előidézett sérülést követően az állatok hemolimfát veszítettek a seben keresztül, amely az állatok lábáról a táptalaj felszínére kenődött és a véralvadás során keletkező melanin fekete pontokként jelent meg az LB táptalajon. Az hemolimfa koaguláció zavara miatt a *Hml* mutánsok esetében több melanizált fekete pontot figyeltünk meg, mint a kontroll állatokban (11. Ábra). A többi mutáns esetében a hemolimfa vesztés hasonló volt a kontroll állatokéhoz.



**11. Ábra. Melanizált hemolimfa alvadék foltok az LB táptalajon.** Steril LB táptalajok, melyeken a sérült *w*<sup>1118</sup> és *Hml*<sup>f03374</sup> mutáns állatokat tartottunk 5 órán keresztül (Leica MZFLIII).

#### 4.1.4. A *Drosophila* humorális immunválasza a szeptikus sérülés során a testüregébe jutó baktériumokra

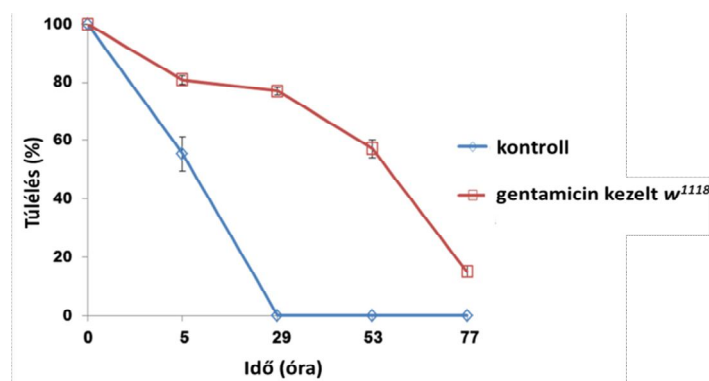
A szeptikus sérülési teszt felhasználásával megvizsgáltuk, hogy a *Drosophila* szervezetébe jutó baktériumok aktiválják-e a humorális immunválaszt. Kísérleteink során a defensin antimikrobiális peptid termelődését vizsgáltuk, amelynek szintézisét mind a Toll, mind az Imd jelátviteli útvonalat aktiváló mikroorganizmusok kiváltják. A *defensin-GFP* transzgént hordozó törzs sértetlen és sérült egyedeit 5 órán keresztül steril szilárd LB táptalajon, illetve *E. coli* és *B.cereus* baktérium pázsiton tartottuk, majd standard táptalajra helyeztük. Negyvennyolc óra elteltével azt tapasztaltuk, hogy a sérült és baktériummal fertőzött állatokban a GFP expressziója megemelkedett (12. Ábra), míg a sérülés illetve a baktériumkezelés önmagában nem idézte elő GFP jel megjelenését. A sérülésen át a testüregbe jutó baktériumok aktiválták a humorális immunválaszt, míg a sérülés önmagában illetve az intakt állatok baktérium kezelése sérülés hiányában nem váltotta ki a *defensin-GFP* transzgén átírását. A módszer alkalmas az immunválasz egyes folyamatainak (pl. antimikrobiális peptidek termelődése) és azok időbeli lefolyásának vizsgálatára.



12. Ábra. A *defensin-GFP* kifejeződése nem sérült illetve sérült ecetmuslicákban *E. coli* illetve *B. cereus* fertőzést követően (Leica MZFLIII).

#### 4.1.5. Az antibiotikum kezelés hatása a szeptikus sérülést követő túlélésre

*S. marcescens* fertőzést követően az ecetmuslicák letalitása 100%-os volt. Megvizsgáltuk, hogy antibiotikum elő- illetve utókezelés hatására változik-e az ecetmuslicák túlélési aránya *S. marcescens* fertőzést követően. A  $w^{1118}$  állatokat gentamicin antibiotikummal előkezeltük, majd a sérülést követően *S. marcescens* baktériummal fertőztük. Egy második gentamicines kezelést követően naponta rögzítettük a túlélő egyedek számát. Azt tapasztaltuk, hogy a gentamicin kezelés pozitív hatással volt az állatok életképességére, hatására lelassult az állatok pusztulása. Többségük 77 óra elteltével pusztult el, míg kezelés hiányában 29 órán belül. (13. Ábra). A módszer alkalmas különböző anyagok antimikrobiális hatásának és bakteriális virulencia faktorok tesztelésére.



13. Ábra. Gentamicin kezelt illetve kontroll egyedek életképességének vizsgálata *S. marcescens* fertőzést követően. Mind a gentamicin kezelt mind a kontroll csoportban 240-240 egyed életképességét vizsgáltuk. A hibavonalak a standard hibát jelölik.

## 4.2. A raspberry gén szerepének vizsgálata a *Drosophila melanogaster* immunválaszában.

### 4.2.1. A $ras^2$ mutáns életképességének változása szeptikus sérülést követően

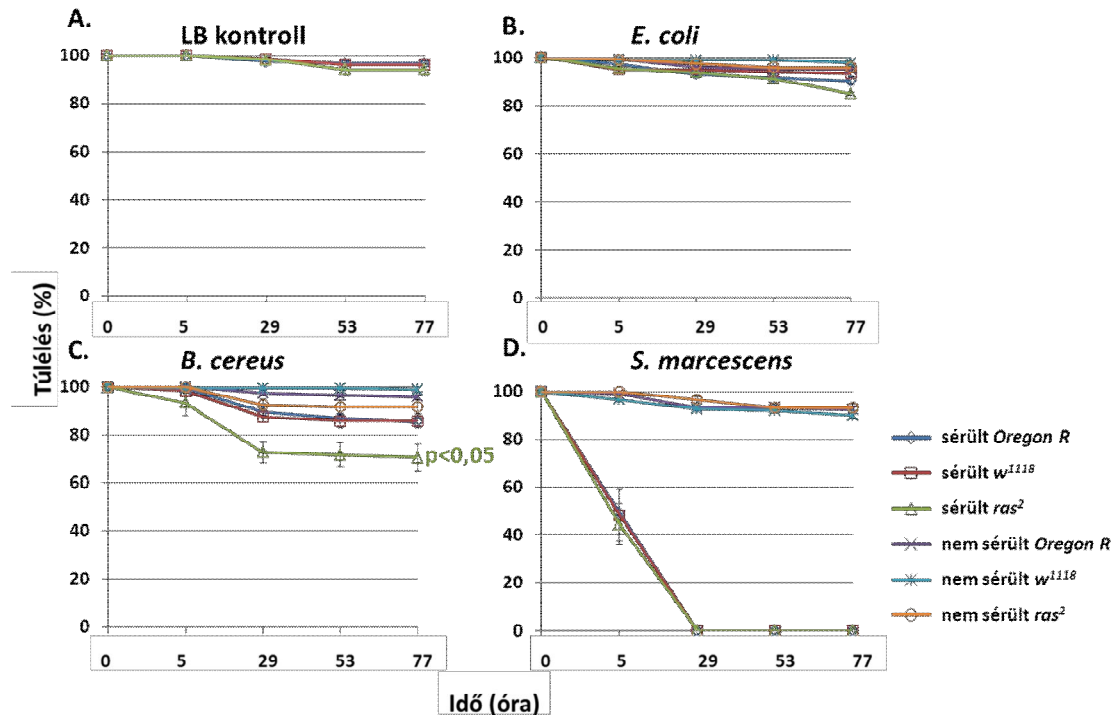
Egy irányított screen keretében olyan gének mutáns alléljait hordozó egyedek életképességét vizsgáltuk szeptikus sérülést követően, amelyeknek irodalmi adatok, illetve szekvencia homológiák alapján szerepük lehet a bakteriális fertőzések leküzdésében.

A feltehetően a koagulációban és a sebgyógyulási folyamatokban részt vevő gének közül a *scramblase 1* (*scrambl1*<sup>EY07744</sup>), a *multicopper oxidase 3*, (*MCO3*<sup>C359</sup>) gének mutáns alléljait

hordozó állatok életképessége szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) csökkent *B. cereus* fertőzést követően. Hasonló eredményt kaptunk a *raspberry* ( $ras^2$ ) gén vizsgálata során is, azaz szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) csökkent a túlélő egyedek aránya *B. cereus* fertőzést követően a kontrollhoz képest. A *scramblase 1* génnek a foszfolipid transzlokációban van szerepe. Sérülés következtében a negatív töltéssel rendelkező foszfolipidek (pl. foszfatidil-szerin), amelyek jellemzően a plazmamembrán belső lipid rétegében helyezkednek el, a külső rétegbe transzlokálódnak és ezáltal aktiválják a sebgyógyulásban szerepet játszó jelátviteli útvonalakat [Theopold és mtsai., 2002]. A *multicopper oxidase 3* homológiát mutat a növények lakkáz enzimével, amely a polifenolok oxidációját katalizálja, tehát a sebgyógyulásban és a melanizációban lehet szerepe [Theopold és mtsai., 2002; Shraddha et al., 2011]. A *raspberry* a *Drosophila* IMP-dehidrogenáza, a *de novo* GMP szintézis kulcsenzime, emberben szerepe van az immunválaszban és a limfocita proliferációban [Sollinger és mtsai., 1992]. Ecetmuslicában *raspberry* génnek szerepe van az S2 sejtek fagocitózisában [Stroschein-Stevenson és mtsai., 2006]. Túltermelése esetén a hemociták feldúsulnak a szívcső mentén [Stofanko és mtsai., 2008].

A *raspberry* recesszív letális gén, az általunk vizsgált  $ras^2$  a legerősebb homozigóta életképes hipomorf allél. A  $ras^2$  mutánsok sötétpiros szemszín fenotípusát a drosopterin hiánya okozza, ami egy pteridin típusú festékanyag, egy purin származék [Slee és mtsai., 1995]. Southern blot analízis alapján a  $ras^2$  mutáns egy inszerciót tartalmaz, amely valószínűleg a *raspberry* gén 1. vagy 2. intronjában ül, az inszert típusa nem ismert [Nash és mtsai., 1994].

A sérült *raspberry* ( $ras^2$ ) mutánsok esetében azt tapasztaltuk, hogy a sérülés önmagában nincs hatással az állatok életképességére, a sérült és nem sérült állatok túlélése azonos (14. Ábra. A). A nem sérült ecetmuslicák túlélését a baktérium kezelés nem befolyásolta, túlélési arányuk nem különbözik az *E. coli*, *B. cereus* és *S. marcescens* kezelést követően (14. Ábra. B, C, D). *E. coli* és *S. marcescens* fertőzés után a  $ras^2$  mutáns túlélése a kontrollokéhoz volt hasonló, azaz az *E. coli* fertőzés hatására nem csökkent a túlélő egyedek aránya, míg *S. marcescens* fertőzést követően minden ecetmuslica elpusztult (14. Ábra. B, D). *B. cereus* fertőzést követően szignifikánsan csökkent a túlélő egyedek aránya (14. Ábra. C zöld) a  $w^{1118}$  (14. Ábra. C barna) és az *Oregon-R* (14. Ábra. C sötétkék) kontrollokhoz képest. A screen során kapott eredményünk és az irodalmi adatok alapján érdemesnek tartottuk megvizsgálni a *raspberry* szerepét az ecetmuslica sejt-közvetítette immunválaszában, a fagocitózisban és a tokképzésben.

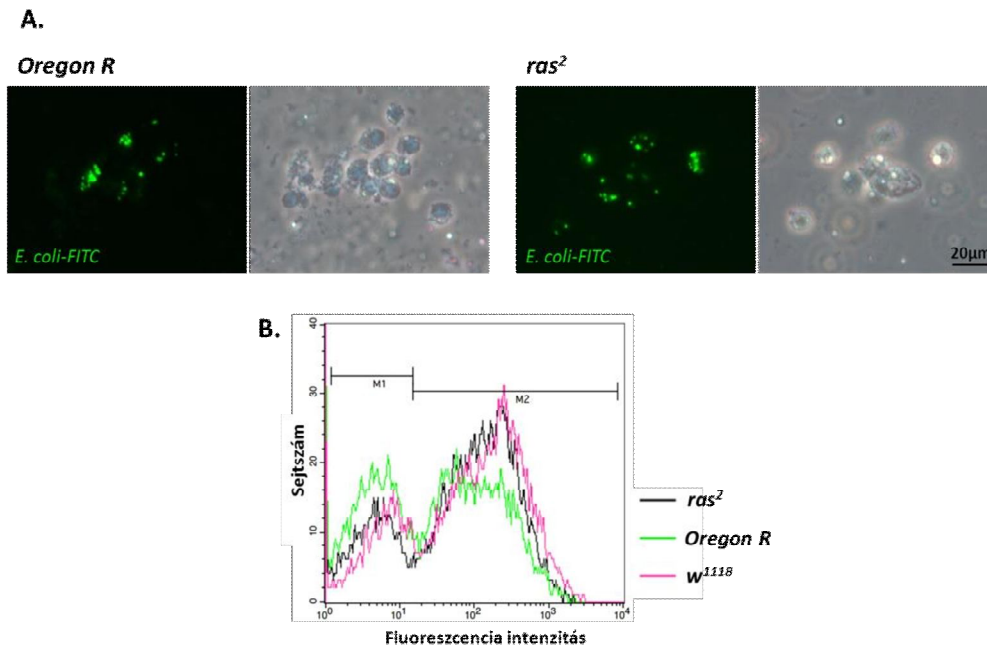


**14. Ábra.** A sérült illetve nem sérült  $ras^2$  állatok életképességének változása *E. coli*, *B. cereus* illetve *S. marcescens* baktérium fertőzést követően. A sérült és nem sérült állatokat 5 órán át steril LB táptalajon, vagy *E. coli*, *B. cereus* illetve *S. marcescens* alkotta baktérium pázsiton tartottuk, majd standard *Drosophila* táptalajra helyezve követtük az állatok túlélését. A kísérleteket háromszor ismételtük meg, a diagramok a három kísérlet adatait foglalják össze. Minden csoport kísérletenként legalább száz egyed tartalmazott. A statisztikai analízist a fertőzést követően 77 órával rögzített adatok felhasználásával végeztük. A  $p < 0,05$  alatti értékeket szignifikánsnak tekintettük. A hibavonalak a standard hibát jelölik.

