A Headcase a *Drosophila melanogaster* vérsejtképződésének szabályozó faktora

***PhD*. értekezés**

Varga Gergely István

Témavezető: Dr. Honti Viktor

Biológia Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet
Immunológiai Témacsoport

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

2019.

Szeged

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás 4
1. Bevezetés 7
1.1. Az ecetmuslica, mint a veleszületett immunitás modellje 7
1.2. Az ecetmuslica embrionális vérsejtjei 9
1.3. A *Drosophila* lárva vérsejtképző kompartmentumai és vérsejtjei 12
1.3.1. A keringés 13
1.3.2. A központi nyirokszerv 17
1.3.3. A szesszilis vérsejtképző szövet 22
1.4. A báb és az adult vérsejtjei 25
1.5. A vérsejtképzés transzkripciós és epigenetikai szabályozása 26
1.6. A *headcase*, a differenciálódás szabályozó faktora 28
2. Célkitűzések 32
3. Anyagok és módszerek 33
3.1. Felhasznált anyagok: 33
3.1.1. Pufferek, vegyszerek: 33
3.1.2. Felhasznált ellenanyagok: 34
3.2. Felhasznált *Drosophila* törzsek: 34
3.3. Módszerek: 39
3.3.1. Drosophila lárvák in vivo vizsgálata: 39
3.3.2. Fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálat: 39
3.3.3. Konfokális mikroszkópiás vizsgálat: 39
3.3.4. A szesszilis szövet konfokális mikroszkópiás vizsgálata in vivo indirect immunfluoreszcenciával: 39
3.3.5. Immunindukció: 40
3.3.6. A keringő vérsejtek vizsgálata indirekt immun-fluoreszcenciával: 40
3.3.7. Imágókorong preparátum készítése: 41
3.3.8. Központi nyirokszerv, abdominális hisztoblaszt és ivarlemez preparátum készítése: 41
3.3.9. X-gal festés: 42
3.3.10. hdc-Gal4 vonalak létrehozása P-elem konverzióval: 42
3.3.11. A P-elem beépülések molekuláris térképezése polimeráz láncreakcióval: 43
3.3.12. w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi rekombináns előállítása és ellenőrzése: 44

3.3.13. w; Dot-Gal4, UAS-hdcRNSi és w; Pcol85-Gal4, UAS-hdcRNSi rekombinánsok előállítása: 45
3.3.14. Amorf hdc allél létrehozása P-elem mozgatáson alapuló mutáns előállítás módszerével: 46
3.3.15. A deficienciák molekuláris térképezése polimeráz láncreakcióval: 46
3.3.16. Szűrővizsgálat a hdc genetikai együttműködő partnereinek azonosítására: 47
3.3.17. Második kromoszómás UAS-hdc.S beépülés létrehozása: 48
3.3.18. Amorf hdc mutáns lárva szövetspecifikus menekítése: 49
4. Eredmények 51
4.1 *hdc-Gal4* genetikai meghajtóelem létrehozása P-elem konverzióval 51
4.2 A P-elem beépülések molekuláris térképezése 53
4.3 A *hdc-Gal4* beépülések genetikai jellemzése 54
4.4. A *hdc* kifejeződésének követése a központi nyirokszervben a lárva egyedfejlődése során: 55
4.5. A *hdc* allélok vérsejtdifferenciálódásra gyakorolt hatásának vizsgálata 57
4.6. A *hdc* mutáció fókuszának felderítése 60
4.7. A *hdc* csendesítése a *Dot* vonalban 63
4.8. A Col kifejeződési mintázatának vizsgálata a *hdc* mutáns lárvák központi nyirokszervében 63
4.9. A Hdc lehetséges együttműködő partnereinek vizsgálata 65
5. Az eredmények megvitatása 68
6. Az eredmények összefoglalása 75
7. Summary 78
8. Hivatkozások 81
9. Rövidítések jegyzéke 98
10. Saját közlemények listája 100

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni csoportvezetőmnek, **Dr. Andó Istvánnak**, hogy a csoportjában dolgozhattam. Köszönöm a türelmet, a segítséget és a bizalmat.

Köszönöm **Dr. Honti Viktornak**, témavezetőmnek a rengeteg szakmai és emberi segítséget, amit a munkámhoz nyújtott. Köszönet a vezetésért, a tanácsokért, a gondolatokért és a rugdosásért, hogy a hajnalokig tartó filozófiai vitákról, vagy a természetjárásról és a számtalan, soha meg nem írt szakkönyvről már ne is beszéljek.

Köszönöm korábbi témavezetőmnek, **Dr. Kurucz Évának**, hogy a kutatás rögös útján elindított, és rajta is tartott.

Köszönet jár **Dr. Csordás Gábornak** a tanácsokért, ötletekért, az informatikai problémák megoldásáért, a rengeteg szakmai segítségért, na meg az Egérért. Ráadásul az ábraanyag sem lenne teljes az ő hozzájárulása nélkül.

Köszönöm **Dr. Vilmos Péternek** PhD tutori tevékenységét.

Köszönettel tartozom **Dr. Jankovics Ferenc elnök úrnak** az *in vivo* konfokális videók elkészítésében nyújtott segítséget és a tanulságos szakmai beszélgetéseket.

Szeretném megköszönni a technikai segítésget laborunk jelenlegi és egykori asszisztenseinek: **Balázs Anitának**, **Ilyés Mónikának**, **Képíró Anikónak**, **Kovalcsik Olgának** és **Tápai Szilviának**.

Köszönöm **Dr. Bajusz Izabellának** a gondolatébresztő diszkussziókat, a szakmai segítséget és barátságát.

Köszönettel tartozom **Dr. Cinege Gyöngyinek** a molekuláris munkában nyújtott rengeteg segítségéért.

Köszönöm **Dr. Sinka Ritának**, **Dr. Márkus Róbertnek**, **Dr. Pettkó-Szandtner Aladárnak** és **Dr. Zsámboki Jánosnak** a szakmai segítséget, ötleteket.

Köszönet jár öreg barátnémnak, **Gábor Erikának** a motiválásért és a közös küzdelemért.

Szeretném megköszönni a csoport valamikori és jelenlegi tagjainak, **Abonyi Csillának**, **Dr. Kari Beátának**, **Dr. Laurinyecz Barbarának**, **Lerner Zitának** és **Váczi Balázsnak** a nem csak szakmai segítséget és a közös munkát.

Köszönetem fejezem ki külföldi együtműködő partnereinknek, **Dr. Michele Crozatier-nek**, **Dr. Angela Giangrandénak**, **Prof. Dan Hultmarknak**, **Dr. Bruno Lemaitre-nek**, **Dr. Lukácsovich Tamásnak**, **Dr. Matuschek Tamásnak**, valamint **Dr. Christos Samakovlisnak**. Az általuk szolgáltatott reagensek, ecetmuslica törzsek, valamit szakmai tanácsok a dolgozatban bemutatott munkához jelentős mértékben hozzájárultak.

Szeretném megköszönni az SZBK CI laborjának, **Dr. Kószó Zsuzsának**, **Dr. Kelemen Ildikónak** és **Dr. Ferhan Ayaydinnak** a konfokális mikroszkópok használatában nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom **Dr. Erdélyi Miklósnak** PhD munkám során nyújtott segítségéért, valamint a kutatói pályáról szóló tanácsaiért.

Köszönöm az **SZBK *Drosophila* közösségének** a termékeny közeget és a szakmai segítséget.

Hálával tartozom a házivédéskori opponenseimnek, **Dr. Juhász Gábornak** és **Dr. Blastyák Andrásnak**, amiért rövid határidővel vállalták dolgozatom bírálatát.

Köszönettel tartozom gyermekeimnek és volt feleségemnek, amiért állandó motivációt jelentettek számomra.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek és testvéreimnek, hogy mögöttem álltak. Nélkülük nem készült volna el ez a dolgozat.

Munkánkat a következő pályázatok tették lehetővé: OTKA NN-118207, PD-115534, GINOP-2.3.2-15-2016-00001, GINOP-2.3.2-15-2016-00035 és TÁMOP-4.2.4.A/ 2-11/1-2012-0001 'Nemzeti Kiválóság Program'

1. Bevezetés

1.1. Az ecetmuslica, mint a veleszületett immunitás modellje

Az evolúció során a soksejtű szervezetek megjelenésével elengedhetetlenül szükségessé vált egy hatékony védekező rendszer kialakulása, mely megőrzi a többsejtű szervezet homeosztázisát az azt fenyegető mikroorganizmusokkal és többsejtű parazitákkal szemben. Ennek a feladatnak az ellátására alakult ki a többsejtű állatokban az elsődleges -, vagy veleszületett immunrendszer, melynek humorális és sejtes elemei, az antimikrobiális peptidek termelése, a koaguláció, a bekebelezés, és a testidegen részecskék elhatárolása az állatvilágban általánosan elterjedt védekezési folyamatok (Hartenstein, 2006).

Mai ismereteink szerint a gerinctelen szervezetek kizárólag elsődleges immunrendszerrel rendelkeznek, amely a kórokozók széles köre ellen nyújt nem specifikus, ám igen hatékony védelmet. A gerincesekben ezzel szemben a veleszületett immunitás és az arra épülő, azzal szorosan együttműködő, antigén-specifikus válaszra képes adaptív immunrendszer együttesen biztosítja az egyed túlélését. A két rendszer számos ponton kapcsolódik egymással és kölcsönösen befolyásolják egymás működését. A veleszületett védekező rendszer gerinctelen modellorganizmusok segítségével az adaptív immunitás moduláló hatásától mentesen vizsgálhtaó (Williams, 2007).

Az immunitás szempontjából legjobban jellemzett gerinctelen állatok a rovarok. Az alapvető védekező reakciók mindegyikét megfigyelték már ebben az állatcsoportban: a bakteriális vagy gombás fertőzések hatására a zsírtestből antimikrobiális peptidek szabadulnak fel, a vérsejtek pedig képesek bekebelezni a mikróbákat és tokképzés segítségével elzárni a hemolimfától a nagyméretű testidegen részecskéket (Rizki és Rizki, 1959; Krieg, 1958; Hoffmann és Hoffmann, 1990; Hoffmann, 2003).

Az ecetmuslicát (*Drosophila melanogaster*) jól jellemzett fiziológiai és genetikai háttere, teljes genomszekvenciájának ismerete, valamint szerteágazó genetikai eszköztára kiemeli a potenciális rovar modellszervezetek közül. Az ecetmuslica védekező folyamatait humorális és sejtes komponensek együttműködése alakítja ki. A humorális jelenségeket a hemolimfa faktorai által megvalósított véralvadás, a fenoloxidáz által beindított melanizációs kaszkád, valamint az antimikrobiális peptidek termelése jelentik. A sejtes immunválasz alapvető jelenségei a mikróbák bekebelezése és a nem fagocitálható méretű veszélyes részecskék körüli többrétegű, melanizálódó tok képzése, megvalósítói pedig a vérsejtek, vagy hemociták (Lemaitre és Hoffmann, 2007).

Az ember és a *Drosophila* vérsejtképzésében számos párhuzam megfigyelhető. A humán vérsejtképzés az embrionális korban megkezdődik és két hullámban (primitív – és definitív vérsejtképzés) zajlik különböző vérképző szövetekben, kompartmentumokban. Az ecetmuslicában is elkülönítünk pimitív (embrionális) – és definitív (lárválís) vérsejtképzést, és az immunsejtek kompartmentalizációja szintén jellemző erre az organizmusra is. Az ember posztembrionális vérsejtképzésének fő színtere a vérképző őssejt niche ahol a vérsejtképző őssejt (HSC) egyenlőtlen osztódással hozza létre a különböző sejttípusokat. Az ecetmuslicában is azonosítottak vérsejtképző őssejteket, amelyek szintén egy vérképző niche-ben, a központi nyirokszervben osztódva hották létre a hemocitákat (Evans és mtsai, 2003; Martinez-Agosto és mtsai, 2007; Dey és mtsai, 2016).

