

A mézelő méh sejt-közvetítette immunitása

Ph.D. értekezés tézisei

Készítette: Gábor Erika

Témavezetők: Dr. Andó István és Dr. Kurucz Judit Éva



MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet, Immunológiai Témacsoport



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

2018.

Szeged

Bevezetés

A mézelő méh a *Hymenoptera* rendbe tartozó, kolóniákban élő, kozmopolita elterjedésű rovar. Az egyik legfontosabb faj a növények beporzásában, ezáltal a biodiverzitás fenntartásában, valamint pótolhatatlan egyes kozmetikai, gyógyszeripari élelmiszeripari alapanyagok előállításában és a méztermelésben. A méhkolóniákat különböző mikrobák és paraziták károsíthatják, amelyekkel szembeni védekezésben az egyedek veleszületett immunrendszerének kitüntetett szerepe van. A méhkolóniák tömeges pusztulása az utóbbi években világszerte egyre gyakoribbá vált, súlyos gazdasági következményeket vonva maga után. A gazdasági károk csökkentése érdekében, fontos megismernünk a kórokozók és gazdaszervezet közötti kölcsönhatásokat, amelyhez elsősorban a gazdaszervezet immunrendszerének megismerésén keresztül vezet az út.

A mézelő méh egyedei a többi rovarfajhoz hasonlóan veleszületett immunitással rendelkeznek, amelynek fő elemei az antimikrobiális peptidek termelésével jellemezhető humorális- és a vérsejtek közreműködésével megvalósuló sejt-közvetítette immunválasz. Mivel a mézelő méh családokban élő, euszociális faj, egyedi, a kórokozó mikroorganizmusok és paraziták elleni immunitás mellett olyan alternatív védekezési stratégiákat is alkalmaz, mint a tisztogatási tevékenység vagy a „kaptárláz”. Annak ellenére, hogy a szociális közeg kedvez a fertőzések gyors terjedésének, a mézelő méh egyedeinek genomjában jóval kevesebb immunválaszban szerepet játszó gént azonosítottak, mint a nem euszociális viselkedésű, magányosan élő rovarfajok genomjában.

A mézelő méh sejt-közvetítette immunválaszában szerepet játszó molekuláris mechanizmusokról keveset tudunk. A vérsejtek, az ún. hemociták alpopulációinak azonosítását korábban a vérsejtek morfológiai jegyei és lektinkötési képességük alapján végezték, amely a különböző laboratóriumokban más-más eredményre vezetett. A vérsejttípusok funkciója, leszármazási vonalai nem ismertek és a mézelő méhben eddig vérsejtképző szöveteket sem sikerült azonosítani.

Célkitűzések

Napjainkban a biotikus és abiotikus faktorok által okozott tömeges méhpusztulás világszerte súlyos ökológiai és gazdasági károkat okoz. A méhpusztulás okainak részletes feltárásához járulhat hozzá a méhek természetes védekezési folyamatainak és immunrendszerének megismerése. A méhek euszociális viselkedéséből adódó alternatív védekezési stratégiákat, valamint az egyedi immunválasz humorális folyamatait már részletesen tanulmányozták, azonban a sejt-közvetítette immunválasz molekuláris folyamatairól keveset tudunk, ezért kísérleteinkben célul tűztük ki:

1. a mézelő méh vérsejtjeinek és sejt-közvetítette immunrendszerének molekuláris szintű jellemzésére alkalmas vizsgálati rendszer létrehozását,
2. a mézelő méh lárvák és dolgozók vérsejtjein megnyilvánuló markerekkel kapcsolódó monoklonális ellenanyagok előállítását, a vérsejt alpopulációk jellemzését,
3. az azonosított vérsejt alpopulációk szerepének meghatározását a különböző kasztokban és az egyedfejlődés egymást követő szakaszaiban,
4. az azonosított molekuláris markerek részletes jellemzését és a kódoló gének meghatározását,
5. a szervezet első védelmi vonalában szerepet játszó fehérjék megismerését, a fizikai védekezést szolgáló kutikulában megnyilvánuló *Drosophila melanogaster* Vajk fehérjék homológjainak vizsgálatát a mézelő méhben.