#### 4.2.2. A $ras^2$ mutáns vérsejtek baktérium fagocitózisa

A *Drosophilából* származó S2 embrionális sejtvonalba kimutatták, hogy a *rasberry*nek szerepe van a fagocitózisban [Stroschein-Stevenson és mtsai., 2006], ezért megvizsgáltuk a *ras* szerepét az *ecetmuslica* lárva vérsejtjeinek fagocitózisában. A *Drosophila* harmadik stádiumú lárvaiból származó vérsejt szuszpenzióhoz hővel előlt és FITC-tal (fluorescein isothiocyanate) jelölt *E.coli* baktériumot adtunk, majd fluoreszcens mikroszkóppal (16. Ábra. A) és áramlási citometriával (16. Ábra. B.) meghatároztuk a plazmatociták által bekebelezett baktériumok

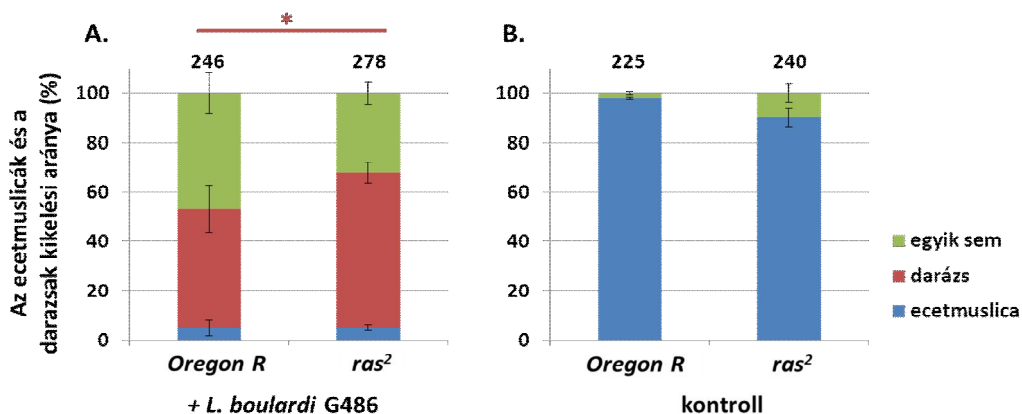
számát. Eredményeink szerint a *ras*<sup>2</sup> mutáns fagocitáló képessége nem különbözött szignifikánsan a *w*<sup>1118</sup> és *Oregon-R* kontroll törzsekétől (16. Ábra).



**16. Ábra. A fagocitózis vizsgálata a *rasberry* mutánsban.** A *ras*<sup>2</sup> plazmatociták fagocitáló képességének vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axioscope 2 MOT) (A) és áramlási citometriával (BD FACSCalibur áramlási citométer) (B)

#### 4.2.4. A *rasberry* szerepének vizsgálata a parazitoid darázsfertőzés leküzdésében

*Leptopilina bouvardi* G486 parazitoid darázssal történő fertőzést/immunindukciót követően vizsgáltuk a *Drosophila* lárvákból kikelő ecetmuslicák vagy darazsak számát a *ras*<sup>2</sup> mutáns és a kontroll *Oregon-R* esetében. Azt tapasztaltuk, hogy a fertőzött *ras*<sup>2</sup> mutánsok bábóréből szignifikánsan több darázs kelt ki, mint az *Oregon-R* esetében (17. Ábra. A barna). A fertőzött *Oregon-R* esetében viszont szignifikánsan több volt azoknak a báboknak a száma, amelyből sem ecetmuslica sem darázs nem kelt ki (17. Ábra. A zöld). Parazitoidok hiányában a *ras*<sup>2</sup> mutáns és a vad típusú *Oregon-R* bábokból kikelő ecetmuslicák számában nem volt szignifikáns különbség (17. Ábra. B kék). Eredményeink alapján a *rasberry* génnek szerepe van a parazitoid darázs elleni védekezésben.

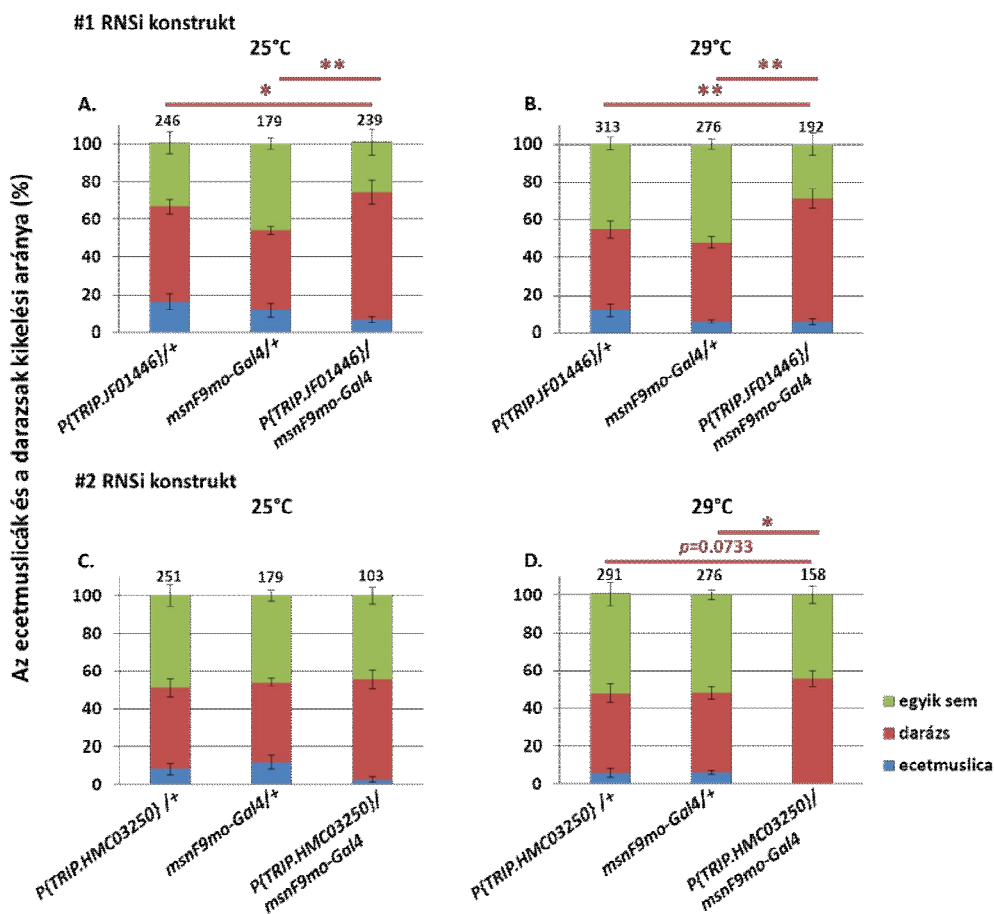


17. Ábra. Az ecetmuslicák és darazsak kikelési aránya a vad típusú *Oregon-R*, illetve a *rasberry* mutánsból parazitoid darázfertőzést követően. Az oszlopok felett a kísérletek során vizsgált ecetmuslica bábok számát tüntettük fel, amelyekből meghatároztuk a kikelő ecetmuslicák (kék) vagy darazsak (barna) illetve az elpusztult egyedek (zöld) arányát. A hibavonalak a standard hibát jelölik \* $p < 0.05$

A GTP szintézis kulcsfontosságú lépését katalizáló IMPDH enzimet *Drosophilában* a *rasberry* gén kódolja. A *ras*<sup>2</sup> mutánsban sérül a GTP szintézise, amely szinte minden alapvető folyamathoz szükséges a sejtek és a szervezet szintjén egyaránt. Ezért a klasszikus mutáns mellett RNS interferenciát is alkalmaztunk, hogy választ kapjunk arra a kérdésre, hogy a parazitoid darázzsal szembeni gyengébb immunválaszt a szervezet általánosan csökkent GDP/GTP szintje okozza-e vagy a hemociták szintjén történt változások. A kísérleteinkhez használt mindkét RNSi vonal (*y*<sup>1</sup> *v*<sup>1</sup>; *P*{*TRIP.JF01446*} *attP2* és *y*<sup>1</sup> *sc*<sup>\*</sup> *v*<sup>1</sup>; *P*{*TRIP.HMC03250*} *attP2*) működését leellenőriztük a *Drosophila* szemében kifejeződő *lz-Gal4* meghajtóelemmel. Mivel a *rasberry* gén RNS interferenciával történő csendesítését követően az ecetmuslicák szemszíne megegyezett a *ras*<sup>2</sup> mutáns szemszínével, arra következtettünk, hogy mindkét RNSi vonal megbízhatóan működik. A *rasberry* gén hemocitákban betöltött szerepének vizsgálatához a *rasberry* géntermékre specifikus kettősszálú RNS interferencia konstruktokat hordozó állatokat véresejt-specifikus meghajtó elemeket hordozó állatokhoz kereszteztük és az utódok *L.bouvardi* darázfertőzését követően meghatároztuk a *Drosophila* bábokból kikelő ecetmuslicák és darazsak arányát. Kísérleteinkben a lamellocitákban és a lamellocita előalakokban aktív *msnF9mo-Gal4* [Tokusumi és mtsai., 2009a, 2009b] (18. Ábra), valamint a hemociták megközelítőleg 80%-ban kifejeződő *Hemese-Gal4* [Zetterwall és mtsai., 2004] (19. Ábra) meghajtóelemeket használtuk.

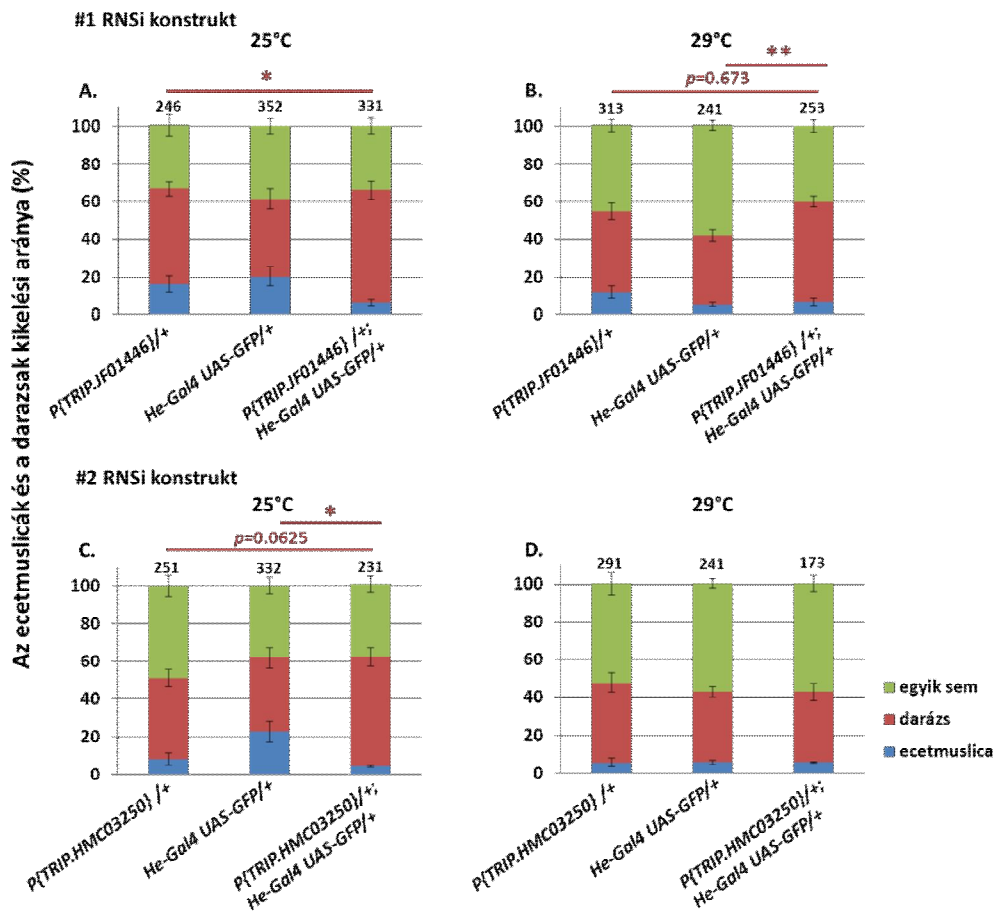


Darázsfertőzést követően az *msnF9mo-Gal4>y<sup>1</sup> v<sup>1</sup>; P{TRIP.JF01446} Drosophila* bábokból 25°C-on és 29°C-on is szignifikánsan magasabb arányban keltek ki darazsak, mint a *y<sup>1</sup> v<sup>1</sup>; P{TRIP.JF01446}/+* és *msnF9mo-Gal4/+* szülői törzsekből (18. Ábra. A, B barna). Viszont az *msnF9mo-Gal4>y<sup>1</sup> sc<sup>\*</sup> v<sup>1</sup>; P{TRIP.HMC03250} attP2* esetében csak 29°C-on és csak a *y<sup>1</sup> sc<sup>\*</sup> v<sup>1</sup>; P{TRIP.HMC03250} attP2/+* szülői törzshöz képest kelt ki szignifikánsan több darázs (18. Ábra. C, D barna).



**18. Ábra.** Az ecetmuslicák és darazsak kikelési aránya a *raspberry* kettősszálú RNS interferenciával történő géncsendesítését és parazitoid darázsfertőzést követően. Az oszlopok felett a kísérletek során vizsgált ecetmuslica bábok számát tüntettük fel, amelyből meghatároztuk a kikelő ecetmuslicák (kék) vagy darazsak (barna) illetve az elpusztult egyedek (zöld) arányát. A hibavonalak a standard hibát jelölik. Az oszlopok felett a vizsgált ecetmuslica bábok számát tüntettük fel. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

A *He-Gal4 UAS-GFP/+; y<sup>1</sup> v<sup>1</sup>; P{TRIP.JF01446} attP2/+* utódok csak a *He-Gal4 UAS-GFP/+* szülői törzshöz képest mutattak szignifikáns különbséget a kikelő darazsak arányát tekintve 25°C és 29°C-on is (19. Ábra. A, B). A *He-Gal4 UAS-GFP/+; y<sup>1</sup> sc<sup>\*</sup> v<sup>1</sup>; P{TRIP.HMC03250} attP2* utódok esetében szintén csak a *He-Gal4 UAS-GFP/+* szülői törzshöz viszonyítva volt szignifikánsan magasabb a kikelő darazsak aránya 25°C-on (19. Ábra. C, D).