Az ember és az ecetmuslica védekezési folyamatai nem csak anatómiai és funkcionális hasonlóságokat mutatnak, de a *Drosophila* védekezésében szerepet játszó számos génről kiderült, hogy a humán immunfolyamatokban is jelentős szereppel bír. Bebizonyosodott, hogy az emlősök és az ecetmuslica immunválaszának alapelemei funkcionálisan és molekulárisan is erősen konzerváltak. 2011-ben Jules A. Hoffmann és Bruce A. Beutler a *Drosophila* Toll és homológjai, a humán Toll like receptorok (TLR) immunitásban betöltött szerepének feltárásáért

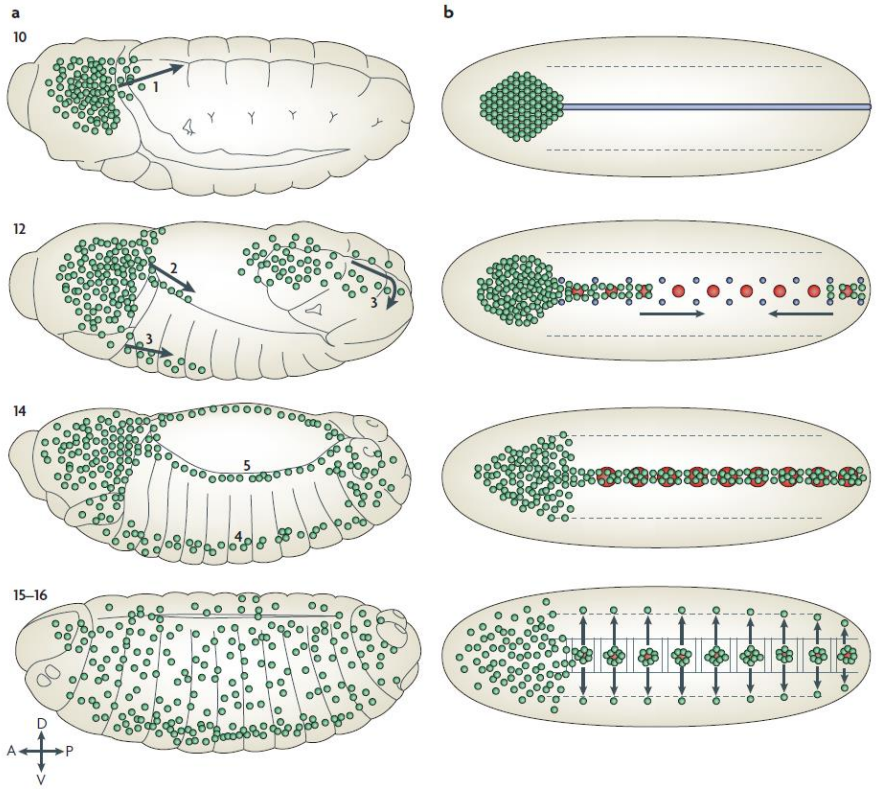
orvosi Nobel-díjban részesültek (Lemaitre és mtsai, 1996 és 1997; Imler és Hoffmann 2002; Evans és mtsai, 2003; Beutler 2009).

A rendelkezésre álló élettani ismeretek, a genetikai – és molekuláris biológiai eszközrendszer, valamint az emberi immunfolyamatokkal kapcsolatban mutatott számos hasonlóság az ecetmuslicát kiválóan alkalmassá teszi az elsődleges immunrendszer vizsgálatára.

1.2. Az ecetmuslica embrionális vérsejtjei

Az ecetmuslica vérsejtképzése az emlősökéhez hasonlóan már az embrionális fejlődés korai szakaszában megkezdődik és kompartmentumokhoz kötötten, több hullámban zajlik. A folyamatot konzervált epigenetikai és transzkripciós faktorok irányítják (Holtz és mtsai, 2003; Evans és mtsai., 2003).

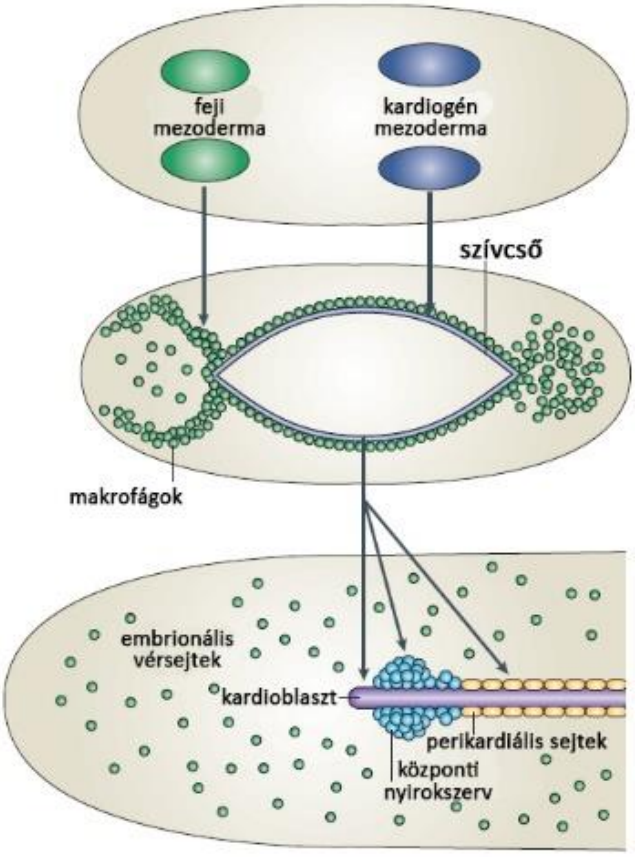
Hemociták először az ötödik embrió stádiumban keletkeznek: a feji mezoderma sáv területén osztódó, a Serpent (Srp) transzkripciós faktor által determinált sejtek két vérsejt populációt hoznak létre, az embrionális makrofágokat és az embrionális kristálysejteket. Az embrionális makrofágok migráló sejtek, vándorlásuk molekuláris háttere részletesen ismert: a „germ band extension" stádiumban a Pvf-Pvr jelátvitel által vezérelt, úgynevezett transzmigráció során az epitéliumon keresztül az embrió poszterior részébe jutnak, majd innen tovább haladnak és bejárják a teljes embriót (**1. ábra**) (Holtz és mtsai, 2003; Brückner és mtsai, 2004; Wood és mtsai, 2006; Siekhaus éa mtsai, 2010; Parsons és Foley, 2013).



1. ábra. Az embrionális makrofágok vándorlása a peterakást követően 10, 12, 14 és 15-16 órával. **a)** A transzmigráció folyamata és az embrionális makrofágok (zöld) vándorlása a teljes embrióban: a makrofágok transzmigrációval a kiterjedt germ band-be jutnak, amely visszahúzódik, majd a feji és a farki végen lévő vérsejtek egymás felé vándorolnak a fejlődő idegkötegek és a fejlődő bél mentén. **b)** A makrofágok vándorlása a fejlődő idegrendszer mentén: a vérsejtek migrációját az embrió középvonalában erősen aktív Pvf szignál (kék és piros) irányítja, a makrofágok először egy hosszanti mintázatba rendeződnek, majd oldal irányba vándorolnak (Wood és Jacinto, 2007).

Az embrionális makrofágok egyik fő feladata az apoptotikus törmelék bekebelezése, vándorlásuk szükséges az embrionális idegrendszer megfelelő fejlődéséhez is. Az embrionális kristálysejtek a középbél anterior szakasza közelében két helytülő sejtcsoportot alkotnak, funkciójuk ebben a stádiumban nem ismert (Franc és mtsai, 1996; Lebestky és mtsai, 2000; Kurant és mtsai, 2008; Evans és mtsai, 2010; Nagosa és mtsai, 2011; Fujita és mtsai, 2012).

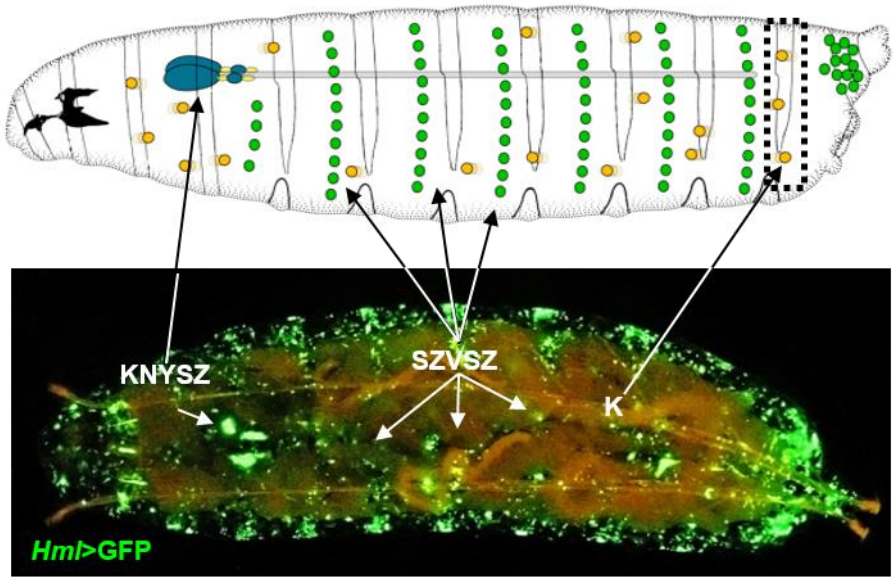
Az ecetmuslica vérsejtképzésének második hulláma az embrionális fejlődés középső szakaszában, a háti záródást követően kezdődik: a laterális, vagy kardiogén mezoderma sejtjeiből hemangioblasztok differenciálódnak, melyek a kardioblasztok, a perikardiális sejtek és a központi nyirokszerv vérsejtjeinek közös előalakjai. A központi nyirokszerv kezdemény a szívcső anterior végénél alakul ki, plazmatocita és kristálysejt előalakok építik fel (**2. ábra**) (Holz és mtsai, 2003; Mandal és mtsai, 2004).



2. ábra. Az embrionális makrofágok és a központi nyirokszerv eredete. Az embrionális makrofágok (zöld) a feji mezoderma sejtjeiből képződnek, majd bejárják a fejlődő embriót, míg az embrionális központi nyirokszervet létrehozó sejtek (kék) a kardiogén mezodermából fejlődnek és egy kompakt szervet alkotnak a fejlődő szívcső (lila) anterior végének két oldalán (Wood és Jacinto, 2007 alapján).

1.3. A *Drosophila* lárva vérsejtképző kompartmentumai és vérsejtjei

Az ecetmuslica lárvájában a hemociták három vérsejtképző kompartmentumba rendeződnek: ezek a keringő hemociták, a központi nyirokszerv és a szesszilis vérsejtképző szövet (**3. ábra**). A központi nyirokszerv a kardiogén mezoderma sejtjeiből (vagyis az embrionális központi nyirokszervből) alakul ki, míg a másik két kompartmentumot a feji mezoderma leszármazási vonala hozza létre. Ez a három szövet egyaránt képes a végrehajtó sejttípusok, a plazmatociták, a kristálysejtek és a lamellociták képzésére. A tokképző reakció a három sejttípus együttes részvételével zajlik: a plazmatociták és lamellociták alkotta többrétegű tokban a kristálysejtekből felszabaduló fenoloxidáz által indított kaszkád során képződött szabadgyökök elpusztítják a parazitoid darázs petéjét, miközben a többrétegű tok melanizálódik (Nappi és mtsai, 1973; Holtz és mtsai, 2003; Honti és mtsai, 2010 és 2014; Dudzic és mtsai, 2015).



3. ábra. Az ecetmuslica lárva vérsejtképző kompartmentumai: a szívcső anterior végénél elhelyezkedő, páros lebenyes központi nyirokszerv (KNYSZ, kék), a testüreg falára a szelvényeknek megfelelő sávozott mintázatban kitapadó vérsejtek alkotta szesszilis vérsejtképző szövet (SZVSZ, zöld) és a hemolimfában szabadon keringő vérsejtek (K, sárga). A fluoreszcens képen a vérsejtekben kifejeződő Hml>GFP marker mintázata látható, mely mindhárom kompartmentumot kijelöli (a felvételt Dr. Márkus Róbert készítette).

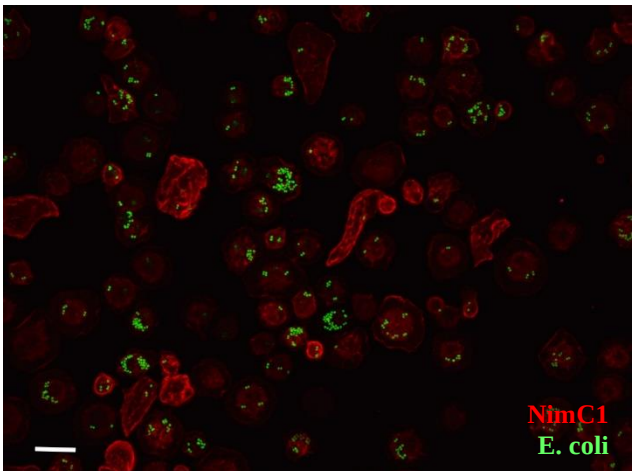
1.3.1. A keringés

A hemolimfa és a benne szabadon keringő hemociták áramlását a testüregben a szívcső ritmusos összehúzódásai révén biztosítja, a vérnyirkot a lárva farki végéből a feji vég irányába pumpálja. A keringésben a vérsejtek mellett számos, immunológiai szempontból fontos komponenst találunk: a hemolimfa koagulációjához szükséges faktorokat, a mikróbák sejtfalát károsító antimikrobiális peptideket és a veszélyes részecskék bekebelezését segítő opszoninokat (Jiravanichpaisal és mtsai., 2006; Tao és Schulz, 2007; Chung és Kocks 2011; Theopold és mtsai, 2014).