Alkalmazott módszerek

1. Vérsejtpreparátumok készítése
2. Ellenanyagok előállítása
3. Immunhisztokémiai vizsgálatok
4. Indirekt immunfluoreszcens vizsgálatok
5. Permeabilizált, fixált vérsejtek áramlási citometriás vizsgálata
6. Baktériumok FITC jelölése
7. A vérsejtek fagocitáló képességének vizsgálata
8. A hemolimfa alvadék vizsgálata
9. Az idegen test elhatárolásának vizsgálata
10. Immunprecipitáció
11. Western blot analízis
12. Ezüsfestés
13. Duplaszálú RNS készítése (dsRNS) és RNS interferencia
14. Statisztikai elemzések
15. Mikroszkópos vizsgálatok

Az eredmények összefoglalása

1. A mézelő méh különböző véresejtípusainak elkülönítése céljából, a különböző *Drosophila* fajokban korábban már sikeresen alkalmazott stratégiát követve, a mézelő méh véresejtjeivel reagáló monoklonális ellenanyagokat (mAb) állítottunk elő. Az előállított ellenanyagok alkalmazásával a dolgozó kaszt lárvák és a kifejlett adultok véresejtjein és véresejt alpopulációin megnyilvánuló molekulákon immunfluoreszcens és immunhisztokémiai módszerekkel markermolekulákat azonosítottunk. Ezeket a molekulákat a véresejtekre általánosan jellemző ún. pánhemocita-, a kis kerek és ovális plazmatocitákon kifejeződő ún. plazmatocita, a melanizációra hajlamos önocita sejteken megnyilvánuló ún. önocita és a granuláris és melanizált sejteken egyaránt kimutatható ún. granulocita-önocita markerekként definiáltuk. Az ellenanyagokkal azonosított molekulák segítségével három fő véresejtípust határoztunk meg: a plazmatocitákat, a granulocitákat és az önocitákat.
2. Az előállított ellenanyagok segítségével lárvákban és a kifejlett egyedekben meghatároztuk a különböző véresejtípusok arányát. Lárvákban a plazmatociták az összes véresejt 12%-23%-át, míg a granulociták 87%-76%-át teszik ki. A kifejlett fiatal egyedekben a plazmatociták aránya 77%, a granulociták aránya 22%, idős egyedekben a plazmatociták aránya 51%, a granulociták aránya 48%. Az önociták a véresejtek 1%-át alkották a vizsgált fejlődési stádiumokban. Megállapítottuk, hogy az azonosított markermolekulák kifejeződésének mintázata alapján a plazmatociták aránya az egyedfejlődés során a kifejlett adult stádiumig folyamatosan emelkedik, majd az idősebb adultokban csökken. A granulocita-önocita markerek a lárva stádiumban az összes véresejten megnyilvánulnak, de az adultokban a kifejeződésük a granulocitákra és az önocitákra korlátozódik. Eredményeink szerint az általunk azonosított véresejtípus specifikusan kifejeződő markermolekulák alkalmasak a véresejt alpopulációk egyedfejlődés során bekövetkező változásainak a nyomon követésére.
3. A továbbiakban a méhanyák és herék kasztjának kifejlett egyedeiből származó véresejtek is megvizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy azok véresejt alpopulációi hasonló markerexpressziós mintázatot mutatnak, mint a dolgozó kaszt egyedeiből

származó vérsejtek, ami arra utal, hogy a különböző kasztok sejt-közvetítette immunválasz folyamataiban valószínűleg nincs lényeges eltérés.

4. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a mézelő méh vérsejtjeinek alpopulációin általunk azonosított molekuláris markerek a vérsejtek citoplazmájában fejeződnek ki, de a vérsejtek permeabilizálását követően az ellenanyagok alkalmasak áramlási citometriai analízisre, ami lehetővé teszi a különböző fejlődési stádiumokban lévő, vagy különböző kezeléseknél kitett egyedekből származó vérsejt alpopulációk megoszlásának nagyobb hatékonysággal történő nyomon követését.
5. A mézelő méh sejt-közvetítette immunválaszában résztvevő vérsejt alpopulációk vizsgálatának eredményeképpen megállapítottuk, hogy a granulocita-önocita markereket kifejező, granuláris morfológiát mutató granulociták a mikroorganizmusok fagocitálását, a nem fagocitáló, plazmatocita markerekkel ellátott plazmatociták az idegen testek gazdaszervezettől történő elhatárolását végzik, miközben a testidegen anyagon képződő hemocita aggregátumban az önocita markerek is kimutathatóak. *Ex vivo* körülmények között végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a függőcsepp módszerrel előidézett hemolimfa alvadékban a plazmatocita és a granulocita-önocita markerek egyaránt kifejeződnek.
6. A mézelő méh melanizációs folyamataiban szerepet játszó önocita vérsejtekkel reagáló ellenanyagaink *D. melanogaster* kristálysejtekkel és a lamellociták egy alpopulációjával is reagáltak. *D. melanogaster*-ben ezek a sejtek a tokképzés és sebgyógyulás során a melanizációs kaszkád kiindulási anyagát, a profenoloxidázt (PPO) termelik. Az általunk azonosított 2.28 önocita marker molekulatömegének Western blot analízise során 75 kDa és 150 kDa molekulatömeg tartományban két fehérje jelet kaptunk. Mivel a korábban hemolimfából azonosított mézelő méh PPO (AmPPO) molekulatömege 74,5 kDa, feltételezésünk szerint az általunk kimutatott 150 kDa-os fehérje az AmPPO dimerizált formája lehet. A három DmPPO valamint az AmPPO szekvenciájának összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy a fehérjék 47%-60%-os szekvencia azonosságot mutattak. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a 2.28 markert expresszáló fehérje az AmPPO.

7. Kísérleteink során a mézelő méh plazmatocitáin azonosított 4E1 marker immunprecipitációt követő tömegspektrometriai analízise azt valószínűsítette, hogy ez a molekula a mézelő méh hemolektin (AmHml). Annak vizsgálatára, hogy a 4E1 molekula valóban az *AmHml* génről íródik át a génterméket RNS interferenciával csendesítettük, ami a 4E1 fehérje véresejteken történő kifejeződésének csökkenésével járt.
8. A mézelő méh plazmatocitáin megnyilvánuló AmHml (4E1) kifejeződésének nyomon követésével megvizsgáltuk, hogy a növényvédelem által alkalmazott neonikotinoiddal csávázott napraforgó magvakból kifejlődő méhlegelő, vagy az atkák ellen széleskörűen használt amitrázkezelés befolyásolja-e a vésejt alpopulációk arányait. Hasonló vizsgálatokkal összehasonlítottuk a magas és gyenge tisztogatási hajlammal rendelkező méhvonalakból származó családok egyedeinek, valamint az atkával fertőzött és nem fertőzött egyedek plazmatocitáinak arányát, de a különböző vegyszeres kezeléseknél, a különböző tisztogatási hajlammal bíró méhvonalaknál és az atkafertőzés során sem tapasztaltunk eltérést a plazmatociták arányában.
9. A mézelő méh vésejttípusok funkcióinak vizsgálata során megállapítottuk, hogy a lárvákban a kifejlett egyedek vésejtjeinek 22%-a fagocitáló granulocita. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy immunindukciót követően (steril szúrás, atkafertőzés, vegyszeres kezelés, idegen makropartikulumok a szervezetben) a granulociták aránya nem változik és újfajta vésejt alpopuláció differenciálódását sem tapasztaltuk.
10. Megvizsgáltuk, hogy a szervezet első védelmi vonala, rovarokra jellemző kutikula tartalmaz-e olyan fehérje molekulákat, amelyeknek szerepük lehet fertőzések elleni védekezésben. A *D. melanogaster* genomjának Nimród régiójában található *vajk* génekről átíródó Vajk fehérjék kifejeződését vizsgáltuk mézelő méhben Western blot módszerrel, a *D. melanogaster* Vajk fehérjét felismerő ellenanyagok felhasználásával. Eredményeink szerint a Vajk 4 fehérje mézelő méh bábokban is kimutatható, feltételezhetően sokkal kisebb mennyiségben, mint ecetmuslicában.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Andó Istvánnak a lehetőséget, hogy a csoportjában végezhettem diákköri és Ph.D. munkámat. Köszönöm bizalmát, hasznos tanácsait, ötleteit és türelmét, amivel segítette munkámat, valamint biztosította a munkámhoz a megfelelő feltételeket.