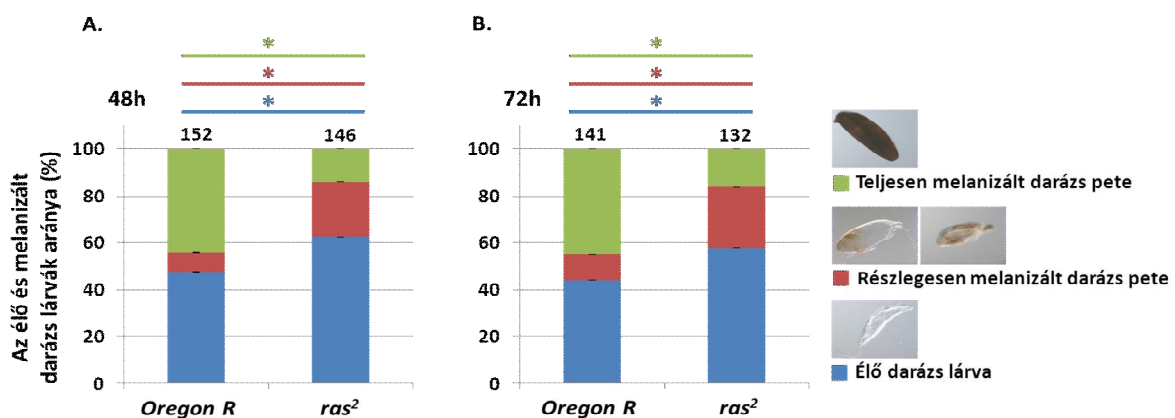


**19. Ábra.** Az acetabulák és darazsak kikelési aránya a *raspberry* kettősszálú RNS interferenciával történő géncsendesítését és parazitoid darázsfertőzést követően. Az oszlopok felett a kísérletek során vizsgált acetabula bábok számát tüntettük fel, amelyekből meghatároztuk a kikelő acetabulák (kék) vagy darazsak (barna) illetve az elpusztult egyedek (zöld) arányát. A hibavonalak a standard hibát jelölik. Az oszlopok felett a vizsgált acetabula bábok számát tüntettük fel. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.2.5. A *rasberry* gén szerepe a parazitoid darázsfertőzést követő tokképzésben

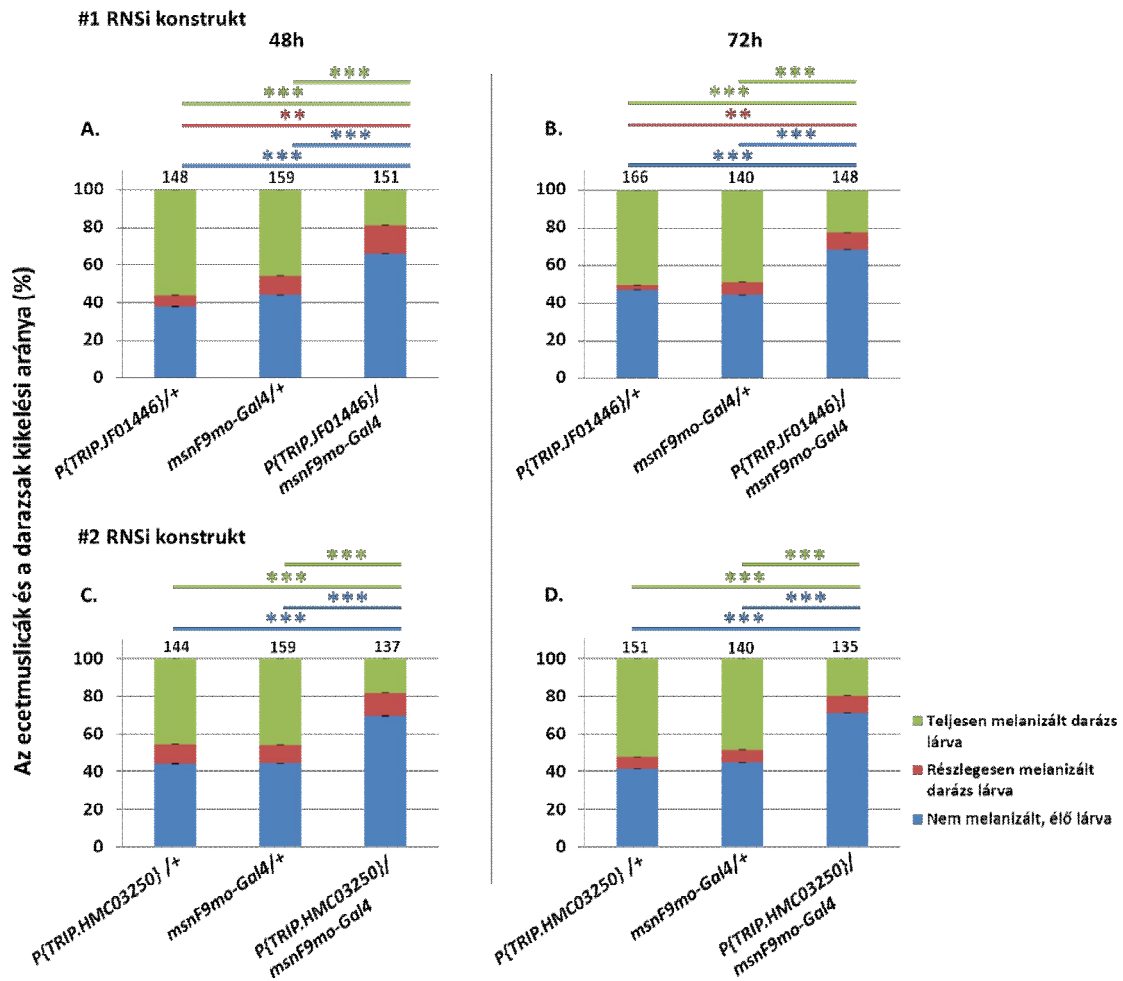
A *ras*<sup>2</sup> mutáns esetében és a *ras* gén termékeinek RNS interferenciával történő csendesítését követően is több darázs kelt ki az ecetmuslicák bábbőréből, amiből arra következtettünk, hogy csökkent a parazitoid darázsfertőzésre adott immunválasz hatékonysága. Ezért megvizsgáltuk a tokképzés hatékonyságát, amellyel az ecetmuslica lárva, sikeres immunválasz esetén, elpusztítja a parazitoidot. *L. boulandi* parazitoid darázsfertőzést követő 48 és 72 óra elteltével a *ras*<sup>2</sup> és az *Oregon-R* kontroll lárváknak a tokképzés különböző stádiumaiban lévő parazitoidokat találtunk. Előfordultak élő darázs lárvák, részlegesen melanizált darázs peték és teljesen melanizált darázs peték (20. Ábra).

Egy-egy kiboncolt fertőzött *Drosophila* lárzában általában 1 vagy 2 élő lárvét vagy melanizált darázs petét találtunk. A fertőzött *Oregon-R* illetve *ras*<sup>2</sup> lárváknak a darázs peték arányát vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget, azaz a vad típusban és a mutánsban hasonló volt a fertőzöttség mértéke, ezért az élő lárvák illetve melanizált peték arányából következtetni lehet a sejt-közvetítette immunválasz, ez esetben a tokképzés hatékonyságára. A *ras*<sup>2</sup> mutánsban az immunindukciót követően már 48 óra elteltével is szignifikánsan magasabb volt az élő darázs lárvák (20. Ábra. kék) és a részlegesen melanizált peték (20. Ábra. barna) aránya, valamint szignifikánsan kevesebb volt a teljesen melanizált darázspeték aránya (20. Ábra. zöld), mint az *Oregon-R* kontroll állatokban. Ez a különbség megfigyelhető volt 72 óra elteltével is.

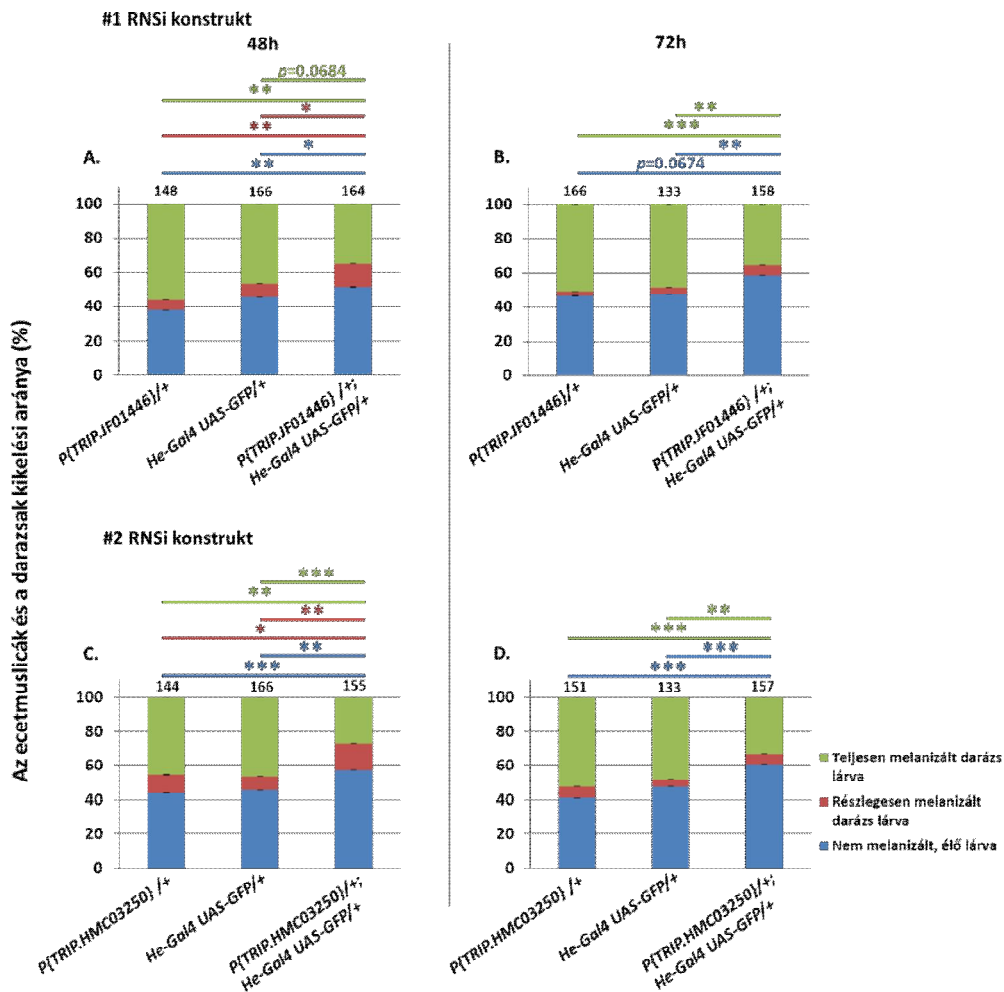


20. Ábra. Tokképzés a *ras*<sup>2</sup> és az *Oregon-R* kontroll állatokban a parazitoid darázsfertőzést követően 48 és 72 órával. Az oszlopok felett a vizsgált ecetmuslica lárvák számát tüntettük fel. \**p*<0.05

A tokképző reakció alakulását véresejt-specifikusan meghajtott *raspberry* specifikus kettősszálú RNS interferencia konstruktokat hordozó állatokban ( $y^1 sc^* v^1; P\{TRIP.HMC03250\} attP2$  és  $y^1 v^1; P\{TRIP.JF01446\} attP2$ ) is megvizsgáltuk és hasonló eredményeket kaptunk, mint a  $ras^2$  esetében. Az  $msnF9mo-Gal4 > y^1 v^1; P\{TRIP.JF01446\} attP2$  lárvákban szignifikánsan magasabb volt az élő darázs lárvák (21. Ábra. kék), és részlegesen melanizált darázs peték aránya (csak a  $y^1 v^1; P\{TRIP.JF01446\} attP2/+$  szülői törzshöz képest, 21. Ábra. A, B barna), valamint szignifikánsan alacsonyabb a teljesen melanizált darázs peték aránya (21. Ábra. zöld) az  $msnF9mo-Gal4/+$ ,  $y^1 v^1; P\{TRIP.JF01446\} attP2/+$  és a  $(y^1 sc^* v^1; P\{TRIP.HMC03250\} attP2/+$  lárvákhoz képest. A *He-Gal4* driverrel történő géncsendesítést követően is hasonló eredményeket kaptunk (22. Ábra). A  $ras^2$  mutánsban és az RNS interferenciával történő géncsendesítést követően megfigyelt, a kontroll vonalakhoz képest magasabb élő lárvák arányából arra következtethetünk, hogy a hemociták kevésbé hatékonyan ismerik fel a parazitoid darázspetéket, vagy nem képesek megfelelően kitapadni azok felszínére. A részlegesen melanizált darázs peték magasabb száma arra utal, hogy a tokképzés és a melanizáció folyamata is lelassul. Az is elképzelhető, hogy a hemociták proliferációja vagy differenciációja miatt csökken a tokképzés hatékonysága.



21. ábra. A tokképzés hatékonysága a *raspberry* kettősszálú RNS interferenciával történő géncsendesítését követően. Kísérleteink során két független, a *raspberry* géntermékre specifikus RNS interferencia törzset használtunk, amelyeket az *msnF9mo-Gal4* driverrel hajtottunk meg. A tokképzés hatékonyságát a darázzsal történő immunindukció után 48 és 72 órával vizsgáltuk. Az oszlopok felett a vizsgált ecetmuslica lárvák számát tüntettük fel. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

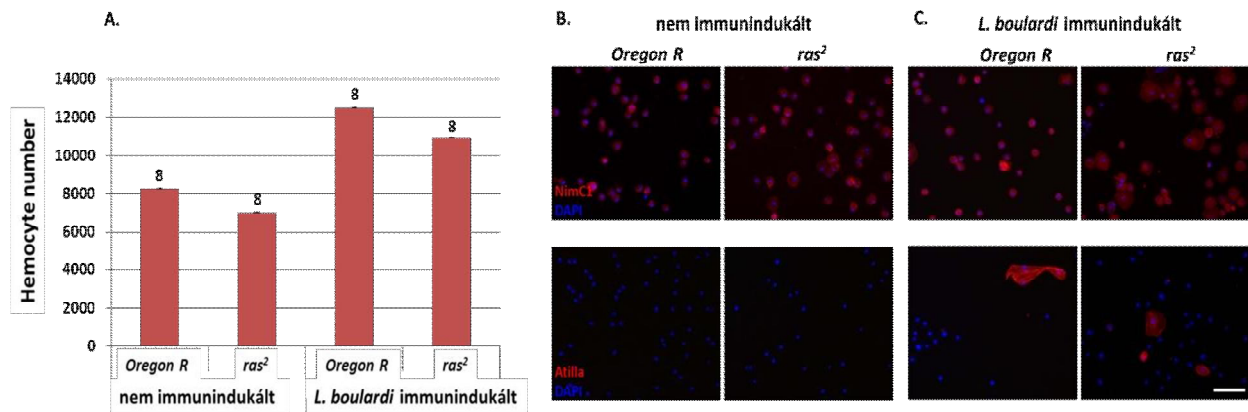


22. Ábra. A tokképzés hatékonysága a *raspberry* kettőszálú RNS interferenciával történő géncsendesítését követően. Kísérleteink során két független, a *raspberry* géntermékre specifikus RNS interferencia törzset használtunk, amelyeket a *He-Gal4* driverrel hajtottunk meg. A tokképzés hatékonyságát a darázzsal történő immunindukció után 48 és 72 órával vizsgáltuk. Az oszlopok felett a vizsgált ecetmuslica lárvák számát tüntettük fel. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

#### 4.2.6. A keringő hemociták száma és a lamellocita differenciálódás vizsgálata a *ras*<sup>2</sup> mutánsban

A darázsfertőzést követő immunindukció során a *Drosophila* lárva vérsejtjei morfológiai és funkcionális változásokon mennek keresztül [Honti és mtsai., 2010]. A vérsejtek proliferációja és differenciálódása GTP-függő, energiaigényes folyamat, amelyben a *rasberry* által kódolt IMPDH enzimnek kulcsfontosságú szerepe van. Eredményeink alapján a *ras*<sup>2</sup> mutánsban hiányosan működő tokképző reakciót a hemociták proliferációjának, vagy differenciálódásának hibája is okozhatja. A proliferációs hiba meghatározható a keringő hemociták számából. A *ras*<sup>2</sup> mutáns harmadik stádiumú lárvainak keringése átlagosan 7013 ( $\pm 23,16$ ) hemocitát, míg az *Oregon-R* 8250 $\pm 27,12$  hemocitát tartalmazott. Immunindukciót követően a *ras*<sup>2</sup> mutánsban 10975 $\pm 1,95$ , az *Oregon-R* lárvákban 12500 $\pm 3,05$  hemocitát számoltunk, de a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns (23. Ábra. A). Vizsgálataink szerint a *ras*<sup>2</sup> allél nem befolyásolja a hemociták proliferációját (23. Ábra. A)

A hemociták differenciálódását a keringő vérsejteken kifejeződő sejttípus specifikus molekuláris markerekkel követtünk nyomon, a plazmatocitákon megnyilvánuló NimC1 molekulával [Kurucz és mtsai., 2007a], és a lamellocitákon kifejeződő Atilla molekulával [Kurucz és mtsai., 2007b] reagáló monoklonális ellenanyagok segítségével. A plazmatociták és a lamellociták hasonló arányban voltak jelen az *Oregon-R* és a *ras*<sup>2</sup> lárvákban, tehát a *ras*<sup>2</sup> mutáció nincs hatással a lamellocita differenciálódásra darázsfertőzést követően (23. Ábra. B, C).