A hemocitáknak három, egymástól morfológiailag, immunológiai és *in vivo* genetikai markerekkel, valamint funkcionálisan is elkülöníthető típusát írták le: a plazmatocitákat, a kristálysejteket és a lamellocitákat. A lárválís fejlődés során a keringő sejtek száma a kezdeti 200-ról a harmadik stádium végére több mint 2000-re nő, melynek több mint 90%-a plazmatocita, a fennmaradó része pedig kristálysejt. Immunindukció, például parazitoid darázsfertőzés hatására a keringő sejtek száma megemelkedik és megjelenik a harmadik effektor sejttípus, a lamellocita. Vérsejt előalakot ebben a kompartmentumban nem írtak le (Rizki és Rizki, 1980; Carton és Nappi, 1997; Lanot és mtsai, 2001; Kurucz és mtsai, 2003 és 2007; Kimbrell és mtsai, 2002; Goto és mtsai, 2003; Zetterval és mtsai, 2004).

1.3.1.1. A plazmatociták

A plazmatociták körülbelül 10 µm átmérőjű, gömbölyű morfológiájú, makrofág szerű sejtek, a lárva keringésének fő tömegét, a sejtek mintegy 95%-át teszik ki (**4. ábra**). Fő feladatuk a kisméretű részecskék, a mikróbák és az apoptotikus törmelék bekebelezése, melyek felismerésében és hatékony felvételében kulcsszerepet játszanak a plazmatociták sejtfelszíni receptorai. Az Eater, a Nimrod C1 (NimC1) és a Draper receptorok változó számban tartalmaznak egy speciális EGF szerű ismétlődést, az úgynevezett „Nim-motívumot", ami a csoportunk által azonosított Nimrod gén- és fehérjecsaládra jellemző motívum. Az Eater és a NimC1 hiányában csökken a plazmatociták baktérium bekebelező képessége (Kocks és mtsai, 2005; Kurucz és mtsai, 2007), míg a Draper a CD36 homológ Crocquemort-tal és a NimC4 fehérjével az apoptotikus sejttörmelék elmiminálásában vesz részt (Franc és mtsai, 1999; Manaka és mtsai, 2004; Kocks és mtsai, 2005; Kurucz és mtsai, 2007; Kurant és mtsai, 2008; Somogyi és mtsai, 2008 és 2010; Chung és Kocks, 2011; Fujita és mtsai, 2012; Zsámboki és mtsai, 2013).



4. ábra. A fluoreszcens mikroszkópos felvételen a NimC1 markert kifejező plazmatociták (piros) bekebelezik az *E. coli* baktériumokat (zöld). Méretarány: 20µm. (A felvételt Honti Viktor készítette.)

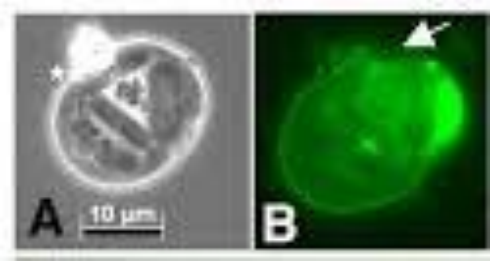
A plazmatociták a bekebelezés mellett számos egyéb feladatot is ellátnak: extracelluláris mátrix alkotóelemeket és antimikrobiális peptideket (AMP) termelnek, valamint szerepük van a szisztémás immunválasz kiváltásában is. A patogén bejutását érzékelő plazmatociták a Psidin fehérje kiválasztásán keresztül serkentik a humorális immunitás központi szervének, a zsírtestnek az AMP szekrécióját (Samakovlis és mtsai, 1990; Brennan és mtsai, 2007; Martinek és mtsai, 2008; Charroux és Royet, 2009; Defaye és mtsai, 2009).

Azonban ezek a sejtek nem csak a mikróbák, de a többsejtű betolakodók elleni védekező reakcióban is részt vesznek: a parazitoid darázs petéje körüli tok belső sejtrétegét kiterült plazmatociták alkotják, mintegy alapot biztosítva a lamellociták számára a többrétegű tok kialakításához. Ráadásul hasonló szerepüket írták le a tumorellenes immunválasz során történő tokképzésben is (Williams és mtsai, 2005; Pastor-Pareja és mtsai, 2008).

Korábban a plazmatocitát terminálisan differenciálódott sejttípusnak tartották, azonban az utóbbi években a vérsejtleszármazási vonalak genetikai eszközökkel történő vizsgálata során kiderült, hogy immunindukció hatására képes a funkcióját és a morfológiáját megváltoztatni és dedikált tokképző sejtté, lamellocitává transzdifferenciálódni (Honti és mtsai, 2010 és 2014; Stofanko és mtsai, 2010).

1.3.1.2. A kristálysejtek

A kristálysejtek a plazmatocitákhoz hasonló méretű és morfológiájú, de bekebelezést nem végző hemociták, a keringő sejtek kevesebb, mint 5%-át teszik ki (**5. ábra**). Citoplazmájukban profenoloxidáz kristályokat hordoznak, amelynek aktív formája, a fenoloxidáz a melanizációs kaszkád kulcsenzime. Ennek az enzimnek a tokképző reakcióban, az alvadékképzésben és a sebgyógyulásban van alapvető szerepe. Az immunválasz során a c-Jun N-terminális kináz (JNK) jelátvitel hatására juttatják a kristálysejtek a profenol oxidázt a hemolimfába, ráadásul a folyamat során felszabaduló egyéb molekulák szerepet játszhatnak a tokképző sejtek kialakulásának serkentésében is (Rizki és Rizki, 1959; Bidla és mtsai, 2007).



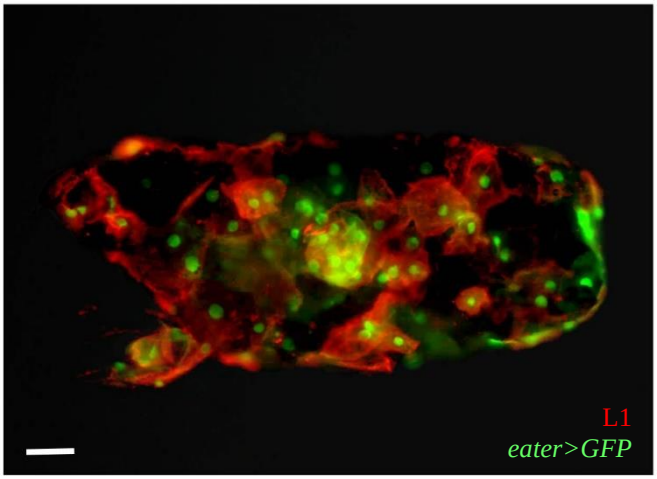
5. ábra. A) A kristálysejtek fáziskontraszt mikroszkópos és **B)** fluoreszcens képe, melyen a sejtmembránt a CD8-GFP marker jelöli (zöld) (Bidla és mtsai, 2007).

Habár a kristálysejt irányú differenciálódás már az embriogenezis során eldől, Krzemień és munkatársai szerint a központi nyirokszerv kristálysejt progenitorai immunindukció hatására

képesek lehetnek lamellocitává alakulni. Sőt, az utóbbi években megfigyelték, hogy a szesszilis vérsejtképző szövetben a plazmatociták kristálysejtekké képesek transzdifferenciálódni, amely folyamatot a Notch jelátvitel szabályozza (Lebestky és mtsai, 2000; Waltzer és mtsai, 2003; Krzemień és mtsai, 2010a; Terriente-Felix és mtsai, 2013; Leitão és Sucena, 2015).

1.3.1.3. A lamellociták

A lamellociták nagyméretű (20-50µ), kiterült sejtek (**6. ábra**). Vad típusú, naiv lárvában csak ritkán jelennek meg, közvetlenül a bábozódás előtt, azonban immunindukció hatására nagy számban képződnek. Feladatuk a parazitoid darázs lárvája, vagy más, nem fagocitálható mérettartományba eső veszélyes részecske körüli többrétegű tok kialakítása. A tok melanizálódik és a folyamat során keletkező reaktív oxigénformák elpusztítják a parazitát (Nappi és Vass, 1998).



6. ábra. A plazmatociták (zöld, eater>GFP) és a lamellociták (piros, L1) többrétegű, melanizálódó tokot képeznek a *L. boulardi* parazitoid darázs petéje körül. Méretarány: 50 µm.

Csoportunk korábbi munkáiból kiderült, hogy a kutikula steril körülmények közötti sebzése lamellociták képződéséhez vezet, ami arra utal, hogy az epidermisz, vagy a bazális membrán sérülése elegendő inger a tokképző sejtek keletkezéséhez. Azonban, míg egy korábbi tanulmányban leírták, hogy a zsírtestet burkoló bazális membrán károsodása erős immunválaszt és lamellocita képződést okoz, addig egy későbbi kísérletben megfigyelték, hogy az imágókorongok bazális membránjának *in vivo* károsodása plazmazociták kitapadásához vezet ugyan, de tokképző sejtek nem keletkeznek (Rizki és Rizki, 1974; Márkus és mtsai, 2005; Pastor-Pareja és mtsai, 2008).

Lamellocita képződést megfigyeltek tumorszuppresszor mutáns lárvákban (*l(3)mbn*^{1}) és jelátviteli utak túlműködése (*hop*^{Tum1}) esetén is. Később megállapították, hogy a vérsejt tumorokat okozó mutációk mindig lamellocita képződéshez vezetnek. Különböző jelátviteli útvonalak elemeinek és transzkripciós faktoroknak vérsejtspecifikus túltermelésével is előidézhető a tokképző sejtek megjelenése (Konrad és mtsai, 1994; Asha és mtsai, 2003; Sorrentino és mtsai, 2004; Zetterwall és mtsai, 2004; Minakhina és Steward, 2006a; Stofanko és mtsai, 2008).

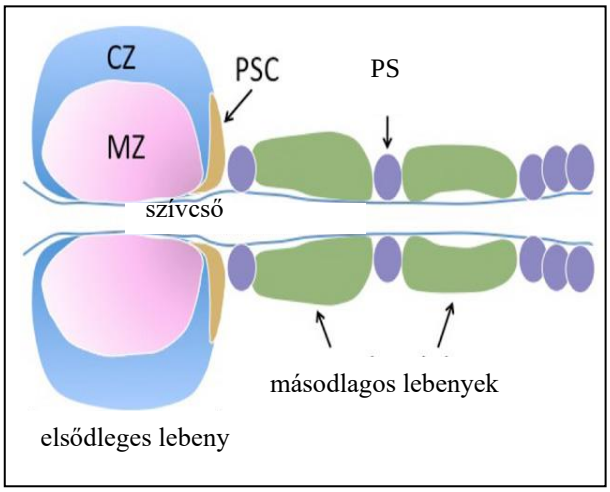
A kutatócsoportunkban végzett sejtvonaljelöléses vizsgálatokból kiderült, hogy a korábbi elképzelésekkel ellentétben a lamellocitáknak csak egy része származik prekurzor sejtekből, a keringésben jelentős hányaduk a korábban terminálisan differenciálódottnak vélt plazmatocitákból képződik (Honti és mtsai, 2010; Honti és mtsai, 2014).

1.3.2. A központi nyirokszerv

A központi nyirokszerv az embrionális központi nyirokszerv kezdeményből kifejlődő, a szívcső két oldalán elhelyezkedő, bazális membránnal körülhatárolt, páros lebenyes szerv. Az elsődleges lebenyt poszterior irányban több másodlagos lebeny követi, az egyes lebenyeket a központi nyirokszervvel azonos embrionális eredetű perikardiális sejtek választják el egymástól (Röhrborn, 1961).

Az embrionális fejlődés végén kb 30-30 sejtből álló szervkezdemény a lárvális fejlődés során folyamatosan növekszik, a harmadik lárva stádium végére az elsődleges lebenyeket mintegy 5-5000 sejt alkotja és kifejlődik a két-három pár, jelentősen kisebb méretű másodlagos lebeny is (Shrestha és Gateff, 1982; Lanot és mtsai, 2001; Jung és mtsai, 2005).

Az elsődleges lebenyt helyzetén és méretén kívül jól megfigyelhető szerkezete is megkülönbözteti a többitől (**7. ábra**): kérgi zónájában (CZ) érett hemociták és átmeneti sejtek találhatók, míg a velőállományt (MZ) differenciálatlan vérsejt előalakok, vagy prohemociták alkotják. A két zóna elkülönítésére számos marker áll rendelkezésre: a kérgi zóna sejtjeinek markerei többek között a Hemolectin, a Peroxidasine, a NimC1 és az Eater, a velőállomány fontosabb markerei pedig a Domeless (Dome), a Thioester-containing protein4 (Tep4) és az Cubitus interruptus (Ci) (Sinenko és Mathey-Prevot, 2004; Jung és mtsai, 2005; Irving és mtsai, 2005; Mandal és mtsai, 2007; Kurucz és mtsai, 2007a; Krzemień és mtsai, 2007 és 2010; Tokusumi és mtsai, 2009a és 2009b; Gao és mtsai., 2011).