Köszönöm társ-témavezetőmnek Dr. Kurucz Judit Évának, hogy bevezetett az immunológiai biokémiai és molekuláris biológiai módszerekbe.

Köszönöm Dr. Cinege Gyöngyinek önzetlen segítségét és tanácsait a molekuláris biológiai kísérletek során.

Köszönöm a segítségét, hasznos ötleteit munkatársaimnak: Dr. Csordás Gábornak, Dr. Kari Beátának, Lerner Zitának, Dr. Honti Viktornak, Varga Gergelynek, Dr. Zsámboki Jánosnak.

Köszönöm laboratóriumunk asszisztenseinek: Balázs Anitának, Ilyés Mónikának, Képiró Anikónak, Kovalcsik Olgának és Tápai Szilviának, hogy bevezettek a kutatás gyakorlati módszereibe.

Köszönöm Dr. Török Tibornak, a kutatás nélkülözhetetlen kísérleti alanyainak, a mézelő méheknek a biztosítását, és a méhek tartásával, szerveződésével kapcsolatos méhészeti ismereteim bővítését.

Köszönöm Prof. Dr. Békési Lászlónak, Dr. Zajác Editnek, Prof. Dr. Rusvai Miklósnak, Dr. Mándoki Mirának, Dr. Bösze Zsuzsának, Dr. Stéger Viktornak, Dr. Kolics Balázsnak, Bengyák Vincének, Dr. Paulus Petrának, Dr. Papp Melittának a segítséget és hasznos ötleteket, valamint, a különböző vegyszeres kezelések és méhvonalak vizsgálata során alkalmazott egyedek biztosítását.

Köszönöm Dr. Gácsér Attilának és Dr. Jankovics Ferencnek a dolgozatom bírálatát.

Köszönettel tartozom Dr. Erdélyi Miklósnak, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézet igazgatójának a támogatását, ahhoz, hogy a Genetikai Intézetben végezhettem diákköri és Ph.D. munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Jankovics Ferencnek, Dr. Henn Lászlónak, Dr. Darula Zsuzsannának és Kotogány Editnek tanácsaikat és segítségüket a kísérletek során.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak, szüleimnek, barátaimnak és méhésztársaimnak azt, hogy mindvégig támogattak és mellettem álltak.

A Ph.D. fokozat megszerzését a következő pályázatok tették lehetővé: NKFI K 120140; GINOP-2.3.2-15-2016-00001; GINOP-2.3.2-15-2016-00035.

Saját közlemények jegyzéke

A dolgozat alapját képező közlemények:

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

IF:3,756

MTMT: 3249679

Gábor, E., Cinege, G., Csordás, G., Török, T., Folkl-Medzihradzsky, K., Darula, Z., Andó, I., Kurucz, É., 2017. Hemolymph expression reveals functional heterogeneity in honey bee (*Apis mellifera*) hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 76, 403–411.

IF:3,218

MTMT: 3249751

Egyéb közlemények:

Gábor, E., Török, T., Csordás, G., Zsámboki, J., Kurucz, É., Andó, I., 2013. A házi méh (*Apis mellifera*) immunitása. *Tudomány a vidék mindennapjaiban: Magyar Tudomány Ünnepe* ISBN:978-963-306-245-6, pp. 29-34. (Könyvrészlet/Digitális kiadvány magyar nyelven)

MTMT: 2519812