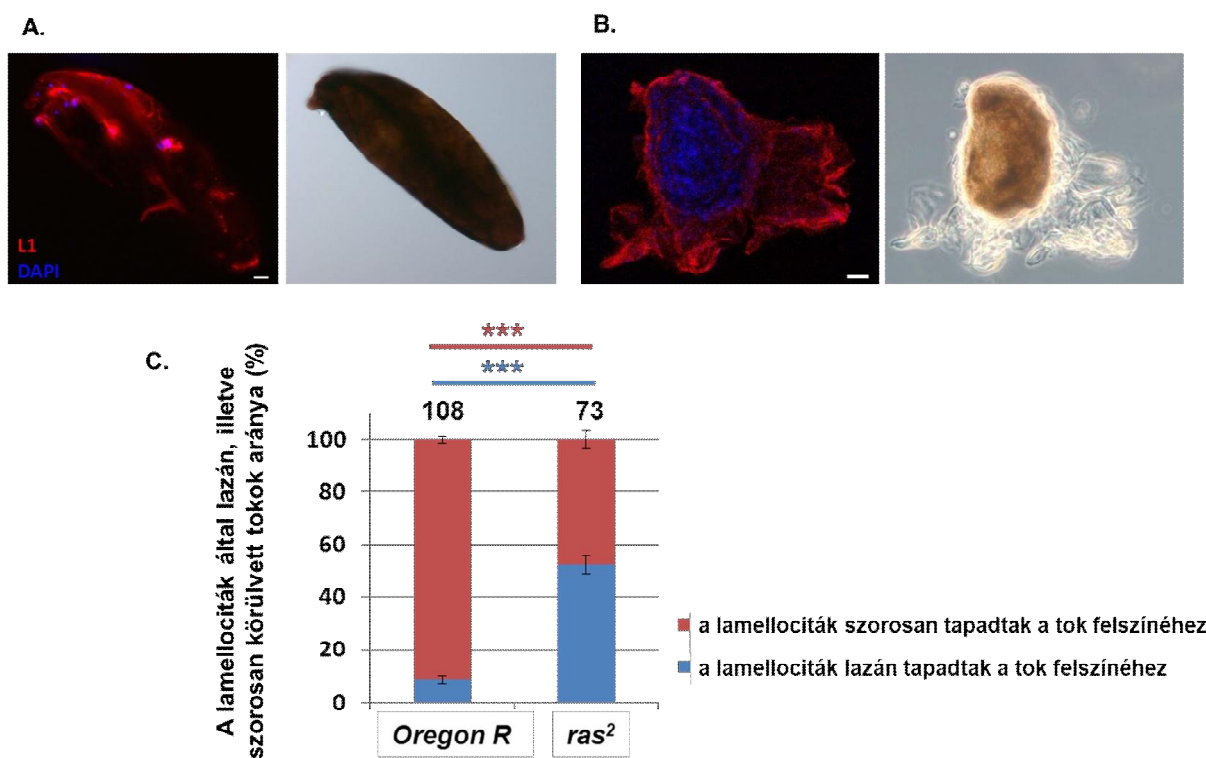


**23. ábra.** Az *Oregon-R* és *ras<sup>2</sup>* lárvák keringő hemocitáinak száma és morfológiája. Nem immunindukált és *L. bouvardi* darázssal immunindukált *Oregon-R* és *ras<sup>2</sup>* lárvák keringő hemocitáinak száma (A), és keringő hemocitáinak indirekt immunfluoreszcencia festést követő vizsgálata (B, C). A nem immunindukált és *L. bouvardi* darázssal immun-indukált lárvákból a hemocitákat a darázsszúrás követő 72 óra eltelte után izoláltuk. A plazmatocitákat NimC1 specifikus, a lamellocitákat Atilla specifikus monoklonális ellenanyagokkal jelöltük és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss Axioscope 2 MOT, 40X nagyítás). Az oszlopok felett a vizsgált lárvák számát tüntettük fel. Lépték: 20  $\mu$ m.



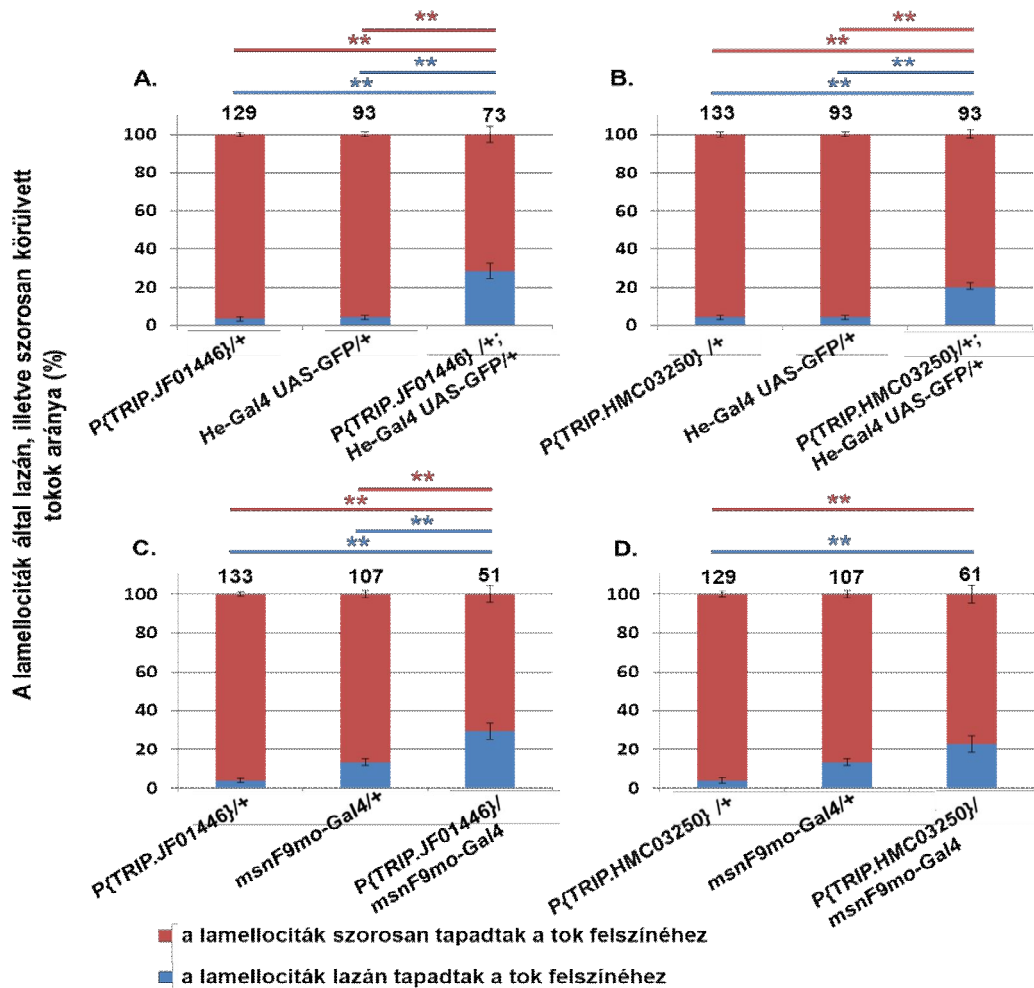
#### 4.2.7. A lamellociták darázs petéhez történő kitapadásának vizsgálata a *ras*<sup>2</sup> mutánsban

A *Drosophila* lárvába helyezett darázspetét a hemociták testidegen anyagként érzékelik, körülveszik, a felszínére tapadnak, és szorosan egymáshoz kapcsolódva többrétegű tokba zárják. Darázsfertőzést követően az ecetmuslica lárvákat boncolva olyan darázspetéket találtunk, amelyeket a lamellociták szorosabban (24. Ábra. A) vagy lazább rétegben (24. Ábra. B) vettek körül. A laza szerkezetű tokok aránya a *ras*<sup>2</sup> mutáns lárvákban szignifikánsan magasabb volt, mint az *Oregon-R* lárvákban (24. Ábra. C).



24. Ábra. A lamellociták darázspetéhez történő kitapadása. A lamellociták által körülvelt darázspeték indirekt immunfluoreszcencia festést követő vizsgálata (A, B). Az *Oregon R* és a *ras*<sup>2</sup> mutáns lamellocitái által lazán, illetve szorosan körülvelt tokok aránya a darázssal történő immunindukciót követően 72 órával (C). A *L. bouhardi* darázssal immunindukált lárvákból a hemocitákat izoláltunk a darázsszűrást követően 72 óra elteltével. A lamellocitákat Atilla specifikus monoklonális ellenanyaggal, valamint CF568-al jelölt anti-egér ellenanyaggal festettük és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss Axioscope 2 MOT, Leica TCS SP5 II konfokális mikroszkóp, 20X nagyítás). Az oszlopok felett a részlegesen és teljesen melanizált darázspeték számának összegét tüntettük fel. Lépték 20  $\mu$ m.

A *rasberry* génterméket az *He-Gal4* (25. Ábra. A, B) vagy *msnF9mo-Gal4* (26. Ábra. C, D) driverrel csendesítve a korábban említett RNSi vonalakban, azt tapasztaltuk, hogy a darázspeték körül kialakuló laza szerkezetű tokok aránya megemelkedett az utódokban a szülői törzsekben találtakéhoz képest. A laza szerkezetű tokok aránya korábbi időpontban, a darázsszűrást követően 48 órával is magasabb volt a *ras*<sup>2</sup> mutánsban és a *ras* gén termékeinek RNS interferenciával történő csendesítését követően a kontrollhoz viszonyítva. Ebből arra következtettünk, hogy a laza tok kialakulása a lamellociták nem megfelelő kitapadásának a következménye, nem pedig a tokképzés egy korábbi stádiumát reprezentálja.



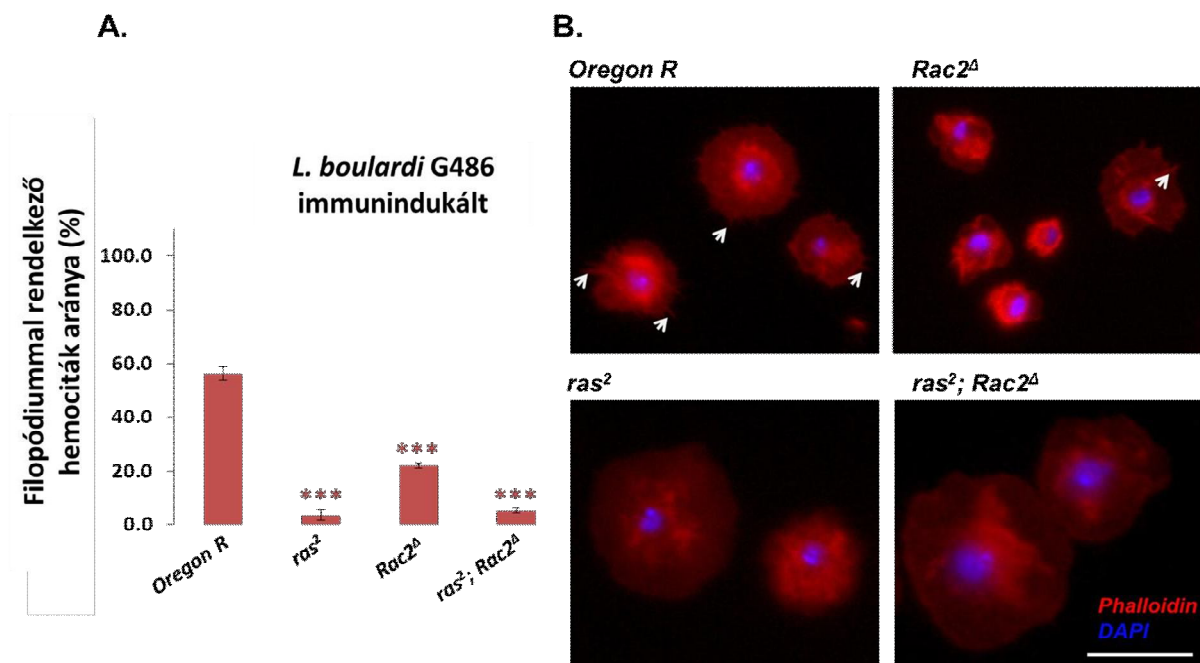
**25. ábra.** A lamellocita specifikusan csendesített *rasberry* hatása a lamellociták tokképzésére a darázsfertőzést követő 72 óra elteltével. A *rasberry* génterméket a *He-Gal4 UAS-GFP* és az *msnF9mo-Gal4* driverrel csendesítettük. Az oszlopok felett a részlegesen és teljesen melanizált darázspeték számának összegét tüntettük fel.

#### 4.2.8. A *raspberry* szerepe a vérsejtek filopódium képzésében

A  $ras^2$  mutánsokban és a *ras* gén termékeinek vérsejt-specifikus csendesítését követően megfigyelt tokképzési zavar arra utal, hogy a *raspberry* gén szerepet játszhat a lamellocitáknak a parazita petékhez történő tapadásában. A vérsejtek adhéziója során citoskeletális átrendeződések játszódnak le, lamellopódiumok és filopódiumok alakulnak ki, melyben a kis GTP-áz Rac2 molekula is szerepet játszik [Williams és mtsai., 2005]. Kísérleteink során a  $ras^2$ ,  $Rac2^A$  és a  $ras^2; Rac2^A$  kettős mutánsokban, valamint a vad típusú *Oregon-R* lárvákban 24 órával a parazitoid darázsfertőzést követően megvizsgáltuk a hemociták morfológiáját és meghatároztuk a keringésben előforduló filopódiumokkal rendelkező hemociták arányát. A  $ras^2$ ,  $Rac2^A$  és a  $ras^2; Rac2^A$  mutánsokban a hemociták nagyobb méretűek voltak és szignifikánsan csökkent a filopódiumokat képző vérsejtek aránya az *Oregon-R* kontrollhoz képest (27. Ábra).