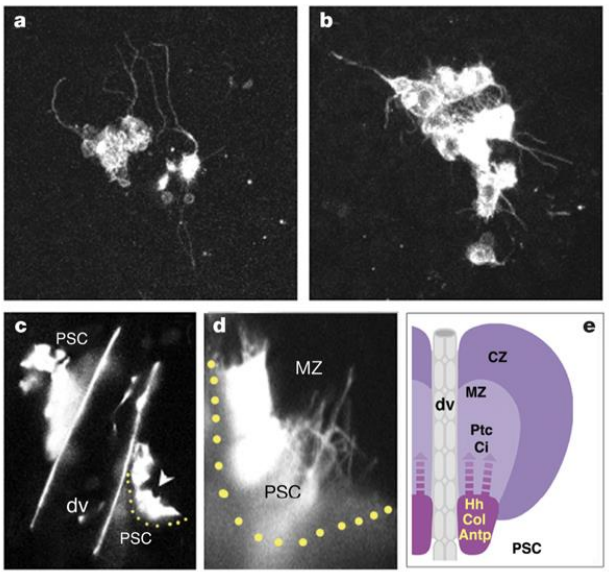


7. ábra. A központi nyirokszerv a szívcső anterior végének két oldalán helyezkedik el. Egy pár elsődleges - és néhány pár másodlagos lebenyből áll, melyeket perikardis sejtek (PS) választanak el egymástól. Az elsődleges lebeny három funkcionális egységre tagolható: a kéregállományban (CZ) differenciálódott vérsejtek, a velőállományban (MZ) pedig vérsejt előalakok helyezkednek el; a poszterior szignalizációs központ (PSC) a prohemociták differenciálatlan állapotának fenntartásáért felel (Jung és mtsai, 2005 nyomán).

Az elsődleges lebeny poszterior részén elhelyezkedő 20-30 sejtből felépülő poszterior szignalizációs központ (PSC) niche-ként működik, az MZ sejtek prohemocita állapotának fenntartásáért felel. A PSC sejtjei hosszú sejtnyúlványokat, ún. citonémákat bocsájtanak a velőállomány sejtjei közé és feltételezhetően ezeken keresztül továbbítják a differenciálódást gátló jeleket a prohemociták felé (**8. ábra**). A niche fontosabb markerei a Collier (Col), az Antennapedia és a Hedgehog (Hh) (Crozatier és mtsai, 2004;Mandal és mtsai, 2007; Krzemień és mtsai, 2007; Pennetier és mtsai, 2012).

Az utóbbi években az első stádiumú lárva központi nyirokszervében, közvetlenül a szívcső mellett olyan sejteket azonosítottak, melyek nem fejezik ki a MZ markereket. Ezek a

sejtek a PSC-ből felszabaduló Decapentaplegic (Dpp) által szabályozott módon hozzák létre a később kialakuló velőállományban elhelyezkedő prohemocitákat, így ezeket a sejteket vérsejtképző őssejteknek (HSC) tekinthetjük (Minakhina és Stewart, 2010; Dey és mtsai, 2016).



8. ábra. A PSC sejtjei **a-d)** citonémákat bocsájtanak az elsődleges lebeny velőállományába (MZ), melyeken keresztül feltehetően **e)** a Hh jelátvitel révén a prohemociták differenciálatlan állapotának fenntertását biztosítják. (Mandal és mtsai, 2007)

A másodlagos lebenyekben az elsődleges lebenyekre jellemző strukturális tagoltság nem figyelhető meg, ezen lebenyek szerepe a lárva stádiumban nem tisztázott.

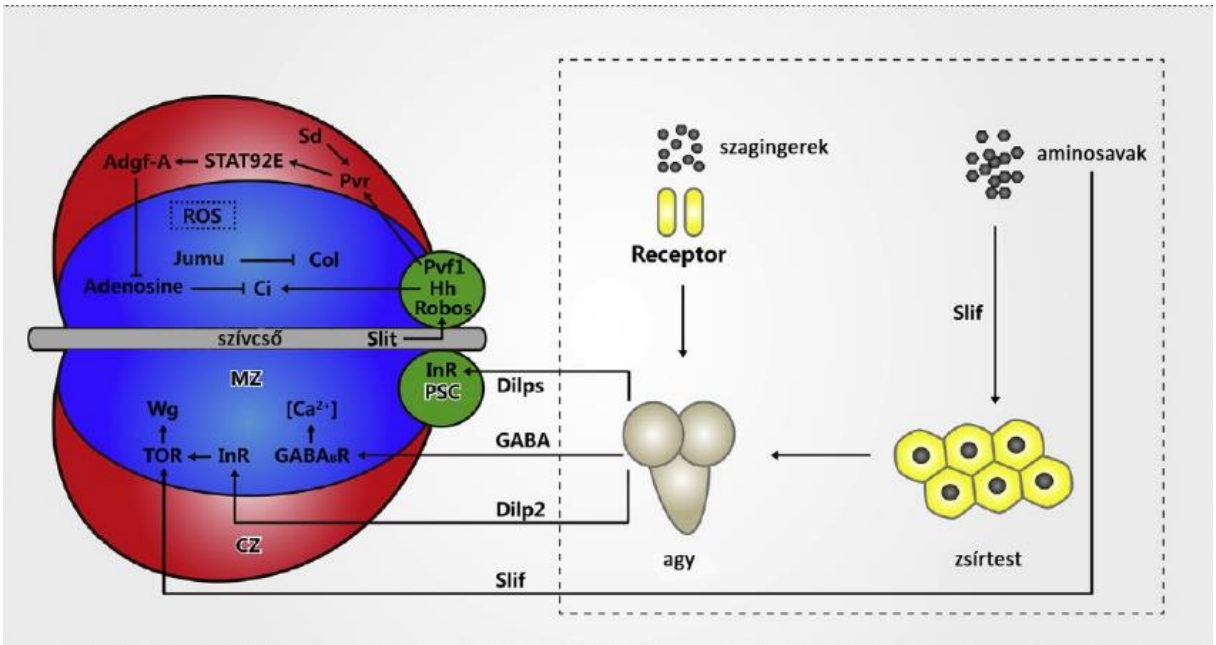
A hemocita képződés szabályozása a három vérsejtképző kompartmentum közül legrészletesebben a központi nyirokszervben ismert. Az elmúlt bő húsz év egymásnak helyenként ellentmondó kutatási eredményei egy meglehetősen összetett és bonyolult szabályozási hálózat működését rajzolták fel. A kétezres évek első felében azonosították a PSC-t és megállapították szerepét a prohemociták fenntartásában, amely folyamatban a Hh jelátvitel játssza a központi szerepet. A PSC-ből felszabaduló Hh a velőállomány sejtjein a Patched (Ptc) transzmembrán receptorhoz kötődik és aktiválja a jelátvitel intracelluláris szakaszát, melynek végrehajtó eleme a Ci transzkripciós faktor, amely valószínűleg a prohemocita állapot fennmaradásához szükséges expressziós mintázat kialakításáért felel. A Ptc koreceptora az Interference hedgehog (Ihog), amely szerepét számos szövetben megfigyelték már, azonban a vérsejtképződés tekintetében még nem vizsgálták (Jung és mtsai, 2005; Yao és mtsai, 2006; Mandal és mtsai, 2007; Krzemien és mtsai, 2007; Camp és mtsai, 2010).

Azt is kimutatták, hogy ha a PSC mérete megnövekszik, akkor erősebb gátló hatást fejt ki a prohemocitákra, ezáltal megnöveli a velőállomány kiterjedését. Számos faktorról, többek

között a Dpp-ről, a dMyc-ről, a TOR jelátvitelről, a Jumuról és Roboról is leírták, hogy befolyásolja a PSC méretét és szerkezetét, ezen keresztül pedig a vérsejtek differenciálódását (Pennetier és mtsai, 2012; Benmimoun és mtsai, 2012; Morin-Poulard és mtsai, 2016; Hao és Jin, 2017).

A PSC központi szerepét részben vitatja az a megfigyelés, hogy a PSC sejteknek a *reaper* proapoptotikus faktor túltermelésével történő eliminálása nem serkentette a vérsejt differenciálódást és a prohemociták elvesztését sem eredményezte. Ez arra utalt, hogy a niche-n kívüli jelek is részt vesznek a központi nyirokszervben történő differenciálódás szabályozásában. Ezt a lehetőséget megerősítették a velőállomány autoregulációjával kapcsolatos megfigyelések. Sinenko és munkatársai rávilágítottak, hogy a MZ sejtjei a Wingless (Wg) jelátvitel segítségével autonóm módon szabályozzák a progenitor differenciálódást, ráadásul a PSC méretét is befolyásolják. Leírták, hogy a Col a velőállomány belső sejtjeiben is kifejeződik alacsony szinten és ezek a sejtek is részt vesznek a MZ fentartásában. Azt is megfigyelték, hogy az extracelluláris mátrix szerkezete és a reaktív oxigén gyökök (ROS) szintje is befolyásolják a prohemociták fennmaradását (Sinenko és mtsai, 2009; Owusu-Ansah és Banerjee, 2009; Dragojlovics-Munther és Martinez-Agosto, 2013; Gao és mtsai, 2014; Benmimoun és mtsai, 2015; Oyallon és mtsai, 2016; Hao és Jin, 2017).

A további vizsgálatok során kiderült, hogy a kérgi zóna is hatást gyakorol az MZ sejtekre a PVR jelátvitel és az ADGF-A szekréció révén. Emellett a Slit/Robo szignalizáción keresztül a szívcső is befolyásolja a PSC méretét, de a táplálék mennyiség és a környezetből érkező hatások, például szagingerek hatására a zsírtest és az agy is képes beleszólni a központi nyirokszervben folyó szabályozásba (Mondal és mtsai, 2011 és 2014; Shim és mtsai, 2012 és 2013b; Morin-Poulard és mtsai, 2016; Fergusson és Martinez-Agosto, 2017). A központi nyirokszervben ható szabályozási hálózatról a **9. ábra** nyújt vázlatos áttekintést.



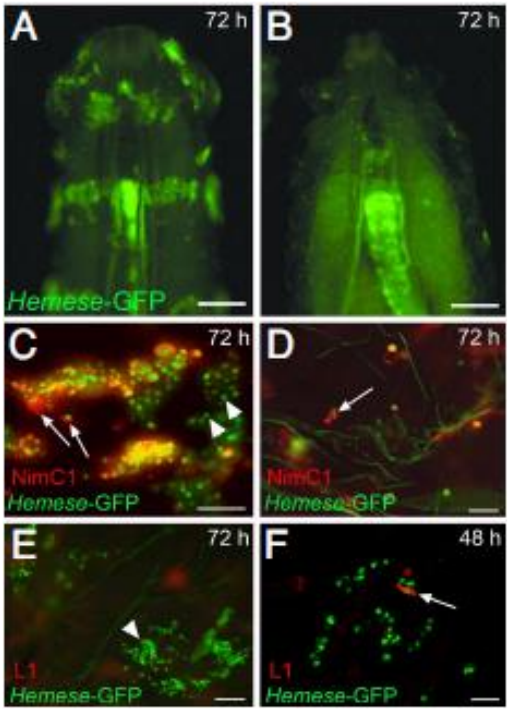
9. ábra. A központi nyirokszervben zajló differenciálódást szabályozó folyamatok összefoglaló ábrája. A központi nyirokszerv fejlődését PSC függő és független folyamatok egyaránt befolyásolják. A PSC a Hedgehog (Hh) jelátvitellel közvetlenül, illetve a Pvf/Pvr jelátvitellel a kéregállományon (CZ) keresztül közvetett módon szabályozza a velőállomány sejtjeinek fejlődését. A progenitorok differenciálódását a velőállományból származó jelek is befolyásolják (pl. Jumu, ROS) illetve a zsírtesten és az agyon keresztül a környezetből érkező ingerek és a táplálék mennyisége is hatással vannak a velőállományra (Yu és mtsai, 2017 alapján).

A központi nyirokszerv immunindukció hiányában a lárvális életszakasz végéig megőrzi integritását, azonban indukció, például parazitoid darázsfertőzés hatására a szerkezete felbomlik, sejtjei a keringésbe kerülnek, és részt vesznek a darázspete elpusztításában. Naív állapotban a velőállományban aktív JAK/STAT jelátvitel gátolja a progenitor sejtek differenciálódását a GATA/FOG aktivitás fenntartása révén. A darázsfertőzés hatására termelődő Latran antagonistaként gátolja a JAK/STAT útvonal receptorának, a Dome-nak a működését, valamint csökken a Dome-ligand Unpaired3 (Upd3) termelődése is, amely hatások a jelátviteli útvonal kikapcsolódásához és végső soron lamellocita differenciálódáshoz vezetnek. Érdekes, hogy az útvonal kulcsenzimét, a STAT transzkripciós faktort aktiváló JAK kináztt kódoló gén, a *hopscotch* funkciónyeréses mutációja (*hop*^{Tum1}) emelkedett JAK/STAT aktivitást, és azon keresztül megemelkedett vérsejtszámot és lamellocita differenciálódást okoz. Ezek az ellentmondásosnak tűnő eredmények arra utalnak, hogy az útvonal aktivitásának egy

állandó szintje szükséges a prohemocita állapot megőrzéséhet, az attól való pozitív, vagy negatív irányú eltérés egyaránt a vérsejt előalakok differenciálódásához vezet. Azt is megfigyelték, hogy a darázsfertőzés hatására megemelkedik a ROS szint a PSC-ben, melynek hatására egy EGF homológ, a Spitz ligand felszabadul a niche sejtjeiből a hemolimfába és a keringő plazmatociták lamellocitává alakulását serkenti. (Hanratty és Ryerse, 1981; Harrison és mtsai, 1995; Krzemien és mtsai, 2007; Márkus és mtsai, 2009; Honti és mtsai, 2010 és 2014; Makki és mtsai, 2010; Grigorian és mtsai, 2011b; Sinenko és mtsai, 2012; Fossett, 2013).

1.3.3. A szesszilis vérsejtképző szövet

A *Drosophila* lárva harmadik vérsejtképző kompartmentumát, a szesszilis vérsejtképző szövetet a testüreg falára kitapadt, a szelvényeknek megfelelő sávozott mintázatban elhelyezkedő hemociták alkotják. Laboratóriumunkban kimutattuk, hogy a szesszilis szövet mintázata az embrionális és lárvális fejlődés során fokozatosan alakul ki. Azt is megfigyeltük, hogy a lárva szesszilis szövetében sejtosztódás zajlik, valamint, hogy a kompartmentumot plazmatociták, kristálysejtek és prekurzor jellegű sejtek építik fel. Immunindukció hatására a szesszilis szövet szerkezete felbomlik (**10. ábra**), a hemociták differenciálódnak, és a többi kompartmentum sejtjeivel együttműködésben részt vesznek az immunválasz kialakításában (Márkus és mtsai., 2009; Honti és mtsai., 2010).



10. ábra. Immunindukció hatására a szesszilis szövet szerkezete felbomlik. **A:** harmadik stádiumú lárva szesszilis szövetének sávozott mintázata. **B:** az immunindukciót követően a szesszilis szövet szerkezete felbomlik. **C-F:** a plazmatociták **(C és D)** és a lamellociták **(E és F)** immunológiai jelölése NimC1-, illetve L1-specifikus ellenanyaggal, naiv **(C és E)** és indukált **(D és F)** lárva szesszilis szövetében. (Márkus és mtsai, 2009) Méretarány: **A** és **B** (100 μm) and **C–F** (20 μm).

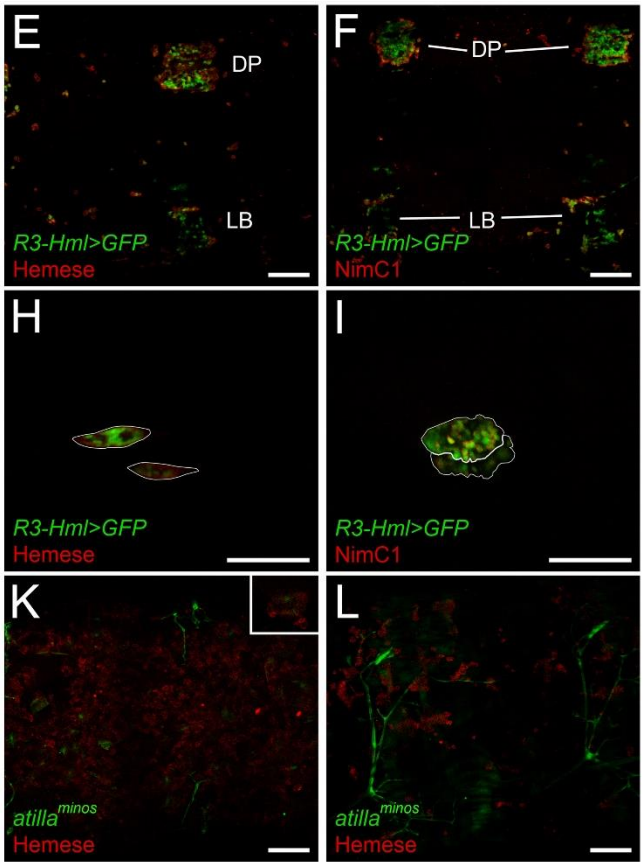
Makhijani és munkatársai megfigyelték, hogy a szesszilis szövet és a keringés dinamikus egyensúlyban vannak egymással: keringő sejtek tapadnak ki a testüreg falára, illetve szesszilis sejtek mobilizálódnak és kerülnek be a keringésbe. Ezt a dinamikus kapcsolatot a két kompartmentum között a saját megfigyeléseink is alátámasztják: konfokális videomikroszkópiás vizsgálatok során az élő lárvákban *in vivo* genetikai markerek segítségével megfigyeltünk a két kompartmentum között mozgó vérsejteket (Honti Viktor személyes közlése). Ráadásul a csoportunkban korábban végzett genetikai sejtvonaljelöléses kísérletek eredményei is arra utaltak, hogy a szesszilis szövet és a keringés egymástól nem izoláltak. Később megfigyelték, hogy a szesszilis vérsejtek perifériás neuronok nyúlványai közelében helyezkednek el, és kitapadásukat az idegsejtek nyúlványaiból felszabaduló β-activin szabályozza (Honti és mtsai, 2010; Makhijani és mtsai, 2011; Makhijani és Brückner, 2012).

Számos, a szesszilis szövet szerkezetét befolyásoló gént azonosítottak, azonban a szesszilis szövet kialakulásának és szerkezeti változásainak molekuláris háttere és pontos mechanizmusa kevéssé ismert. *In vitro* kísérletek alapján megállapították, hogy a vérsejtek és a bazális lamina közötti kapcsolat a Sydecanon keresztül valósul meg, azonban ezt *in vivo* eredmények nem támasztják alá. Ellenben csoportunkban megfigyeltük, hogy az Eater fegocitózis receptor hiányában a vérsejtek nem képesek megfelelően kitapadni a testüreg falához, így a szesszilis szövet szerkezete felbomlik (Narita és mtsai, 2004; Zettervall és mtsai, 2004; Stofanko és mtsai, 2008; Bretcher és mtsai, 2015).

Csoportunkban az utóbbi években kidolgoztunk egy *in vivo* metódust a szesszilis szövet szerkezetének és működésének vizsgálatára. A módszerben a genetikai markerek eszköztárát kombináltuk az immunfestéssel és a lárvák acetil-kolin észteráz gátlóval történő enyhe bénításával, így lehetővé vált a lárvális vérsejtek egyidejű genetikai és immunológiai jelölése és a vérsejtek összetett *in vivo* vizsgálata konfokális videomikroszkópia segítségével. Ez a

módszer egy új, egyedülálló lehetőséget nyújt a szesszilis vérsejtképző szövet vizsgálatára (Csordás és mtsai, 2014) (**11. ábra**).

A szesszilis vérsejtképző szövetben máig nem azonosítottak a PSC-hez hasonló szabályozó központot, habár a szesszilis hemociták feldúsulása egy proliferáló vérsejt populációt sejtet a lárva poszterior részében, ahol elképzelhető egy szervező központ működése (Kurucz és mtsai., 2007b; Márkus és mtsai., 2009).



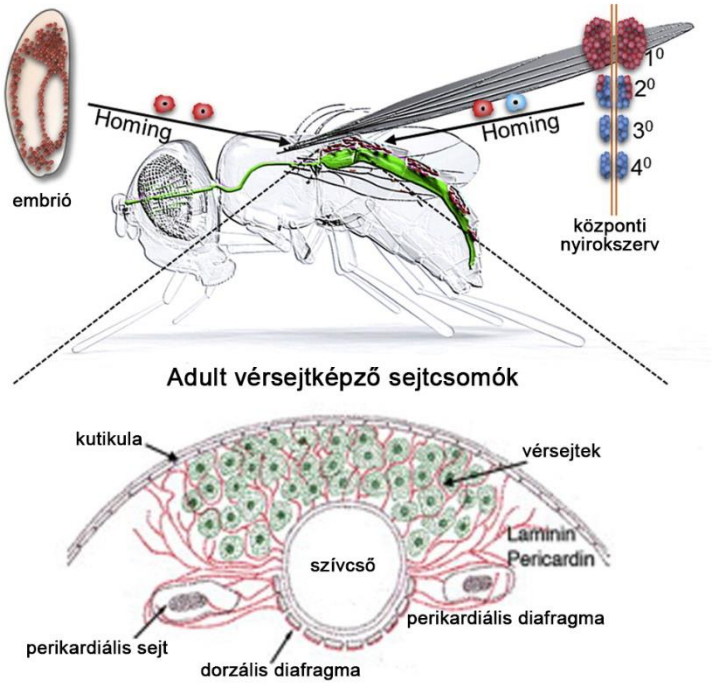
11. ábra. Az *in vivo* immunfestés módszere. A módszer egyaránt alkalmas **E és F)** a szesszilis vérsejtek és **H és I)** a központi nyirokszerv jellemzésére, és a különböző vérsejt populációk, mint **F és I)** a plazmatociták, vagy **K és L)** a lamellociták jelölésére is. (Csordás és mtsai, 2014) Méretarány: 50 µm

Egy későbbi tanulmányban megállapították, hogy a szesszilis hemociták az epidermisz és a testfalizomzat közé ékelődő vérsejtképző zsebekben helyezkednek el, amik mikrokörnyezetként szolgálhatnak a vérsejtek fejlődéséhez. Azt is megfigyelték, hogy a szesszilis vérsejtképző szövetben az érett plazmatociták egy része a Notch/Serrate jelátvitei útvonal szabályozása mellett kristálysejtekké differenciálódik. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy bár a szesszilis vérsejtképző szövetben aktív sejtosztódás és differenciálódás történik, a szövet működését nem egy dedikált szabályozó központ irányítja (Makhijani és mtsai., 2011; Leitão és Sucena, 2015).

1.4. A báb és az adult vérsejtjei

A báb stádiumban a vérsejtképző kompartmentumok szerkezete felbomlik, azokból a hemociták felszabadulnak, a fagocita sejtek részt vesznek a szövetek átrendeződése során keletkező apoptotikus törmelék eliminálásában, majd létrehozzák az adult kompartmentumait (Grigorian és mtsai., 2011; Honti és mtsai, 2014; Ghosh és mtsai, 2015).

A kifejlett egyedben két vérsejt-kompartmentum figyelhető meg: a keringés és a szesszilis hemociták. A két kompartmentumot a két vérsejt leszármazási vonal (a feji- és a kardiogén mezoderma vonala) közösen alakítja ki. A keringő sejtek legnagyobb része NimC1 markert kifejező plazmatocita, kristálysejt csak nagyon ritkán azonosítható ebben a kompartmentumban. A szesszilis sejtek négy dorzális sejtcsomót, ún. vérsejtképző központot hoznak létre a szívcső és a kutikula között (**12. ábra**). Ezeket a sejtcsomókat plazmatociták, kristálysejtek és a lárválís központi nyirokszervből származó vérsejt előalakok alkotják, és ezekben a központokban aktív vérsejt differenciálódás zajlik (Elrod-Erickson és mtsai, 2000; Honti és mtsai, 2010 és 2014; Ghosh és mtsai., 2015).



12. ábra. A kifejlett ecetmuslica vérsejtképző kompartmentumai. Az embrionális makrofág - és a központi nyirokszerv leszármazási vonal sejtjei az ún. „homing" folyamat során közösen hozzák létre az adult vérsejtképző sejtcsomóit a kutikula, a szívcső és a perikardiális diafragma között (Ghosh és mtsai, 2015 nyomán).

1.5. A vérsejtképzés transzkripciós és epigenetikai szabályozása

A hemocita sejtsors meghatározásáért a *Drosophila* vérsejtképzésével kapcsolatban elsőként azonosított transzkripciós faktor, a Serpent (Srp) a felelős, mely a GATA transzkripciós faktor fehérjecsalád tagja. Ebbe a családba számos, az emlősökben és az ecetmuslicában azonosított transzkripciós faktor tartozik, és közülük többnek a működését a vérsejtképzés során figyelték meg és jellemezték a legjobban. A családra jellemző, hogy a fehérjék legalább egy, de többnyire két cink-ujj motívumot tartalmaznak: a „C-terminális ujj" (ez minden GATA faktornak része) a WGATAR konszenzus DNS szekvencia felismeréséért és megkötéséért, az „N-terminális ujj" pedig a kötés stabilizálásáért és más fehérjékkel történő interakcióért felelős. A feji mezoderma és az embrionális és lárvális központi nyirokszerv progenitor sejtjeiben kifejeződő Srp-nek két, alternatív splicing révén keletkező, aktív izoformáját azonosították, melyek különböző kölcsönható partnerekhez kapcsolódnak és különböző gének aktivitását fokozzák (Lebestky és mtsai, 2000; Fossett és Schulz, 2001; Fossett és mtsai, 2003).