A  $ras^2$ , és a  $ras^2; Rac2^A$  mutánsok hemocitái nagyobb méretűek voltak, mint az *Oregon-R* és a  $Rac2^A$  lárvák hemocitái (27. Ábra. B). Az *Oregon-R* vérsejtejei szignifikánsan több filopódiummal ( $7,2 \pm 2,9$ ) rendelkeztek, mint a  $ras^2$  ( $3,9 \pm 1,3$ ) ( $p < 0,01$ ) és a  $ras^2; Rac2^A$  ( $4,3 \pm 2,1$ ) ( $p < 0,01$ ), viszont ez a különbség nem volt szignifikáns a  $Rac2^A$  mutánshoz viszonyítva ( $5,6 \pm 4$ ) (27. Ábra. A). A  $ras^2; Rac2^A$  kettős mutánsokban a alacsonyabb volt a filopódiumokkal rendelkező hemociták száma, mint a  $Rac2^A$  mutánsban, amiből arra következtethetünk, hogy a *ras* epiztatikus a *Rac2* felett. A filopódiumok hossza megegyezett az *Oregon-R*,  $ras^2$ ,  $Rac2^A$  és  $ras^2; Rac2^A$  lárvákból származó hemocitákon ( $1-3 \mu\text{m}$ ).

Eredményeinkből arra következtünk, hogy a *raspberry* mutációja miatt kevésbé hatékonyan működnek azok a GTP igényes jelátviteli útvonalak és immunfolyamatok, amelyek a parazitoid darázs pete felismeréséhez és elpusztításához szükségesek.



27. Ábra. A filopodiummal rendelkező hemociták arányának vizsgálata. A keringő hemociták morfológiája (A). A keringő hemociták százalékos arányának vizsgálata 24 órával a darázs fertőzést követően (B). Parazitoid darázsfertőzést követő 24 óra elteltével a lárvákból hemocitákat izoláltunk, phalloidinnel jelöltük, majd a sejtek filopodium képződését fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss Axioscope 2 MOT, 40X nagyítás). Törzsenként legalább 100 hemocitát számoltunk meg, amelyek 6 lárvából származtak. A hibavonalak a standard hibát jelölik. \*\*\* $p < 0.001$ .

## 5. Az eredmények megvitatása

A patogénekkal a gazdaszervezetek a védekezési mechanizmusok széles skálájával veszik fel a versenyt. A gazdaszervezetek és a kórokozók közötti kölcsönhatás során a parazitákra illetve patogén mikroorganizmusokra ható szelekciós nyomás következtében olyan virulens törzsek alakulhatnak ki, amelyek különböző stratégiáikkal kikerülnek a gazdaszervezet védekezési folyamatait. A különböző mikrobiális virulencia faktorok, valamint antimikrobiális anyagok vizsgálatának egyik leggyakrabban használt modellszervezete a hatékony veleszületett immunválasszal rendelkező *Drosophila melanogaster* [Vodovar és mtsai., 2005; Lionakis és mtsai., 2012].

A *Drosophila* szeptikus sérülésre adott immun-válaszreakciója összetett folyamat. A sikeres immunválasz létrejöttéhez a humorális és a sejt-közvetítette mechanizmusok összehangolt működése szükséges. A *Drosophila* szeptikus sérülés által kiváltott védekezési rendszerének vizsgálatára egy olyan új *in vivo* módszert dolgoztunk ki, amely a természetben is előforduló sérülést laboratóriumi körülmények között modellezi és lehetővé teszi olyan új faktorok azonosítását, amelyek szerepet játszanak a szeptikus sérülést követő védekező reakciókban és ezáltal biztosítják az egyed túlélését [Kari és mtsai., 2013]. Módszerünkben a sérülést úgy hoztuk létre, hogy az ecetmuslicák első pár lábának tarsális ízzeit eltávolítottuk, az állatokat baktérium pázsitra helyeztük, majd meghatároztuk egyes Gram-negatív (*Escherichia coli* és *Serratia marcescens*), és Gram-pozitív (*Bacillus cereus* var. *mycoides*) baktériumok túlélésre gyakorolt hatását. Kísérleteink során mind a  $w^{1118}$  kontroll, mind pedig a mutáns vonalak vizsgálata során minden esetben azt tapasztaltuk, hogy a sértetlen ecetmuslicákba a tápcsatormán keresztül esetleg bejutó baktériumok nem befolyásolták szignifikánsan azok életképességét.

Vizsgálataink során először GFP riporter fehérjét termelő *E. coli* baktériumot használva kimutattuk, hogy a baktériumok az okozott sérülésen keresztül bejutnak a testüregbe. A baktériumok először a seb felületével érintkeznek, ahol a lokális immunválasz részeként koagulációt indukálnak, amely egyrészt meggátolja a hemolimfavesztést másrészt a baktériumok elleni védekezésben is aktív szerepet játszik, azáltal, hogy a sebzés helyén kialakuló hemolimfa alvadék megköti a baktériumokat és így megakadályozza azok testüregbe jutását [Scherfer és mtsai., 2004].

A szeptikus sérülést kiváltó módszerünk érzékenységét először olyan *Drosophila* mutánsokon teszteltük, amelyek a humorális immunválasz Toll jelátviteli útvonalaiban szerepet játszó *spätzle* gén, az Imd jelátviteli útvonalon résztvevő *Dredd* és *Relish* gének, valamint a hemolimfa koagulációban érintett *Hemolectin* gén mutáns alléljait hordozzák.

A sértetlen és sérült  $w^{1118}$  kontroll, valamint mutáns ecetmuslicák Gram-negatív *E. coli* és *S. marcescens*, továbbá Gram-pozitív *B. cereus* baktériumfertőzést követő túlélésének összehasonlítása azt mutatta, hogy az állatok pusztulását egyértelműen a sérülésen keresztül bejutó mikroorganizmusok okozták.

A *Hemolectin* véralvadási faktor mutáns állatok vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy ezek az állatok a sérülést követően a táptalajon történő mozgásuk során jóval több melanizált hemolimfa foltot hagytak, mint a  $w^{1118}$  kontroll ecetmuslicák, ami arra utal, hogy jóval több hemolimfát veszítettek, ami a hemolimfa koaguláció zavarára utal. Ebben az esetben az *Hml* mutáns ecetmuslicák életképességét legfőképpen maga a sérülés csökkentette, nem a baktérium fertőzés. Ezek az eredményeink azt mutatják, hogy a *Hemolectin* fehérje az ecetmuslica egyedfejlődése során a lárva stádium mellett a kifejlett ecetmuslicában is fontos szerepet tölt be a sebgyógyulásban és a sérülést követő túlélésben. Módszerünk a bakteriális fertőzés leküzdésében szerepet játszó gének azonosítása mellett a koagulációban szerepet játszó gének azonosítására is alkalmas.

Kísérleteink szerint az Imd jelátviteli útvonalon résztvevő *Dredd* és *Relish* mutánsok esetében a steril sérülés nem befolyásolta az egyedek túlélését, míg az *E. coli*, illetve *B. cereus* fertőzést követően a sérült állatok életképessége jelentősen csökkent a  $w^{1118}$  kontrollhoz képest. A *spätzle* mutánsokat *E. coli* baktérium pázsitra helyezve a sérülés szignifikánsan nem befolyásolta az egyedek túlélését. A *B. cereus* fertőzést követően azt tapasztaltuk, hogy a sérült mutáns állatok esetében a  $w^{1118}$  kontrollhoz viszonyítva csökkent a túlélő egyedek száma. Ezen eredményeink azzal magyarázhatóak, hogy az Imd jelátviteli útvonalon fő aktivátorai, a DAP-típusú peptidoglikánt tartalmazó baktériumok, mint a *B. cereus*, a Toll és Imd jelátviteli útvonalat is képesek aktiválni [Leone és mtsai., 2008].

A *defensin-GFP* transzgén hordozó ecetmuslicában [Tzou és mtsai., 2000] az *E. coli* vagy *B. cereus*-szal kiváltott szeptikus sérülés hatására megemelkedett GFP molekula kifejeződése, ami arra utal, hogy a testüregekbe jutó baktériumok humorális immunválaszt

indukálnak. A sérülés önmagában illetve az intakt állatok baktérium kezelése sérülés hiányában nem váltotta ki a *defesin-GFP* transzgen átírását. A módszer alkalmas az immunválasz egyes folyamatainak (pl. antimikrobiális peptidek termelődése) és azok időbeli lefolyásának vizsgálatára és nyomon követésére.

Az általunk kidolgozott *in vivo* szeptikus sérülési módszer kontrollált laboratóriumi körülmények között kiváltott sérülésen és fertőzésen alapszik. A módszer nagy előnye az, hogy jól reprodukálható, egyszerűen kivitelezhető, valamint nagyszámú egyed gyors vizsgálatára ad lehetőséget. Az előidézett sérülések egyforma méretűek, a sérülés rövid idő alatt létrehozható (30 állat/5-6 perc), ezért a különböző baktérium törzsekkel fertőzött különböző mutációkat hordozó törzsek egy időben, egymással párhuzamosan tesztelhetők. Az általunk kidolgozott szeptikus sérülési módszer jól használható a szeptikus sérülést követő gazda-patogén interakcióban szerepet játszó faktorok azonosítására. A mikropillárisal, vagy tüvel kiváltott szeptikus fertőzési módszerek során az okozott mechanikai sérülés önmagában is hatással lehet a sérült egyedek túlélésére [Lemaitre és mtsai., 1997]. Az általunk kidolgozott módszer nagy előnye, hogy a láb tarsalis ízeinek eltávolítása lényegesen nem befolyásolja az állatok életképességét, a túlélés kizárólag a kórokozó patogenitásától és a gazdaszervezet immunválaszának hatékonyságától függ. Mivel módszerünk során a baktériumok nem invazív módon, hanem a sérülésen keresztül kerülnek az állatok testüregébe, ezért a védekezésben résztvevő faktorok és jelátviteli útvonalak együttes hatása vizsgálható. Mivel a gentamicin kezelést követően a sérült ecetmuslicák pusztulása lelassult a *S. marcescens* fertőzést követően az általunk kidolgozott módszer alkalmazható antimikrobiális anyagok tesztelésére is.

Eredményeink azt igazolják, hogy a szeptikus sérülésre adott sikeres immunválaszhoz az immunrendszer különböző folyamatainak, a koagulációnak, sebgyógyulásnak, melanizációnak, antimikrobiális peptidek termelésének, valamint a fagocitózisnak az összehangolt működése szükséges. Az általunk kidolgozott módszer e védekezési folyamatok együttesének *in vivo* vizsgálatát teszi lehetővé, felhasználásával azonosíthatóak a szeptikus sérülést követően a kórokozókkal szembeni védelemben, a koagulációban, sebgyógyulásban szerepet játszó gének, bakteriális virulencia faktorok és antimikrobiális anyagok. Az immunválasz során együttműködő faktorok azonosítására a fertőzést követően csökkent életképességet mutató mutánsok interakciós

screenekben érzékenyített háttérként használhatók. Az általunk kidolgozott módszer mind a lokális, mind a szisztémás immunválasz vizsgálatára alkalmas.

A továbbiakban szeptikus sérülési tesztünk felhasználásával egy irányított screent végeztük, amelynek során olyan gének mutáns alléljait hordozó ecetmuslicák életképességét vizsgáltuk, amelyeknek irodalmi adatok alapján szerepük lehet a bakteriális fertőzés leküzdésében. Tesztünkben *B. cereus* fertőzést követően szignifikánsan csökkent a sérült *scramblase 1*, *multicopper oxidase 3* gének mutáns alléljait hordozó állatok életképessége. Ezek a gének a koagulációban és a sebgyógyulási folyamatokban járhatnak szerepet, de ennek igazolásához további kísérletek szükségesek. Hasonló eredményt kaptunk a *rasberry* (*ras*<sup>2</sup>) vizsgálata során is, azaz szignifikánsan csökkent a túlélő egyedek aránya *B. cereus* fertőzést követően a *w*<sup>118</sup> és *Oregon-R* kontrollokhoz képest. Ebből arra következtettünk, hogy a *rasberry* gén által kódolt *Drosophila* inozin-monofoszfát dehidrogenáz (IMPDH) szerepet játszik a szeptikus fertőzést követő túlélésben. Az *rasberry* recesszív letális gén, ezért vizsgálatainkat a *ras*<sup>2</sup> hipomorf allélt hordozó ecetmuslicákon végeztük. A *ras*<sup>2</sup> a legerősebb homozigóta életképes hipomorf allél, amely egy ismeretlen típusú inszerciót hordoz [Nash és mtsai., 1994; Slee és mtsai., 1995]. Irodalmi adatok szerint a *rasberry* által kódolt IMPDH szükséges a *Drosophila* S2 sejtek *E. coli* fagocitálásához [Stroschein-Stevenson és mtsai., 2006]. Ezért kísérleteink során megvizsgáltuk a *ras*<sup>2</sup> hipomorf allélt hordozó lárvák hemocitáinak *E. coli* fagocitáló képességét. Nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a vad típusú *Oregon-R* hemociták fagocitózisától.

A *Drosophilában* a *rasberry* gén kódolja a GTP molekula szintézisének egyik kulcsenzimét, az IMPDH enzimet, amely az immunválasz jelátviteli útvonalaiban is nélkülözhetetlen szereppel bír. Katalitikus aktivitása mellett az IMPDH *Drosophilában* transzkripciós faktorként is működik [Kozhevnikova és mtsai., 2012]. Kísérleteink során azt is megvizsgáltuk, hogy a *rasberry* szerepet játszik-e a *Drosophila* sejt-közvetítette immunválaszban, a paraziták körüli hemociták által kialakított tok képzésében. Megvizsgáltuk, hogy a *ras*<sup>2</sup> tokképzési rendellenességét a szervezet megváltozott GDP/GTP szintje okozza-e vagy a hemociták szintjén történt változások.



Kísérleteink során a *Leptopilina bouhardi* G486 darázzsal a fertőzött *Oregon-R* kontroll és *ras*<sup>2</sup> mutáns lárvákban egyaránt egy-két, ritkán három darázspetét találtunk. A fertőzött *ras*<sup>2</sup> mutánsokból szignifikánsan több darázs kelt ki a bábórból, mint a fertőzött *Oregon-R* állatokból, ami arra utal, hogy a vad típusú ecetmuslicák tokképző reakciója hatékonyabban működik, mint a *ras*<sup>2</sup> mutánsoké. Az *Oregon-R* esetében szignifikánsan több volt azoknak a báboknak a száma, amelyből sem ecetmuslica sem darázs nem fejlődött, ami arra utal, hogy a darázspete elleni küzdelem kimeríti a gazdaszervezet erőforrásait. A gazdaszervezetek nagymértékű pusztulása azzal is magyarázható, hogy az ecetmuslica lárvákban a fejlődő darázs lárvák olyan szöveti károsodásokat okozhatnak, amelyek mind a gazdaszervezet, mind a parazitoid pusztulását eredményezik. Darázs fertőzés nélkül a *ras*<sup>2</sup> mutáns és vad típusú *Oregon-R* állatokból kikelő ecetmuslicák számában nincs szignifikáns különbség, ami arra utal, hogy a *ras*<sup>2</sup> allél önmagában alig befolyásolja az állatok túlélési esélyeit. A *rasberry* gén termékének kettősszalú RNS-sel véresejt, illetve lamellocita specifikus csendesítését követően szignifikánsan több darázs kelt ki, mint a szülői kontroll törzsekből. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a *rasberry* gén szerepet játszik a tokképző reakció létrejöttének a szabályozásában.