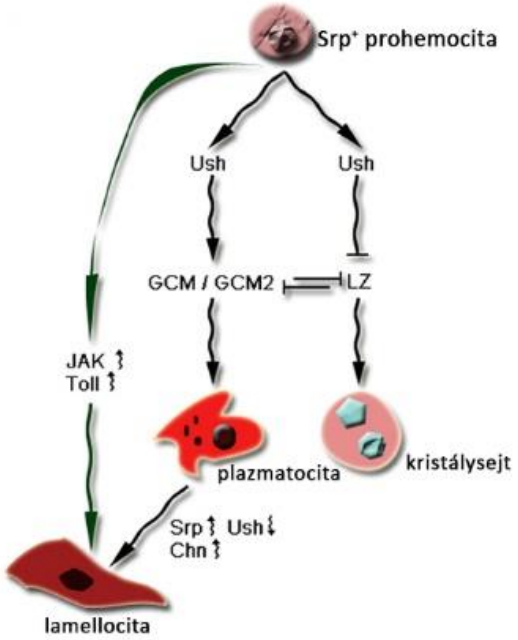
Az emlősök vérsejtképzésében szintén alapvető fehérjecsalád, a FOG (Friend Of GATA) család tagja, a *Drosophila*ban a U-shaped (Ush), amely a Serpent korepresszoraként, azzal kapcsolódva gátolja a kristálysejt-sors determinációját. A Srp hatására kifejeződő Gcm/Gcm2, valamint a Srp és a Ush együttesen felelős a makrofág irányú determinációért (**13. ábra**) (Lebestky és mtsai, 2000; Fossett és Schulz, 2001; Fossett és mtsai, 2001).

A kristálysejt fejlődési vonal meghatározó, alapvető transzkripciós faktora a RUNX családba tartozó Lozenge (Lz). A családba tartozó gének jelentős része szerepet játszik az emlősök vérsejtképzésében, egyes faktorok mutációját különböző leukémiákban is azonosították. A *lozenge* a feji mezoderma Srp-et kifejező sejtjeinek egy részében aktív, és ezekben a sejtekben a Serpenttel együttműködve, a Ush-t szuppresszálva indukálja a kristálysejt irányba történő fejlődést (**13. ábra**). A Lz negatív sejtek makrofágokká differenciálódnak

(Lebestky és mtsai, 2000; Fossett és Schulz, 2001; Bataillé és mtsai, 2005; Muratoglu és mtsai, 2006; Ferjoux és mtsai, 2007; Terriente-Felix és mtsai, 2013).

Érdekes, hogy a lamellocita differenciálódás szabályozását az embrionális vérsejtképződést irányító transzkriciós faktorok, a Serpent és a U-shaped végzik: a Serpent túltermelése a plazmatocitákban a bekebelező sejtek lamellocitává alakulását eredményezi, amely folyamatot feltehetően a U-shaped gátolja (**13. ábra**) (Sorrentino és mtsai, 2007; Kroeger és mtsai, 2012).

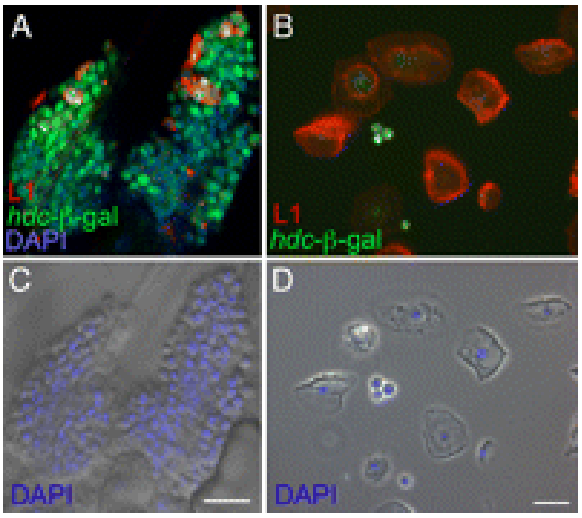
A plazmatocita – lamellocita átalakulásban szerepet játszó egyik epigenetikai faktor a CoREST represszor komplex tagja, a Charlatan (Chn): a Chn plazmatocita-specifikus túltermelése lamellocita képződéshez vezet. Egy másik epigenetikus regulátor, a multiple sex combs (mxc) funkcióvesztése sejtautonóm módon serkenti a plazmatociták osztódását és a lamellociták kialakulását. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a lamellocita differenciálódás epigenetikai gátlás alatt állhat (*mxc*), azonban a plazmatocita – lamellocita átlakuláshoz ennek a gátlásnak a feloldása mellett szükség lehet a plazmatocita-specifikus gének kikapcsolására, amelynek egyik fontos végrehajtója lehet a Chn (Remillieux-Leschelle és mtsai, 2002; Stofanko és mtsai, 2010).



13. ábra. A *Drosophila* hemociták differenciálódását szabályozó transzkripciós faktor hálózat. A hemocita sejtsorsot a GATA transzkripciós faktor Serpent (Srp) korai kifejeződése határozza meg a prohemocitákban. A Srp a FOG transzkripciós faktor U-shaped-del (Ush) együttműködésben aktiválják a Glial cell missing (Gcm) és a Gcm2 transzkripciós faktorok kifejeződését, amelyek a plazmatocita-specifikus gének kifejeződését biztosítják. A prohemociták kis hányadában kifejeződő Lozange (Lz) transzkripciós faktor a Ush antagonistájaként gátolja a Gcm/Gcm2 kifejeződését. A Lz-t kifejező sejtek kristálysejtekké differenciálódnak. A lamellociták két forrásból származnak: a plazmatociták a Srp és a Charlatan (Chn) túltermelése, vagy a Ush funkcióvesztése esetén képesek transzdifferenciálódni lamellocitává; a központi nyirokszerv prohemocitái pedig többek között a JAK/STAT és a Toll jelátvitel túlaktiválásának hatására differenciálódnak lamellocitává. (Wang és mtsai, 2014 nyomán)

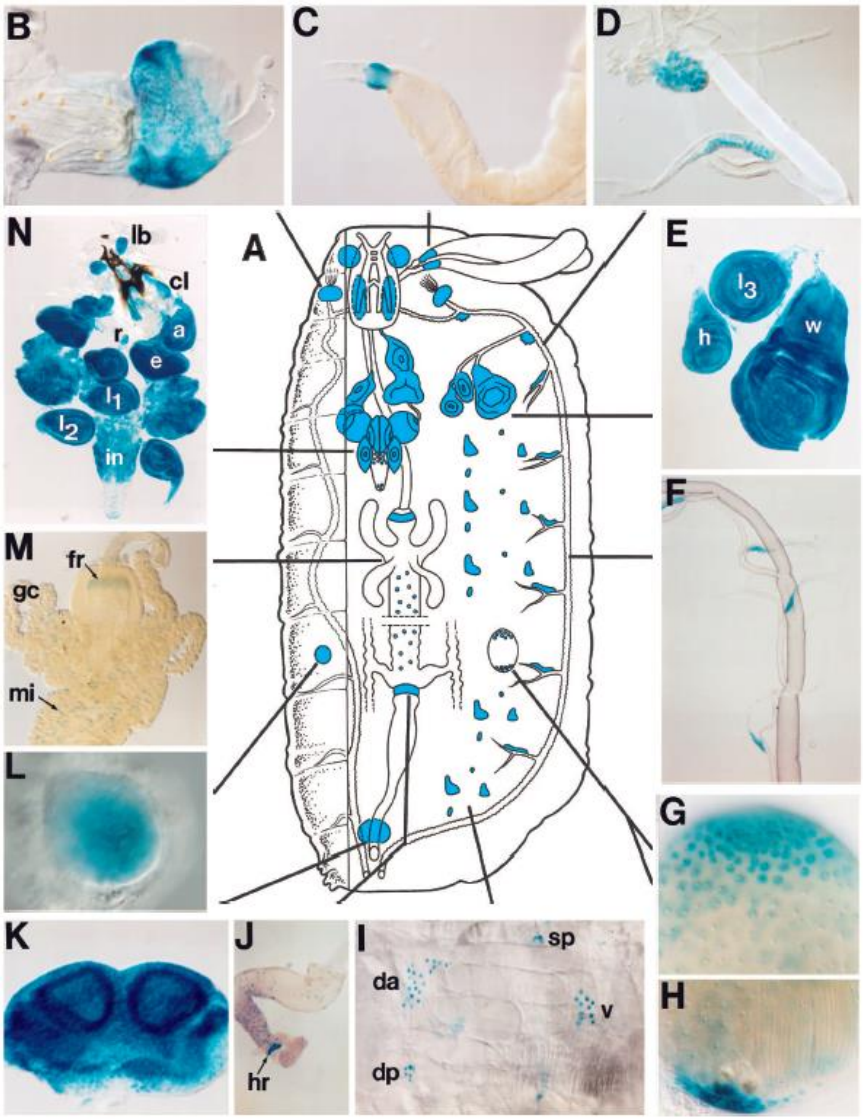
1.6. A *headcase*, a differenciálódás szabályozó faktora

Csoportunkban korábban szűrővizsgálatot végeztünk, melynek célja az volt, hogy a vérsejtképző kompartmentumok és a vérsejt populációk elkülönítésére és jellemzésére alkalmas genetikai markereket azonosítsunk. A *headcase* (*hdc*) gén kifejeződési mintázatát mutató LacZ tartalmú enhanszercsapdázó P elem beépülés (hdc^{B5}) vizsgálata során megállapítottuk, hogy a *hdc* a három lárvális vérsejtképző kompartmentum közül kizárólag a központi nyirokszervben fejeződik ki. Azt is megfigyeltük, hogy az immunindukció hatására a nyirokszervből felszabaduló és differenciálódó hemocitákban a gén aktivitása lecseng (**14. ábra**). Ez azt sugallta, hogy a *hdc* a központi nyirokszervben részt vehet a vérsejtek érésének szabályozásában (Weaver és White, 1995; Márkus és mtsai. 2009).



14. ábra. A és C) A *hdc* kifejeződik a központi nyirokszervben, azonban **B és D)** az immunindukció hatására differenciálódó sejtekben az aktivitása lecseng (Márkus és mtsai, 2009). Lamellocita – L1 (piros), *hdc* – anti-β-gal (zöld), sejtmag – DAPI (kék). Méretarány: 20 µm.

A Hdc volt az első olyan citoplazmatikus fehérje, amelyről leírták, hogy minden imaginális szövetben kifejeződik, ezáltal lehetővé vált az adult szerv- és szövetkezdemények korai azonosítása és morfogenezisük nyomon követése az embriótól a kifejlett egyedig (**15. ábra**). Ráadásul megállapították, hogy az imaginális szövetekben termelődő fehérje sejtautonóm módon gátolja ezen szövetek sejtjeinek differenciálódását. Kifejeződése a fejlődő szervkezdeményekben az utolsó mitotikus osztódásig fennmarad, majd a metamorfózis kezdetén a gén aktivitása megszűnik, és a kifejlett egyedet kialakító struktúrák sejtjei differenciálódásnak indulnak (Weaver és White, 1995).



15. ábra. A *hdc* kifejeződik az összes imaginális szövetben. **A)** A harmadik stádiumú lárva sematikus keresztmetszeti képén az imaginális szöveteket kék szín jelöli. B-N) A *P{LacZ}hdc*^{B5} lárva szöveteiben a *hdc* kifejeződését X-gal festéssel (kék) tették láthatóvá. A *hdc* kifejeződik B) a dorzális protorakális imágókorongban, C) az imaginális nyálmirigy gyűrűben, D) az imaginális tracheoblasztokban, E) a szárny - (w), a metatorakális láb - (l_3) és a billér (h) imágókorongokban, F) az imaginális tracheoblasztokban, G) az ivarsejt kezdeményekben, H) a here terminális sejtjeiben, I) a ventrális (v), a dorzális anterior (da), a dorzális poszterior (dp) és a spirakuláris hisztoblasztokban, J) a végbél imágógyűrűjében, K) az ivarlemezben, L) a petefészekben, M) az előbél imágógyűrűjében, valamint N) a központi idegrendszerhez kapcsolódó és a fej vázát kialakító imaginális szövetekben: a csáp diszkuszban (a), a szemdiszkuszban (e), a protorakális- (l_1) és a mezotorakális (l_2) lábdiszkuszban, a szájszerv diszkuszaiban (lb és cl), az imaginális neuroblasztokban (in) és a gyűrűmirigyben (r). (Weaver és White, 1995).