Azt is megvizsgáltuk, hogy a *ras*<sup>2</sup> mutánsban a kikelő darázsok magasabb aránya magyarázható-e a tokképző reakció hatékonyságának csökkenésével. A parazitizált *ras*<sup>2</sup> lárvákban jóval több élő darázs lárvát és részlegesen melanizált darázs petét találtunk, mint a vad típusú lárvákban, ahol viszont szignifikánsan több melanizált petét számoltunk. Hasonló eredményeket kaptunk, a *rasberry* géntermékének véresejt specifikus csendesítését követően. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a *rasberry* géntermék hiányában a darázspete körüli tokképzés során, a melanizációs kaszkád reakció zavart szenved.

A vad típusú lárvákban a darázspetére tapadó plazmatociták és a plazmatocita réteget befedő lamellociták szoros tokba zárva különítik el a betolakodó parazitoidot a testüregben. Ebben a folyamatban olyan adhéziós és sejt-sejt kapcsolatokat kialakító molekulák vesznek részt, mint például az integrinek vagy a Neuroglian [Irving és mtsai., 2005; Williams, 2009]. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy darázsfertőzést követően mind a *ras*<sup>2</sup> mutánsban, mind a *rasberry* géntermék kettősszalú RNS-sel történő véresejt specifikus csendesítését követően megemelekedett a laza szerkezetű tokok aránya a kontroll törzsekhez képest. Hasonló fenotípust

figyeltek meg a tumorképződésben szerepet játszó JAK/STAT jelátviteli útvonalban résztvevő GTP-kötő fehérje, a heterotrimerikus G protein  $\alpha$  alegysége, a Ga73B szintjének *Hop<sup>T42</sup>* háttéren történő csökkentése során [Bausek és Zeidler, 2014]. Ez esetben a *Hop<sup>T42</sup>*-ban megfigyelt pretumorokhoz képest, az alacsony Ga73B szint következtében csak lazán kapcsolódó sejt aggregátumok keletkeztek és nem alakultak ki a *Hop<sup>T42</sup>* adultokban megfigyelt tömör szerkezetű melanizált tumorok [Bausek és Zeidler, 2014]. A Ga73B fehérje az immunválsz során szerepet játszik a Rho1 aktiválásában és a filopódiumokban történő lokalizációjában [Weinstein és mtsai., 2006], de a lamellociták differenciálódására nincs hatással [Weinstein és mtsai., 2006].

Megvizsgáltuk, hogy a tokképzés csökkent hatékonyságának háttérében véresejtképződési zavar áll-e. Bár a *ras<sup>2</sup>* mutáns keringésében kevesebb hemocitát számoltunk, mint a vad típusban a különbség nem volt szignifikáns, és abnormális lamellocita differenciálódást sem tapasztaltunk, a lamellociták a vad típushoz hasonlóan immunindukciót követően megjelentek a keringésben [Kari és mtsai., 2016].

Kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy *raspberry* gén szerepet játszhat a lamellociták parazita petékhez történő kitapadásában. A véresejtek adhéziója során citoszkeletális átrendeződések játszódnak le, lamellopódiumok és filopódiumok alakulnak ki, melyben a kis GTP-áz *Rac2* molekula is szerepet játszik [Stramer és mtsai., 2005; Williams és mtsai., 2005; 2007]. Kísérleteink során darázsfertőzést követően megvizsgáltuk a *ras<sup>2</sup>* mutáns lárvákban a keringő hemociták morfológiai jellemzőit és meghatároztuk a keringésben előforduló filopódiummal rendelkező hemociták számát. Vizsgálatainkba bevontuk a *Rac2<sup>A</sup>* és *ras<sup>2</sup>; Rac2<sup>A</sup>* mutánsokat is. Eredményeink szerint a *ras<sup>2</sup>*, a *Rac2<sup>A</sup>* és a *ras<sup>2</sup>; Rac2<sup>A</sup>* mutánsokban is szignifikánsan csökkent a filopódiumokkal rendelkező hemociták száma a vad típusú *Oregon-R*-hez képest. A *Drosophila* *raspberry* gén mutációja, illetve az RNS interferencia általi géncsendesítése kedvezőtlenül hathat az általa kódolt IMPDH enzim és ezen keresztül, a GTP molekulák termelődésére, amelyek a hemociták motilitásához és kitapadásához szükséges lamellopódiumok és filopódiumok képződésében nélkülözhetetlen kis GTPázok és G proteinek megfelelő működéséhez is szükségesek. Azonban további kísérletek szükségesek annak tisztázására, hogy az IMPDH fehérje kizárólag a katalitikus enzim funkciója, vagy a DNS kötő szerepe, esetleg mindkét funkciója együttesen játszik-e szerepet a *Drosophila* parazitoid darázs elleni sejt-közvetítette immunválszában. Vizsgálataink szerint a *raspberry* gén szerepet játszik a parazitoid darázspete

körül kialakuló a tokképzésben és a gazdaszervezet fertőzést követő túlélésében, valószínűleg az immunválasz folyamatainak zavartalan működéséhez szükséges GTP szintézisében betöltött szerepe miatt [Kari és mtsai., 2016].

## 6. Összefoglalás

PhD munkám során *Drosophila melanogaster* modellszervezetben egy olyan új szeptikus sérülési modellt dolgoztam ki, amely alkalmas a patogén-gazdaszervezet kölcsönhatásokban résztvevő faktorok azonosítására és jellemzésére, valamint különböző anyagok antimikrobiális hatásának *in vivo* tesztelésére.

Szeptikus sérülést követően a *Drosophila* szervezetébe jutó mikroorganizmusok humorális faktorok és immunsejtek együttműködésén alapuló immunválaszt indukálnak [Stramer és Dionne, 2014]. A kutikula sérülése koagulációs kaszkád reakciót vált ki, melynek következtében a seb körül a hemolimfa megalvad [Theopold és mtsai., 2014]. Az alvadék megakadályozza a hemolimfavesztést, de az immunvédekezésben is fontos szerepet játszik, mivel a mikrobák megkötésével megakadályozza bejutásukat a gazdaszervezetbe [Wang és mtsai., 2010; Krautz és mtsai., 2014]. A hemolimfa koagulációja során a profenoloxidáz enzim kaszkád is aktiválódik, ennek következtében melanin és szabad gyökök képződnek, amelyek toxikusak a kórokozók számára [Tang, 2009]. Amennyiben a patogének mégis bekerülnek a testüregbe, szisztémás immunválaszt váltanak ki, melynek során a sejt-közvetítette immunválasz és a humorális immunrendszer is aktiválódik [Stramer és Dionne, 2014]. A sejt-közvetítette immunválasz végrehajtó elemei a vérsejtek, amelyek három osztályba sorolhatóak: a plazmatociták, a lamellociták és a kristálysejtek [Rizki és Rizki, 1980; Kurucz és mtsai., 2007a; Kurucz és mtsai., 2003; Rus és mtsai., 2006]. A plazmatociták kis, szférikus sejtek, a legnagyobb számban jelenlévő vérsejtpopulációt alkotják, a baktériumok és apoptótikus sejtek bekebelezésében, továbbá a noduláció folyamatában van szerepük. A kristálysejtek a melanizációs folyamatok nélkülözhetetlen elemei [Bidla és mtsai., 2007; Dudzik és mtsai., 2015]. A lamellociták immunindukció hatására differenciálódnak a lárvaiban, és a tokképző folyamatokban vesznek részt, amely során a plazmatocitákkal együtt több rétegben körül veszik a nagyméretű, nem fagocitálható testidegen részecskéket, mint például a parazitoid fürkészdarazsak petéit [Russo és mtsai., 1996; Williams és mtsai., 2005; 2006; Mortimer és mtsai., 2013]. A humorális immunválasz során antimikrobiális peptidek termelődnek. Az antimikrobiális peptideket kódoló gének átírását két NF- $\kappa$ B-szerű jelátviteli út vonal szabályozza [Myllymäki és mtsai., 2014; Lindsay és Wassermann, 2014]. A Toll út vonalat többnyire a lizin-típusú peptidoglikánnal rendelkező Gram-pozitív baktériumok, míg az Imd út vonalat a DAP-

típusú peptidoglikánnal rendelkező Gram-negatív és a *Bacillus* génuszba tartozó Gram-pozitív baktériumok és gombák aktiválják [Leulier és mtsai., 2003; Neyen és mtsai., 2012].

Az immunvédekezésben szerepet játszó genetikai faktorok azonosítására a természetes élőhelyen létrejövő sérüléseket imitáló módszert dolgoztunk ki, mely alapvetően különbözik a korábban általánosan használt módszerektől [Lemaitre és mtsai., 1997]. Az általunk kidolgozott eljárásban az egyedek tarzális szegmentjeinek eltávolítása hűen modellezi a természetes körülmények között létrejövő szeptikus sérülést és a mechanikai sérülés önmagában nem befolyásolja az egyedek életképességét [Kari és mtsai., 2013].

A sérült egyedeket GFP-t termelő *Escherichia coli* baktérium pázsitot tartalmazó táptalajon tartottuk és bemutattuk, hogy az így okozott sérülésen keresztül a baktériumok bejutnak az állatok testüregébe. A sértetlen és sérült állatok Gram-negatív *Serratia marcescens* és *Escherichia coli*, valamint Gram-pozitív *Bacillus cereus* var. *mycoides* baktériumfertőzése azt mutatta, hogy az ecetmuslicák pusztulását minden esetben az okozott sérülésen keresztül bejutó mikroorganizmusok váltották ki. Módszerünk validálását a humorális immunválaszban már ismert szerepet játszó gének a *spätzle*, *Dredd*, *Relish* és a koagulációban résztvevő *Hemolectin* (*Hml*) mutáns alléljait tartalmazó *Drosophila* törzsek felhasználásával végeztük [Manfruelli és mtsai., 1999; Weber és mtsai., 2003; Leulier és mtsai., 2000; Dushay és mtsai., 1996; Goto és mtsai., 2001]. A *Hml* mutánssal kapott eredményeink rávilágítottak arra, hogy a Hemolectinnek nemcsak a lárva hemolimfa koagulációjában, hanem az adult ecetmuslica véralvadásában is fontos szerepe van.

Szeptikus sérülési modellünk felhasználásával az immunválaszban szerepet játszó új géneket is azonosítottunk, többek között a *Drosophila* inozin-monofoszfát-dehidrogenáz (IMPDH) enzimet kódoló gént, a *raspberryt*, amely a GMP szintézis kulcsenzime. A guanin nukleotidok nélkülözhetetlen szerepet játszanak a sejtek proliferációjában és differenciálódásában, a sejtosztódásban, jelátvitelben és az apoptózisban [Hedstrom, 2009]. Emlősökben a *de novo* GMP szintézisnek szerepe van a limfociták proliferációjában és az immunválaszban [Zimmermann és mtsai., 1998; Vethe és mtsai., 2014]. Eredményeink szerint a *raspberry* részt vesz az adult ecetmuslicák szeptikus sérülését követő baktériumfertőzés leküzdésében, valamint a lárva parazitoid darázsfertőzést követő sejt-közvetítette immunválaszában, a tokképzésben. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a *L. bouvardi* G486

által fertőzött *raspberry* mutáns bábokból, valamint a *raspberry* gén hemocita specifikus csedesítését követően kifejlődött bábokból szignifikánsan több darázs kelt ki, mint a vad típusú *Oregon-R* bábokból. Azt is megfigyeltük, hogy a darázzsal fertőzött lárvákban csökkent a teljesen melanizált darázspeték száma, míg a részlegesen melanizált darázspeték, valamint az élő darázs lárvák aránya szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a vad típushoz, illetve a szülői kontrollokhoz képest. Ezen kívül mind a *raspberry* mutánsban, mind a *raspberry* gén hemocita specifikus csedesítését követően magasabb volt a laza szerkezetű tokok aránya a kontrollokhoz képest, ami arra utal, hogy a *raspberry* gén által kódolt IMPDH szükséges a lamellociták darázspetéhez történő kitapadásához. Eredményeinkből arra következtünk, hogy a *raspberry* mutációja miatt kevésbé hatékonyan működnek azok a GTP igényes jelátviteli útvonalak és immunfolyamatok, amelyek a parazitoid darázs pete felismeréséhez és elpusztításához szükségesek. A *Drosophila raspberry* gén mutációja, illetve az RNS interferencia általi géncsökkentése kedvezőtlenül hathat az általa kódolt IMPDH enzim és ezen keresztül, a GTP molekulák termelésére, amelyek a lamellopodiumok és filopodiumok képződésében nélkülözhetetlen kis GTPázok és G proteinek megfelelő működéséhez szükségesek [Kari és mtsai., 2016].

Kidolgoztunk egy új szeptikus sérülési modellt *Drosophilában*, amely a természetben is előforduló sérülést modellezi, és alkalmas a szeptikus sérülést követően a kórokozókkal szembeni védelemben, a koagulációban, sebgyógyulásban szerepet játszó faktorok azonosítására, továbbá antimikrobiális anyagok tesztelésére [Kari és mtsai., 2013]. A módszer felhasználásával új géneket azonosítottunk, amelyek szerepet játszanak a szeptikus sérülést követő túlélésben. A *raspberry* által kódolt IMPDH-ról kimutattuk, hogy szerepet játszik a parazitoid darázspete körül kialakuló a tokképzésben és a gazdaszervezet fertőzést követő túlélésében. Eredményeinkből arra következtünk, hogy a *raspberry* mutációja miatt kevésbé hatékonyan működhetnek azok a GTP igényes jelátviteli útvonalak és immunfolyamatok, amelyek a parazitoid darázs pete felismeréséhez és elpusztításához szükségesek [Kari és mtsai., 2016].

## 7. Summary

Insects are armed with an evolutionarily conserved cell mediated immune-defense mechanism, which may serve as a prototype of innate immunity in all phyla of the animal kingdom [Buchon et al., 2014]. The fruit fly, *Drosophila melanogaster*, with its phylogenetically conserved innate immune system and well known genetic system, is one of the most frequently used model organisms to study regulation of cell mediated immune defense and has been widely used model organism to study host response to microbial and parasitic infections [Stramer és Dionne, 2014]. The effector cells of the cellular immune response in the fruit fly are called hemocytes. The subsets of hemocytes exert a concerted action in the cell mediated immune response [Vlisidou et al., 2015]. The plasmatocytes engulf microorganisms, the crystal cells are involved in melanization and the lamellocytes participate in the encapsulation of large foreign particles. Lamellocytes, the encapsulating cells, may develop from phagocytic plasmatocytes upon immune induction [Honti et al., 2010; 2013]. In the course of plasmatocyte-lamellocyte transition the morphological and functional changes can be monitored by the expression pattern of hemocyte-specific marker molecules; the plasmatocyte-specific markers become silenced and markers, defining subsets of lamellocytes, are expressed sequentially [Honti et al., 2010].

The external chitin cuticle is the first barrier that protects insects from microbial invasion. Pathogens entering the hemocoel trigger a systemic immune response with cell-mediated and humoral components [Stramer and Dionne, 2014]. Injury of the cuticle activates hemolymph clotting, which blocks the loss of body fluids and the spreading of the microorganisms into the hemocoel by immobilizing bacteria at the wound site [Wang et al., 2010 Theopold et al., 2014]. The cell-mediated arm of the immune response is carried out by the hemocytes, the production of antimicrobial peptides are regulated by the Toll and the Imd (immune deficiency) signaling pathways [Myllymäki et al., 2014; Lindsay and Wassermann, 2014].

To identify novel factors involved in the response to septic injury in *Drosophila melanogaster* we developed and validated a new method [Kari et al., 2013]. This method, based on inducing lesion by removing the tarsal segments of the first pair of legs of *Drosophila* adults, imitating injury that often occurs in the natural habitat and exposing them to different bacteria. The technique was validated by using different *Drosophila* mutants known to be involved in the blood clotting or in the regulation of the humoral and the cell-mediated immune response.

We found that the injury itself does not affect the survival of the animals, except for the *Hml* mutants, which lose more hemolymph after wounding and showed decreased survival rate following both sterile and septic injury compared to the control. Our result showed that beside the important role of Hemolectin in larval hemolymph clotting, it is also involved in the wound healing of the adult flies.

We used *E. coli*, *B. cereus* and *S. marcescens* which did not significantly altered the survival of the investigated mutants (*spz<sup>2</sup>/spz<sup>4</sup>*, *Dredd<sup>EP1412</sup>*, *Rel<sup>E20</sup>* and *Hml<sup>f03374</sup>*) and control flies without injury. However after injury the Imd pathway mutants *Dredd<sup>EP1412</sup>* and *Rel<sup>E20</sup>* and also the hemolymph clotting factor Hemolectin (*Hml<sup>f03374</sup>*) mutant flies showed reduced viability after either *B. cereus* or *E. coli* infection, while the *spätzle* (*spz<sup>2</sup>/spz<sup>4</sup>*), involved in the Toll pathway, was significantly sensitive to *B. cereus* infection. These results show that our new septic injury method is suitable for high-scale screening of key factors involved in host-pathogen interactions. The major advantage of our method is that the wound by itself is insignificant; the effect on survival can be attributed entirely to the infection and the defensive capabilities of the host organism [Kari et al., 2013].

Using this novel septic injury method, we found that the *raspberry* gene is involved in the survival of the flies after septic injury since the survival rate of the mutants decreased significantly after *B. cereus* infection. This gene encodes the *Drosophila* inosine monophosphate dehydrogenase, which is a key enzyme of the *de novo* synthesis of guanine nucleotides. Guanine nucleotides are critical for cell proliferation and differentiation, cell division, cell signaling and apoptosis [Hedstrom, 2009]. In mammals, *de novo* GMP synthesis is required for lymphocyte proliferation and in the immune [Zimmermann et al., 1998; Vethe et al., 2014].

We investigated the role of *raspberry* in the immune response of the *Drosophila* larvae, especially in the encapsulation reaction after infection with the parasitic wasp *Leptopilina bouvardi* G486. After wasp infestation in the mutants the proportion of living wasp larvae was significantly higher compared to the *Oregon-R* control, while in the *Oregon-R* the proportion of the encapsulated and melanized wasp larvae was significantly higher. The capsules in *raspberry* mutants showed a loosened structure, the lamellocytes attached improperly to the wasp eggs causing a defective encapsulation reaction. We observed the same phenomena using two different *raspberry* RNAi constructs. The eclosion rate of wasps was higher in the *raspberry*



mutants than in the wild type control group. The results show that *raspberry* has a role in the defense against the parasitic wasp *Leptopilina boulardi* and is required for a proper encapsulation response [Kari et al., 2016].

We established a new method for screening factors involved in the response to septic injury in *Drosophila melanogaster*. The method is suitable for genetic screens with the aim of identifying factors involved in host–pathogen interactions. The technique was validated by using mutant variations of different components of the immune response, blood clotting as well as the involvement of a number of genes known to be instrumental in the humoral and cell-mediated immune responses of *Drosophila*. It also allows the screening of potential antimicrobial drugs in vivo [Kari et al., 2016].

We found that *Drosophila* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH), encoded by *raspberry* (*ras*), is required for a proper cellular immune response against eggs from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*. The hemocyte attachment to the egg and subsequent melanization of the capsule are deficient in hypomorphic *ras* mutant larvae, which results in a compromised cellular immune response and increased survival of the parasitoid. Possible explanation for the role of *raspberry* in the encapsulation reaction is that it encodes the rate-limiting enzyme for GTP synthesis and thus influences the function of enzymes requiring GTP. It is known that G proteins and small GTPases are involved in the regulation of processes related to the immune response. However, further studies must be conducted to elucidate the exact pathways affected in the case of decreased IMPDH level in the encapsulation reaction [Kari et al., 2016].

## 8. Köszönetnyitvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Andó Istvánnak szakmai iránymutatásáért és azért, hogy a csoportjában dolgozhattam. Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Kurucz Évának szakmai irányításáért, a munka minden fázisában nyújtott folyamatos segítségéért, türelméért és támogatásáért.

Köszönönetet mondok minden munkatársamnak, akikkel az évek során egy csoportban dolgoztam, Csordás Gábornak, Dr. Honti Vikornak, Dr. Zsámboki Jánosnak, Dr. Márkus Róbertnek, Dr. Cinege Gyöngyinek, Lerner Zitának, Gábor Erikának, Varga Gergely Istvánnak a szakmai segítségükért, hasznos tanácsaikért és barátságukért. Köszönettel tartozom Kovalcsik Olgának, Balázs Anitának, Képiró Anikónak és Tápai Szilviának technikai és emberi segítségnyújtásukért.

Köszönettel tartozom továbbá az SZBK Genetikai Intézet dolgozóinak, valamint a SZBK hatodik emeleti *Drosophila* közösségének, kiemelelvén Dr. Erdélyi Miklóst, és Dr. Vilmos Pétert, hogy támogatásukkal hozzájárultak a dolgozat létrejöttéhez. Köszönönettel tartozom Dr. Darula Zsuzsannának (MTA SZBK, Tömegspektrometriai Laboratórium) és Kotogány Editnek (MTA SZBK, Áramlási citométer/Sejtszorter Laboratórium).

Köszönetemet szeretném kifejezni opponenseimnek, Dr. Pál Margitnak és Dr. Sinka Ritának, amiért elvállalták PhD dolgozatom bírálatát.

Szeretnék köszönetet mondani egykori gimnáziumi biológia tanáromnak, Leopold Anna Máriának, amiért megkedveltette velem a biológiát, a genetikát.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy támogatták tanulásomat, mindenben számíhattam rájuk, és hogy kitartottak mellettem.

A Ph.D. fokozat megszerzését a következő pályázatok tették lehetővé: OTKA NK-101730 (Andó István), GINOP-2.3.2-15-2016-00035 (Kurucz Éva), OTKA K-68830 (Kurucz Éva), Carl Tryggers Stiftelsen (Michael J. Williams), GINOP-2.3.2-15-2016-00001 (Andó István).

## 9. Irodalomjegyzék

- Agaisse H, Petersen UM, Boutros M, Mathey-Prevot B, Perrimon N. 2003. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell*. 5, 441–450
- Akhouayri I, Turc C, Royet J, Charroux B. 2011. Toll-8/Tollo negatively regulates antimicrobial response in the *Drosophila* respiratory epithelium. *PLoS Pathog.* (10):e1002319.
- Anderson KV, Nüsslein-Volhard C. 1984. Information for the dorsal--ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*. 20-26;311(5983):223-7.
- Arnot C.J, Gay, N.J, Gangloff, M. Molecular mechanism that induces activation of Spätzle, the ligand for the *Drosophila* Toll receptor. *J Biol Chem*. 2010; 285(25):19502-9.
- Asha H, Nagy I, Kovács G, Stetson D, Andó I, Dearolf CR. 2003. Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics*. 163(1):203-15.
- Bausek N, Zeidler MP. 2014.  $G\alpha 73B$  is a downstream effector of JAK/STAT signalling and a regulator of Rho1 in *Drosophila* haematopoiesis. *J Cell Sci*. 1;127(Pt 1):101-10.
- Bidla G, Hauling T, Dushay MS, Theopold U. 2009. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun*. 1(4):301-8.
- Bidla G, Lindgren M, Theopold U, Dushay MS. 2005. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev Comp Immunol*. 29(8):669-79
- Bidla G, Dushay MS, Theopold U. 2007. Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J. Cell Sci*. 120, 1209–1215
- Boman HG, Nilsson I, Rasmuson B. 1972. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature*. 26;237(5352):232-5.
- Bou Aoun R, Hetru C, Troxler L, Doucet D, Ferrandon D, Matt N. 2011. Analysis of thioester-containing proteins during the innate immune response of *Drosophila melanogaster*. *J Innate Immun*. 3(1):52-64.
- Buchon N, Silverman N, Cherry S. 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol*. 12:796-810.
- Burrige K, Wennerberg K. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 23;116(2):167-79. Review.

- Carton Y, Nappi AJ. 1997. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol Today*. 13(6):218-27.
- Charroux B, Royet J. 2009. Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the *Drosophila* immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 9797–9802
- Cerenius L, Lee BL, Soderhall K. 2008. The proPOsystem: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*. 29, 263–271.
- Cerenius L, Söderhäll K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev*. 198:116-26. Review
- Chen L, Pankiewicz KW. 2007. Recent development of IMP dehydrogenase inhibitors for the treatment of cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 10(4):403-12.
- Cherry S, Silverman N. 2006. Host-pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend. *Nat Immunol*. 7(9):911-7. Review.
- Choe KM, Werner T, Stoven S, Hultmark D, Anderson KV. 2002. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science* 296, 359–362.
- Crew, J.R., Batterham, P., Pollock, J.A., 1997. Developing compound eye in lozenge mutants of *Drosophila*: lozenge expression in the R7 equivalence group. *Dev Gene Evol* 206, 481–493.
- Cuttell L, Vaughan A, Silva E, Escaron CJ, Lavine M, Van Goethem E, Eid JP, Quirin M, Franc NC. 2008. Undertaker, a *Drosophila* Junctophilin, links Draper-mediated phagocytosis and calcium homeostasis. *Cell*. 135(3):524-34.
- Defaye A, Evans I, Crozatier M, Wood W, Lemaitre B, Leulier F. 2009. Genetic ablation of *Drosophila* phagocytes reveals their contribution to both development and resistance to bacterial infection. *J Innate Immun*. 1(4):322-34.
- De Gregorio E, Han SJ, Lee WJ, Baek MJ, Osaki T, Kawabata S, Lee BL, Iwanaga S, Lemaitre B, Brey PT. 2002. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev Cell*. 3(4):581-92.
- Dudzic JP, Kondo S, Ueda R, Bergman CM, Lemaitre B. 2015. *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biol*. 1;13(1):81.
- Dushay MS, Asling B, Hultmark D. 1996. Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17;93(19):10343-7.

- Eleftherianos I, Boundy S, Joyce SA, Aslam S, Marshall JW, Cox RJ, Simpson TJ, Clarke DJ, French-Constant RH, Reynolds SE. 2007. An antibiotic produced by an insectpathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2419–2424
- Eleftherianos I, Revenis C. 2011. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *J Innate Immun.* 3(1):28-33.
- Engstrom Y, Kadalayil L, Sun SC, Samakovlis C, Hultmark D, Faye I. 1993.  $\kappa$ B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 232:327–33
- Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA. 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol.*; 7(11):862-74. Review
- Ferrandon D, Jung AC, Criqui M, Lemaitre B, Uttenweiler-Joseph S, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann JA. 1998. A *drosomycin-GFP* reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.* 10;17(5):1217-27.
- Franc NC, Heitzler P, Ezekowitz RA, White K. 1999. Requirement for *croquemort* in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science.* 18;284(5422):1991-4.
- Gandhe AS, John SH, Nagaraju J. 2007. Noduler, a novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects. *J Immunol.* 15;179(10):6943-51
- Gateff E, Kurzik-Dumke U, Wismar J, Loeffler T, Habtemichael N, Konrad L, Dreschers S, Kaiser S, Protin U. 1996. *Drosophila* differentiation genes instrumental in tumor suppression. *Int. J. Dev. Biol.* 40(1): 149--156.
- Georgel P, Naitza S, Kappler C, Ferrandon D, Zachary D, Swimmer C, Kopczynski C, Duyk G, Reichhart JM, Hoffmann JA. 2001. *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev Cell.* 1(4):503-14
- Goto A, Kumagai T, Kumagai C, Hirose J, Narita H, Mori H, Kadowaki T, Beck K, Kitagawa Y. 2001. A *Drosophila* haemocyte-specific protein, hemolectin, similar to human von Willebrand factor. *Biochem. J.* 359, 99–108.
- Gregory SL, Shandala T, O'Keefe L, Jones L, Murray MJ, Saint R. 2007. A *Drosophila* overexpression screen for modifiers of Rho signalling in cytokinesis. *Fly (Austin).* 1(1):13-22.
- Harrison DA, Binari R, Stines Nahreini T, Gilman M, Perrimon, N. 1995. Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.* 14: 2857–2865.

- Hashimoto Y, Tabuchi Y, Sakurai K, Kutsuna M, Kurokawa K, Awasaki T, Sekimizu K, Nakanishi Y, Shiratsuchi A. 2009. Identification of lipoteichoic acid as a ligand for *draper* in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* hemocytes. *J Immunol* 183, 7451–7460.
- Hedstrom L. 2009. IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. *Chem Rev.* 109(7):2903-28.
- Helming L, Gordon S. 2009. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol.* 19(10):514-22.
- Honti V, Csordás G, Márkus R, Kurucz É, Jankovics F, Andó I. 2010. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Immunol.* 47 (11–12), 1997–2004.
- Honti V, Csordás G, Kurucz É, Márkus R, Andó I. 2014. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev Comp Immunol.* 42(1):47-56.
- Ip YT, Reach M, Engstrom Y, Kadalayil L, Cai H, Gonzalez-Crespo S, Tatei K, Levine M. 1993. *Dif*, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell.* 19;75(4):753-63.
- Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, Hoffmann JA, Hetru C, Meister M. 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol.* 7, 335–350
- Iwanaga S, Kawabata T Muta. 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J Biochem (Tokyo)*, 123, pp. 1–15
- Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology.* 211(4):213-36.
- Kang D, Liu G, Lundström A, Gelius E, Steiner H. 1998. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18;95(17):10078-82.
- Kari B, Csordás G, Honti V, Cinege G, Williams MJ, Andó I, Kurucz É. 2016. The *raspberry* gene is involved in the regulation of the cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 11(3): e0150910. doi:10.1371/journal.pone.0150910
- Kari B, Zsámboki J, Honti V, Csordás G, Márkus R, Andó I, Kurucz É. 2013. A novel method for the identification of factors involved in host-pathogen interactions in *Drosophila melanogaster*. *J Immunol Methods.* 398-399:76-82.

Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, Strom C, Conto SL, Hetru C, Stuart LM, Stehle ., Hoffmann JA, Reichhart JM, Ferrandon D, Rämet M, Ezekowitz RA. 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell*. 123(2):335-46.

Kounatidis I, Ligoxygakis P. 2012. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol*. 2(5):120075.

Kurata S. 2014. Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev Comp Immunol*. 42(1):36-41.

Kurucz É, Váczi B, Márkus R, Laurinyecz B, Vilmos P, Zsámboki J, Csorba K, Gateff E, Hultmark D, Andó I. 2007a. Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biol Hung*. 58 Suppl:95-111.