Későbbi vizsgálatok során megfigyelték, hogy ez a fehérje sejtautonóm és nem-sejtautonóm szabályozási folyamatokban egyaránt részt vesz. A légcsőrendszer embrionális fejlődése során a tracheaelágazások „fúzionáló sejtjeiben” (fusion cell) kifejeződő Headcase nem-sejtautonóm módon gátolja a szomszédos sejtek differenciálódását, ezzel megakadályozza

további elágazások képződését. Ugyanakkor az idegrendszer fejlődésében is megfigyelték a Hdc szerepét: a ddaC neuronok „dendrit rövidülésének” (dendrite pruning) szabályozásában vesz részt, hatása ez esetben sejtautonóm (Steneberg és mtsai, 1998; Steneberg és Samakovlis, 2001; Loncle és Williams, 2012).

Azt is kimutatták, hogy a *hdc* mRNS-ében található UAA stop kodont a trachea transzlációs gépezete az ún. kodon szuppresszió során képes értelmes kódként felismerni és a transzkripciót folytatni. Az így létrejövő hosszabb fehérje vesz részt a trachea ágak fejlődésének szabályozásában (Steneberg és mtsai, 1998; Steneberg és Samakovlis, 2001).

A Hdc működésére nem csak a különböző differenciálódási folyamatok szabályozása során van szükség. A fehérje fontos szerepet játszik a here össejt niche egyik szomatikus sejttipusának az ún. „hub” sejteknek a túlélésében és ez által az ivari őssejt niche fenntartásában, valamint a bélhám őssejtek és az enteroblasztok fennmaradásában is. Az utóbbi években leírták a Hdc kapcsolatát a mTOR jelátviteli útvonallal, melyen keresztül hatással van a szövetnövekedés, a sejtosztódás és a differenciálódás szabályozására különböző szövetekben (Resende és mtsai, 2013; Avet-Rochex és mtsai, 2014; Resende és mtsai, 2017; Li és mtsai, 2019).

A Hdc aminosav sorrendje nem tartalmaz ismert funkcióhoz köthető doméneket, azonban a fehérje közepén található „középső domén” erősen konzervált a fehérje homológjai és ortológjai között. A Hdc fehérje humán homológjának, a HECA-nak tumorszuppresszor hatását figyelték meg száj laphám karcinómából származó sejtvonalak vizsgálata során. Sejtosztódást gátló hatását valószínűleg ciklinekkel és CDK-kal való kölcsönhatása révén fejti ki. Vastagbél tumorok korai diagnózisában is hasznos markernek bizonyult a fehérje (Chien és mtsai, 2006; Dowejko és mtsai, 2009; Dowejko és mtsai; 2012).

Mivel a *hdc* kifejeződik az ecetmuslica lárva központi nyirokszervében, azonban a nyirokszervből származó effektor sejtekben a gén aktivitása lecseng, érdekesnek tűnt

megvizsgálni a faktor esetleges szerepét a vérsejtek érésének szabályozásában. Ráadásul a Hdc-ről szerzett ismereteink nem csak a *Drosophila* vérsejtképzésének alaposabb megértését szolgálhatják, de más fejlődési folyamatok, sőt a humán tumorképződés tanulmányozása szempontjából is érdeklődésre tarthatnak számot.

2. Célkitűzések

Annak érdekében, hogy a *hdc* kifejeződési mintázatát az élő állatokban is követhessük, a P elem konverzió módszerével egy *hdc-Gal4* genetikai meghajtóelem előállítását terveztük.

Az előállított meghajtóelem segítségével kívántuk követni a *hdc* kifejeződési mintázatának változását a vérsejtképző kompartmentumokban a lárvális fejlődés során, különös tekintettel a központi nyirokszervre, az egyetlenre a kompartmentumok közzül, ahol tudomásunk szerint kifejeződik a faktor.

Mivel nem állt rendelkezésre molekulárisan is jellemzett null mutáns, ezért a P elem mozgatáson alapuló mutáns előállítás módszerével amorf *hdc* allél előállítását és jellemzését terveztük.

Az előállított mutáció vérsejtképződésre gyakorolt hatását is meg kívántuk vizsgálni, valamint meghatározni a mutáció fókuszát, vagyis azokat a sejteket, amelyekben kifejti a hatását a vérsejtképződésre.

Korábban a vérsejtképzés szabályozásában már azonosított faktorok túltermelésével és csendesítésével genetikai interakciós szűrővizsgálatot terveztünk annak érdekében, hogy azonosítsuk a Hdc lehetséges együttműködő partnereit.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok:

3.1.1. Pufferek, vegyszerek:

Schneider's médium (Lonza 04-351 Q)

FBS (Gibco 10270)

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

BSA (Roche 10735078001): marha szérum-albumin

Fluoromount G (SouthernBiotech 0100-01): fedő médium

PTU (Sigma-Aldrich P7629): 1-fenil-2-tiourea, gátolja a melanizációt

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

TritonX 100 (Sigma-Aldrich T8787)

PBT: 0.1 % v/v Tween-20 (Sigma P-1379) 1xPBS-ben

X-gal (Fermentas R0404)

$K_3[Fe(CN)_6]$: kálium-ferricianid

$K_4[Fe(CN)_6]$: kálium-ferrocianid

Dichlorvos (Flukar 45441): acetil-kolin észteráz gátló

n-Heptán (Reanal B000474)

Voltalef olaj (VWR 24627.188)

Paraformaldehid (MERCK 1.04005.1000)

3.1.2. Felhasznált ellenanyagok:

Humán leukocita antigén specifikus ellenanyag: T2/48 (Vilmos és mtsai, 2004), negatív kontroll elsődleges ellenanyag

Hemese specifikus ellenanyag: 1.2/1 hibridóma felülúszó (Kurucz és mtsai 2003), a vérsejtek jelölésére használt elsődleges ellenanyag

NimC1 specifikus ellenanyag keverék (P1): N1 és N47 hibridóma felülúszók elegye (Kurucz és mtsai 2007b), a plazmatociták jelölésére használt elsődleges ellenanyag

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

Col specifikus ellenanyag: αCol ellenanyag (Michelle Crozatier ajándéka), a PSC jelölésére használt elsődleges ellenanyag, 1:100 hígításban alkalmaztuk

Alexa568 konjugált, kecskében termeltetett anti-egér Ig másodlagos ellenanyag (Biotium 20100), 1:1000 hígításban alkalmaztuk

3.2. Felhasznált *Drosophila* törzsek:

w^{1118} (BSC#9505): a szemszín kialakulásáért felelős gén mutációja, a kifejlett egyedek szemszíne fehér.

w; SM6b/Sco: Sco: domináns markerrel jelölt második kromoszómát *SM6b* balanszer kromoszóma felett hordozó vonal. Második kromoszómás inszerciót, vagy rekombináns második kromoszómát hordozó tiszta vonalak előállításához használtuk.

w; TM3/TM6D^{3}: két harmadik kromoszómás balanszert hordozó törzs. Harmadik kromoszómás inszerciók balanszírozásához használtuk.

w; Pbl/TM3, Kr>GFP: az *in vivo* markerelt *TM3* balanszer kromoszóma forrásaként használtuk.

y, w; UAS-2xEGFP (BSC#6658): (y[*] w[*]; P{w[+mC]=UAS-2xEGFP}AH3) erősített GFP riporter konstrukció a harmadik kromoszómán, melynek a vezérlését UAS elem végzi. Meghajtóelemek kifejeződési mintázatának vizsgálatára alkalmaztuk.

w; HmlΔGal4, UAS-GFP (Sinenko és Mathey-Prevot, 2004): (*w[1118]; P{w[+mC]=HmlΔ-GAL4} P{w[+mC]=UAS-2xEGFP}*) a hemocitákban GFP-t kifejező transzgenikus kombináció, a riporter expresszió nem csak a keringő és szesszilis vérsejtek 80%-ában, hanem a központi nyirokszerv kérgi részének sejtjeiben is megfigyelhető. A Gal4 kifejeződését a von Willebrand-faktor homológjaként leírt *hemolectin* gén szabályozó régiója vezérli (Goto és mtsai, 2003).

w; UAS-hdcRNAi (VDRC#v45069): a *hdc* csendesítésére alkalmas kettős szálú RNS-t kódoló konstrukciót hordozó vonal. A dsRNS kifejeződését *UAS* elem biztosítja.

w; HmlΔGal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNAi: jelen munka során, rekombinációs szűrővizsgálat révén előállított transzgenikus kombináció. A *HmlΔGal4* genetikai meghajtóelem a riporter *UAS-GFP* konstrukció mellett a *hdc* csendesítő transzgén működését is biztosítja.

w; P{GawB}5015 (BSC#2721): *P{GawB}* beépülés a második kromoszómán. A P elem konverziós szűrővizsgálat során *P{GawB}* forrásként alkalmaztuk.

w; P{LacZ}hdc^{B5} (Christos Samakovlis ajándéka): enhancer csapdázó *P{LacZ}* beépülés a *hdc* szabályozó régiójában. A P elembe épített promóter szekvencia a beépülés helyén ható enhancer aktivitásokat felhasználva, a *hdc* kifejeződési mintázatának megfelelően biztosítja a *LacZ* kifejeződését, melyet X-Gal festéssel detektáltunk.

w; hdc^{19}-Gal4/TM3, Kr>GFP: jelen munka során, P elem konverziós szűrővizsgálat révén létrehozott, a *hdc* szabályozó régiója által vezérelt Gal4-es meghajtó elemet hordozó enhanszer csapdázó inszerció. Kifejeződési mintázata megegyezik a *hdc* ismert mintázatával. A *hdc* amorf alléljához hasonlóan recesszív letális fenotípust mutat: a homozigóta egyedek a báb stádiumban elpusztulnak. A balanszer kromoszómára épített *in vivo* GFP marker lehetővé teszi a homozigóta lárvák azonosítását és vizsgálatát.

w; hdc$^{\Delta 84}$/TM3, Kr>GFP: jelen munka során, P elem mozgatáson alapuló mutánselőállítás révén létrehozott deficiencia, mely báb stádiumban letális. A balanszer kromoszómára épített *in vivo* GFP marker lehetővé teszi a homozigóta lárvák azonosítását és vizsgálatát.

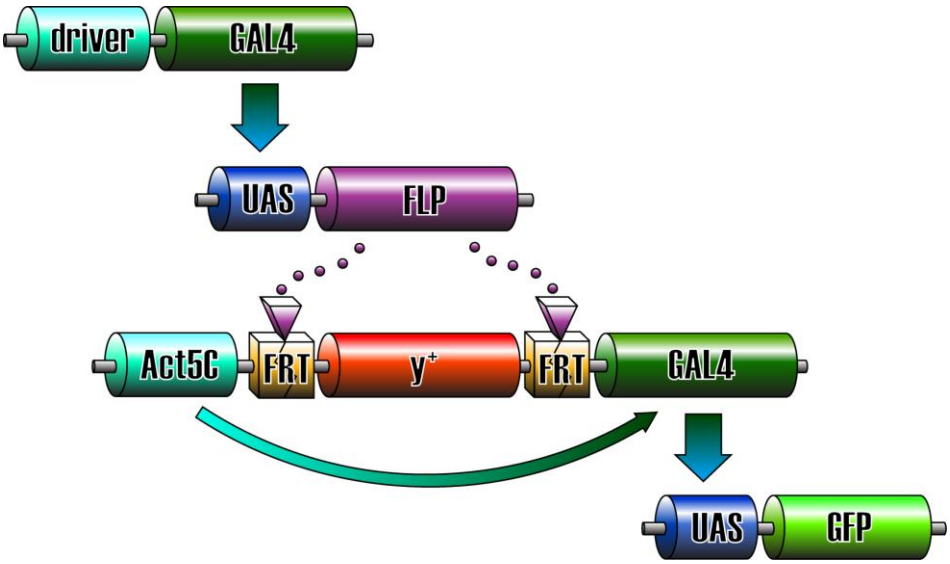
w; hdc^{43}/TM6, Tb (Weaver és White, 1996; BSC#64063): amorf *hdc* allél. A *Tb* lárvális marker lehetővé teszi a homozigóta lárvák azonosítását és vizsgálatát.

w; Dot-Gal4 (BSC#67608): (*w; P{Dot-GAL4.K}11C, P{UAS-GFP.U}2*) transzgenikus kombináció, melyben a *Gal4* kifejeződését a *Dorothy* gén szabályozó régiója biztosítja. A meghajtóelem a vérsejtképző kompartmentumok közül, kizárólag a központi nyirokszervben aktív (Honti és mtsai, 2010). A meghajtóelem alkalmazásával a központi nyirokszerv sejtjeiben működtettünk UAS konstrukciókat.

w; Dot-Gal4,UAS-hdcRNAi: jelen munka során, rekombinációs szűrővizsgálat révén előállított transzgenikus kombináció. A *hdc* szövetspecifikus csendesítését a *Dot-Gal4* meghajtóelem biztosítja.

y, w, UAS-FLP; Dot-Gal4, AFG, UAS-GFP (Honti és mtsai, 2010): a Flp-FRT (Flip-flip recognition target) vezérelt szomatikus rekombináción alapuló genetikai sejtvonaljelölő rendszert. Az *actin5c-Gal4* konstitutívan aktív meghajtóelem működését az FRT szekvenciák közé épített *yellow^{+}* kazetta gátolja, melyet a *Dot-Gal4* meghajtóelem révén termeltetett Flp

rekombináz eltávolít. Ennek köszönhetően a *Dot-Gal4* által kijelölt sejtekben és azok utódsejtjeiben állandó GFP kifejeződés figyelhető meg (**16. ábra**).