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

Kurucz É, Zettervall CJ, Sinka R, Vilmos P, Pivarcsi A, Ekengren S, Hegedűs Z, Andó I, Hultmark D. 2003. *Hemese*, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4;100(5):2622-7.

Krautz R, Arefin B, Theopold U. 2014. Damage signals in the insect immune response. *Front Plant Sci* 5, 342.

Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capovilla M, Hoffmann JA. 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 11427–11432.

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

Lemaitre, B., Hoffmann, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol*. 25:697-743. Review

Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(26):14614-9.

Leone P, Bischoff V, Kellenberger C, Hetru C, Royet J, Roussel A. 2008. Crystal structure of *Drosophila* PGRP-SD suggests binding to DAP-type but not lysine-type peptidoglycan. *Mol Immunol*. 45(9):2521-30.

- Lesch C, Goto A, Lindgren M, Bidla G, Dushay MS, Theopold U. 2007. A role for *Hemolectin* in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Dev Comp Immunol* 31, 1255–1263.
- Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu JH, Caroff M, Lee WJ, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B. 2003. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol.* 4(5):478-84.
- Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, Jiang H, Hoffmann JA, Reichhart JM. 2002. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *EMBO J.* 2;21(23):6330-7.
- Lindgren M, Riazi R, Lesch C, Wilhelmsson C, Theopold U, Dushay MS. 2008. Fondue and transglutaminase in the *Drosophila* larval clot. *J Insect Physiol* 54, 586–592.
- Lindsay SA, Wassermann SA. 2014. Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. *Dev Comp Immunol.*42(1):16-24.
- Lionakis MS, Kontoyiannis DP. 2012. *Drosophila melanogaster* as a model organism for invasive aspergillosis. *Methods Mol Biol.*; 845:455-68.
- Long H, Cameron S, Yu L, Rao Y. 2006. *De novo* GMP synthesis is required for axon guidance in *Drosophila*. *Genetics.* 172(3):1633-42.
- Loof TG, Schmidt O, Herwald H, Theopold U. 2011. Coagulation systems of invertebrates and vertebrates and their roles in innate immunity: the same side of two coins? *J Innate Immun.* 3(1):34-40.
- Lorand L, Graham RM. 2003. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(2):140-56. Review.
- Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, Nakanishi Y. 2004 . Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem.* 12;279(46):48466-76
- Mandal L Banerjee U, Hartenstein V. 2004. Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet.* 36(9):1019-23.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 4805–4809.



- Martinek N, Shahab J, Saathoff M, Ringuette M. 2008. Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci.* 121: 1671–1680.
- Méndez-Samperio P. 2014. Peptidomimetics as a new generation of antimicrobial agents: current progress. *Infect Drug Resist.* 30;7:229-37.
- Meng X, Khanuja BS, Ip YT. 1999. Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires *Dif*, an NF-kappaB factor. *Genes Dev.* 1; 13(7): 792–797.
- Moreira S, Stramer B, Evans I, Wood W, Martin P. 2010. Prioritization of competing damage and developmental signals by migrating macrophages in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 20, 464–470.
- Mortimer NT. 2013. Parasitoid wasp virulence: A window into fly immunity. *Fly (Austin).* 7(4):242-8.
- Mortimer NT, Goecks J, Kacsoh BZ, Mobley JA, Bowersock GJ, Taylor J, Schlenke TA. 2013. Parasitoid wasp venom SERCA regulates *Drosophila* calcium levels and inhibits cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 9427–9432.
- Mortimer NT, Kacsoh BZ, Keebaugh ES, Schlenke TA. 2012. Mgat1-dependent N-glycosylation of membrane components primes *Drosophila melanogaster* blood cells for the cellular encapsulation response. *PLoS Pathog* 8, e1002819.
- Mortimer SE, Hedstrom L. 2005. Autosomal dominant *retinitis pigmentosa* mutations in inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type I disrupt nucleic acid binding. *Biochem J.* 15;390 (Pt 1):41-7.
- Myllymäki H, Valanne S, Rämet M. 2014. The *Drosophila* Imd signaling pathway. *J Immunol.* 15;192(8):3455-62. Review.
- Nam HJ, Jang IH, Asano T, Lee WJ. 2008. Involvement of pro-phenoloxidase 3 in lamellocyte-mediated spontaneous melanization in *Drosophila*. *Mol Cells.* 31;26(6):606-10.
- Nappi AJ, Frey F, Carton Y. 2005. *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response. *J. Insect Physiol.* 51, 197–205
- Nappi AJ, Vass E, Malagoli D, Carton Y. 2004. The effects of parasite-derived immune-suppressive factors on the cellular innate immune and autoimmuneresponses of *Drosophila melanogaster*. *J Parasitol.* 90(5):1139-49.

- Nash D, Hu S, Leonard NJ, Tiong SY, Fillips D. The raspberry locus of *Drosophila melanogaster* includes an *inosine monophosphate dehydrogenase* like coding sequence. 1994. *Genome*. 37(2):333-44.
- Nehme NT, Liégeois S, Kele B, Giammarinaro P, Pradel E, Hoffmann JA, ... Ferrandon D. 2007. A Model of Bacterial Intestinal Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 3(11), e173.
- Neyen C, Bretscher AJ, Binggeli O, Lemaitre B. 2014. Methods to study *Drosophila* immunity. *Methods*. 68(1):116-28. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.02.023. Review.
- Neyen C, Poidevin M, Roussel A, Lemaitre B. 2012. Tissue- and ligand-specific sensing of Gram-negative infection in *Drosophila* by PGRP-LC isoforms and PGRP-LE. *J Immunol*. 189(4):1886-97
- Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N. 2005. *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science*. 309(5738):1251-3.
- Prévost G, Doury G, Mabilia-Moundougou AD, Cherqui A, Eslin P. 2009. Strategies of avoidance of host immune defenses in *Asobara* species. *Adv Parasitol*. 70:235-55.
- Raftopoulou M, Hall A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*. 265(1):23-32. Review.
- Rämet M, Manfrulli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RA. 2002. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature*. 416(6881):644-8.
- Ratcliffe AJ. 2006. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 9(5):595-605.
- Rizki, M.T., Rizki, R.M., 1959. Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J. Biophys. Biochem. Cytol*. 5, 235–240.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M., 1980. Properties of larval hemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 36, 1223–1226.
- Rizki RM, Rizki TM. 1984. Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(19):6154–6158
- Rizki RM, Rizki TM. 1990a. Microtubule inhibitors block the morphological changes induced in *Drosophila* blood cells by a parasitoid wasp factor. *Experientia* 46, 311–315.

- Rizki RM, Rizki TM. 1990b. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87, 8388–8392
- Rizki TM, Rizki RM. 1994. Parasitoid-induced cellular immune deficiency in *Drosophila*. Annals of New York Academy of Sciences 712, 178–194.
- Royet J, Dziarski R. 2007. Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. Nat Rev Microbiol. ;5(4):264-77.
- Russo J, Dupas S, Frey F, Carton Y, Brehelin M. 1996. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. Parasitology 112 (Pt 1), 135–142.
- Samakovlis C, Kimbrell DA, Kylsten P, Engström A, Hultmark D. 1990. The immune response in *Drosophila*: pattern of *cecropin* expression and biological activity. EMBO J. 9: 2969–2976.
- Scherfer C, Karlsson C, Loseva O, Bidla G, Goto A, Havemann J, Dushay MS, Theopold U. 2004. Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. Curr Biol 14, 625–629.
- Schneider DS, Jin Y, Morisato D, Anderson KV. 1994 . A processed form of the Spätzle protein defines dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. Development. 120(5):1243-50.
- Sharma S, Sahoo N, Bhunia A. 2015. Antimicrobial Peptides and their Pore/Ion Channel Properties in Neutralization of Pathogenic Microbes. Curr Top Med Chem. 16(1):46-53.
- Shim J, Lee SM, Lee MS, Yoon J, Kweon HS, Kim YJ. 2010. Rab35 mediates transport of Cdc42 and Rac1 to the plasma membrane during phagocytosis. Mol Cell Biol. 30(6):1421-33.
- Shu Q, Nair V. 2008. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery. Med Res Rev. 28(2):219-32.
- Sinenko SA, Mathey Prevot B. 2004. Increased expression of *Drosophila* tetraspanin, Tsp68C, suppresses the abnormal proliferation of ytr-deficient and Ras/Raf-activated hemocytes Oncogene. 2;23(56):9120-8.
- Slee R, Bownes M. 1995. The *raspberry* locus encodes *Drosophila* inosine monophosphate dehydrogenase. Mol Gen Genet. 25;248(6):755-66.
- Small C, Paddibhatla I, Rajwani R, Govind S. 2012. An introduction to parasitic wasps of *Drosophila* and the antiparasite immune response. J Vis Exp. 7;(63):e3347.

- Sollinger HW, Belzer FO, Deierhoi MH, Diethelm AG, Gonwa TA, Kauffman RS, Klintmalm GB, McDiarmid SV, Roberts J, Rosenthal JT, et al. 1992. RS-61443 (mycophenolate mofetil). A multicenter study for refractory kidney transplant rejection. *Ann Surg.*; 216(4):513-8.
- Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A. 2011. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res.* 2011:217861.
- Stofanko M, Kwon SY, Badenhorst P. 2008. A misexpression screen to identify regulators of *Drosophila* larval hemocyte development. *Genetics.* 2008 Sep;180(1):253-67.
- Stramer BM, Dionne MS. 2014. Unraveling tissue repair immune responses in flies. *Semin Immunol.* 26(4):310-4.
- Stramer B, Wood W, Galko MJ, Redd MJ, Jacinto A, Parkhurst SM, Martin P. 2005. Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during *in vivo* cell migration. *J Cell Biol* 168, 567–573.
- Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD. 2006. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol* 4, e4
- Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, Ezekowitz RA, Moore KJ. 2005. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol.* 1;170(3):477-85.
- Tang H. 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly (Austin).* 3(1):105-11.
- Tang, H. Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C. 2006. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 281, 28097–28104
- Tepass U, Fessler LI, Aziz A, Hartenstein V. 1994. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development.* 120(7):1829-37.
- Theopold U, Krautz R, Dushay MS. 2014. The *Drosophila* clotting system and its messages for mammals. *Dev Comp Immunol.* 42(1):42-6.
- Theopold U, Li D, Fabbri M, Scherfer C, Schmidt O. 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cell Mol Life Sci.*; 59(2):363-72. Review
- Theopold U, Schmidt, O. Söderhäll, K. Dushay M.S. 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol,* 25, pp. 289–294,

- Tokusumi T, Sorrentino RP, Russell M, Ferrarese R, Govind S, Schulz RA. 2009a. Characterization of a lamellocyte transcriptional enhancer located within the *misshapen* gene of *Drosophila melanogaster*. PLoS One. 4(7):e6429.
- Tokusumi T, Shoue DA, Tokusumi Y, Stoller JR, Schulz RA. 2009b. New hemocyte-specific enhancer-reporter transgenes for the analysis of hematopoiesis in *Drosophila*. Genesis. 47(11):771-4.
- Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. 2002. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol. 5(1):102-10.
- Ulvila J, Vanha-Aho LM, Rämetsä M. 2011. *Drosophila* phagocytosis - still many unknowns under the surface. APMIS. 119(10):651-62.
- Vlisidou I, Wood W. 2015. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. FEBS J. Apr;282(8):1368-82.
- Vodovar N, Vinals M, Liehl P, Basset A, Degrouard J, Spellman P, Boccard F, Lemaitre B. 2005. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102(32): 11414--11419.
- Wang Z, Wilhelmsson C, Hyrsil P, Loof TG, Dobes P, Klupp M, Loseva O, Morgelin M, Ikle J, Cripps RM, Herwald H, Theopold U. 2010. Pathogen entrapment by *transglutaminase*—a conserved early innate immune mechanism. PLoS Pathog 6, e1000763.
- Watson FL, Puttmann-Holgado R, Thomas F, Lamar DL, Hughes M, Kondo M, Rebel VI, Schmucker D. 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. Science 309, 1874–1878.
- Weinstein LS, Chen M, Xie T, Liu J. 2006. Genetic diseases associated with heterotrimeric G proteins. Trends Pharmacol Sci. ;27(5):260-6
- Wertheim B, Kraaijeveld AR, Schuster E, Blanc E, Hopkins M, Pletcher SD, Strand MR, Partridge L, Godfray HC. 2005. Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in *Drosophila*. Genome Biol 6, R94.
- Williams MJ, Andó I & Hultmark D. 2005 *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. Genes Cells 10, 813– 823.
- Williams MJ, Wiklund ML, Wikman S, Hultmark D. 2006. Rac1 signalling in the *Drosophila* larval cellular immune response. J Cell Sci 119, 2015–2024.

Wood W, Jacinto A. 2007. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. Nat Rev Mol Cell Biol 8, 542–551

Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M. 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. J Biol Chem. 7;271(23):13854-60.

Zhang GM, Lu ZQ, Jiang HB, Asgari S. 2004. Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clipdomain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. Insect Biochemistry and Molecular Biology 34, 477–483.

Zettervall CJ, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, Kurucz É, Andó I, Hultmark D. 2004. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 28;101(39):14192-7.

## 10. Rövidítések jegyzéke

**AMP:** antimikrobiális peptid

**BSA:** bovine serum albumin (marha szérum albumin)

*Bsk:* Basket

**CRQ:** Croquemort

**DAP:** diaminopimelinsav

**DAPI:** 4'6'-diamidino-2-phenylindole

*Dif:* Dorsal-related immunity factor

*Dome:* Domeless

*Dredd:* Death related ced-3/Nedd2-like caspase

**Dscam:** Down syndrome cell adhesion molecule

EGF (epidermal growth factor)

**FBP-1:** fat body protein-1 (zsírtest fehérje-1)

**FBS:** fetal bovine serum (magzati borjú szérum)

**FITC:** fluorescein isothiocyanate

**GFP:** green fluorescent protein

*He:* Hemese

*hep:* hemipterous

*Hml:* Hemolectin

*hop:* hopscoth

**Ig:** immunglobulin

**Imd:** Immune deficiency

**IMP:** inozin-monofoszfát

**IMPDH:** inozin-monofoszfát-dehidrogenáz

**JAK:** Janus kináz

**JNK:** c-Jun N-terminális kináz

**LG:** lymph gland (központi nyirokszerv)

*l(3)mbn:* lethal(3) malignant blood neoplasm

*msn:* misshapen

*Rel:* Relish

**PAMP:** pathogen-associated molecular patterns ( patogénekre általánosan jellemző molekuláris mintázatok)

**PBS:** Phosphate buffered saline

**PBT:** Phosphate buffered saline-Tween 20

**PG:** peptidoglikán és lipopoliszacharid (LPS),

**PGRP-LC:** Peptidoglycan-recognition protein-LC

**Rho-GEF:** Rho guanine nucleotide exchange factor

**proPO:** profenoloxidáz

**PTU:** 1-fenil-2-tiourea

**SERCA:** sarco-/endoplasmic reticulum calcium ATPase

**ST:** sessile tissue (szesszilis szövet)

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription

*spz: spätzle*

**TEP:** thiolester-containing protein

*UAS: upstream activating sequence*

**Upd3:** Unpaired 3

**VLP:** virus-like particles vírusszerű részecskék

**Zir:** Zizimin-related

**XMP:** xantozin monofoszfát