16. ábra. A genetikai sejtvonaljelölő rendszer működési sémája. A konstitutívan aktív *Act5c-Gal4* meghajtóelem működését az *FRT* szekvenciák közé épített, Y^+ markert tartalmazó kazetta gátolja. Ezt a gátló elemet a Flip rekombináz (Flp) az FRT helyek közötti szomatikus rekombináció révén aktiválja, amely ezt követően a sejtben és minden utódsejtjében, a differenciálódástól és az osztódástól függetlenül aktív marad. A Flp termelődését, vagyis a sejtvonaljelölő transzgén aktiválását a megfelelően kiválasztott genetikai meghajtóelem (*driver-Gal4*) biztosítja.

Ez a transzgenikus kombináció alkalmas a központi nyirokszerv eredetű hemocita leszármazási vonal követésére és további transzgének vonalspecifikus működtetésére.

w; Pcol85-Gal4/CyO, GFP (Krzemień és mtsai. 2007): a Gal4 *col*-specifikus kifejeződését biztosító transzgén.

w; P{UAS-hdc.S}3 (Christos Samakovlis ajándéka): a *hdc* szövetspecifikus túltermelésére alkalmazott transzgén. A konstrukció tartalmazza a teljes hosszúságú *hdc*

mRNS-t kódoló szekvenciát, így a hosszú és a rövid fehérje változat kifejeződését is lehetővé teszi.

w; P{UAS-hdc.S}2: a *P{UAS-hdc.S}* elem jelen munka során létrehozott második kromoszómás beépülése.

w; Pcol85-Gal4, UAS-hdcRNAi/CyO, GFP: jelen munka során, rekombinációs szűrővizsgálat révén előállított transzgenikus kombináció. A *hdc* szövetspecifikus csendesítését a *Pcol85-Gal4* meghajtóelem biztosítja.

w; Sp/CyO; UAS-hh(M4)/TM6b (Matusek Tamás ajándéka): a Hedgehog (Hh) túltermelésére alkalmas *UAS* transzgént hordozó vonal.

y, w, hs-Flp; UAS-Ihog; TM2/TM6 (Matusek Tamás ajándéka): az Ihog túltermelésére alkalmas *UAS* transzgént hordozó vonal.

w; UAS-Ci^{cell} (Matusek Tamás ajándéka): a Cubitus interruptus túltermelésére alkalmas *UAS* transzgént hordozó vonal.

w; UAS-dpp (BSC#1486): a Decapentaplegic (Dpp) túltermelésére alkalmas *UAS* transzgént hordozó vonal.

w; UAS-hepRNAi (VDRC#v47507): a *hemipterus* (*hep*) gén csendesítésére alkalmas *UAS* transzgént hordozó vonal.

w; UAS-hopRNAi (VDRC#v102830): a hop csendesítésére alkalmas *UAS* transzgént hordozó vonal.

A vonalakat fenntartása és a keresztezések kivitelezése normál *Drosophila* táptalajon történt 25 °C-on.

3.3. Módszerek:

3.3.1. Drosophila *lárvák* in vivo *vizsgálata:*

Olympus FV 1000 konfokális, illetve Leica MZ FL III UV-sztereomikroszkóp segítségével, GFP szűrőn át figyeltük meg az élő lárvákat és kifejlett egyedeket.

3.3.2. Fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálat:

A vérsejt mintákat Zeiss Axioskop2 MOT fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk, a felvételeket AxioVision szoftver segítségével rögzítettük. A fluoreszcens színcsatornákat Adobe Photoshop képkezelő szoftverrel illesztettük egymásra.

3.3.3. Konfokális mikroszkópiás vizsgálat:

A központi nyirokszerv, imágókorong, abdominális hisztoblaszt és ivarlemez preparátumokat Olympus FV 1000 és Leica TCS SP5 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, a felvételeket Olympus Fluoview 1000, LAS AF Lite (Leica Microsystems CMS GmbH), ImageJ és Adobe Photoshop CS2 program segítségével készítettük és elemeztük.

3.3.4. A szesszilis szövet konfokális mikroszkópiás vizsgálata in vivo indirect immunfluoreszcenciával:

A vizsgálatokat a Csordás és munkatársai által kidolgozott módszer szerint végeztük (Csordás és mtsai. 2014). A harmadik stádiumú lárvák testüregébe a megfelelő elsődleges és másodlagos ellenanyagok 1000:1 arányú keverékét injektáltuk. Ezt követően a lárvákat acetilkolin-észteráz gátlóval megbénítottuk, heptánban oldott ragasztóval kezelt tárgylemezre helyeztük, majd Voltalef olajjal lefedtük. Az élő lárvák szesszilis szövetét Leica LSM mikroszkóppal vizsgáltuk, a felvételeket a LAS AF Lite és az ImageJ szoftver segítségével dolgoztuk fel.

3.3.5. Immunindukció:

Második stádiumú lárvákat Leptopilina boulardi G486 parazitoid darázzsal fertőztük: 50 lárvához 8 megtermékenyített nőstény darazsat helyeztünk a fiolába. A fertőzéseket 3 órán át 25°C-on végeztük.

3.3.6. A keringő vérsejtek vizsgálata indirekt immun-fluoreszcenciával:

A hemocitákat naiv vándorló lárvákból, illetve, a parazitoid darázsfertőzést követően 72 órával, immunindukált lárvákból izoláltuk 12 lyukú tárgylemezen (Hendley-Essex SM011). A lárvák kutikuláját egy csepp, PTU-t tartalmazó 5% FBS-sel kiegészített Schneider's médiumban feltéptük, majd enyhén megráztuk, így a vérsejtek a folyadékba kerültek. Az izolátumokat ezt követően nedves kamrában, szobahőmérsékleten, egy órán keresztül inkubáltuk, eközben a sejtek a tárgylemez felszínéhez tapadtak. A PTU-t tartalmazó S&S cseppek eltávolítását követően a mintákat frissen előállított 2%-os paraformaldehid oldatban 10 percig (GFP-t kifejező transzgenikus vonalak esetén), vagy acetonban 6 percig fixáltuk szobahőmérsékleten. Ezután a preparátumokat 0,1% BSA-PBS-ben telítettük, majd egy órán keresztül, nedves kamrában, szobahőmérsékleten inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal. Az inkubációs idő letelte után a mintákat PBS-ben mostuk, és a másodlagos ellenanyaggal nedves kamrában, szobahőmérsékleten, 45 percig inkubáltuk. Elsődleges ellenanyagként három L1 specifikus ellenanyag keverékét használtuk a lamellociták jelölésére (H10/9, 7A6, 29D4), valamint Hemese specifikus 1.2 ellenanyagot, mint pozitív, és humán leukocita antigén specifikus T2/48 ellenanyagot, mint negatív kontrollt. Másodlagos ellenanyagként CF568 konjugált anti-egér immunglobulint alkalmaztunk, melyet 1:1000 arányban hígítottuk 0,1% BSA-PBS-ben. A sejtmagok jelölésére használt DAPI-t a másodlagos ellenanyaggal együtt adtuk a mintákhoz 1:400 hígításban. Végül a preparátumokat fedőmédiummal fedtük és

fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk. A hemociták számát a DAPI jelölés, a lamellociták arányát pedig az L1 festődés alapján határoztuk meg ImageJ szoftver segítségével.

3.3.7. Imágókorong preparátum készítése:

Harmadik stádiumú lárvák imágókorongjait 0,01% Triton X-100-zal kiegészített PBS pufferben izoláltuk, majd 20 percig fixáltuk 0,01% Triton X-100-at tartalmazó, PBS-ben higított 4%-os paraformaldehidben, végül PBS-ben történő mosást követően tárgylemezre helyeztük és Fluoromount-G médiummal fedtük. A mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk és dokumentáltuk.

3.3.8. Központi nyirokszerv, abdominális hisztoblaszt és ivarlemez preparátum készítése:

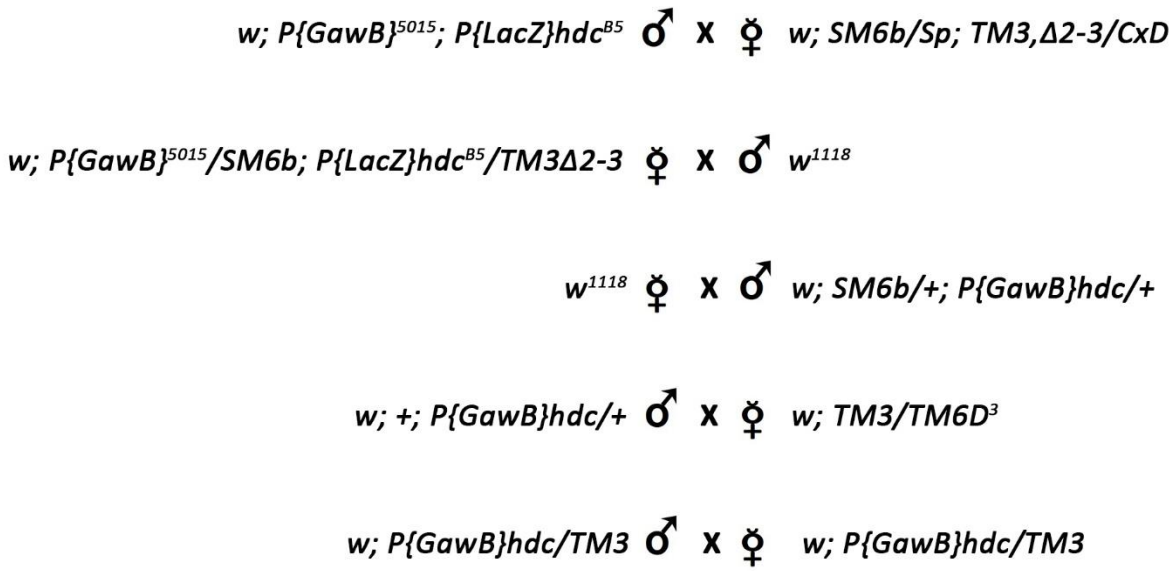
A harmadik stádiumú lárvákat gumipárnán 60 µl, PTU-val és 5% FBS-sel kiegészített Schneider's médiumba helyeztük, feji és farki végüket rögzítettük, majd csipesszel a feji-farki tengely mentén feltártuk. A kiszabaduló hemocitáktól és egyéb törmeléktől mosással szabadultunk meg, majd a vizsgálni nem kívánt szerveket és szöveteket csipesz segítségével eltávolítottuk. A preparátumokat 2%-os paraformaldehidben 10 percig fixáltuk, majd mikrotiter lemez egy lyukába helyeztük és PBS-sel mostuk. Ezután 0,01% Triton X-100 nemionos felületaktív vegyszerrel kiegészített 0,1% BSA-PBS-ben telítettük, majd 12-16 órán keresztül inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal 4 ^{o}C-on. Ezt újabb PBS-ben történő mosás követte, ami után 45 percig inkubáltuk a mintát a DAPI-val kiegészített (1:400) másodlagos ellenanyaggal (CF568 konjugált anti-egér Ig 1:1000) szobahőmérsékleten, majd PBS-sel történő mosást követően a preparátumot tárgylemezre helyeztük, FluoromountG fedőmédiumban fedőlemezzel lefedtük és konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk.

3.3.9. X-gal festés:

Vándorló lárvákból imágó korongokat preparáltunk PBT pufferben, jégen, majd 20 pecig szobahőmérsékleten fixáltuk 2,5%-os, PBS pufferben hígított glutáraldehid oldatban. A mintákat kétszeri PBT pufferben történő mosást követően 30 percig inkubáltuk a festő oldatban (0.2% X-GAL, 5mM $K_3[Fe(CN)_6]$ és 5mM $K_4[Fe(CN)_6]$ PBS pufferben) 37 °C-on, majd háromszor mostuk PBS pufferben, végül PBS és glicerol 1:1 arányú keverékével fedtük.

3.3.10.* hdc-Gal4 *vonalak létrehozása P elem konverzióval:

A P elem konverziót Sepp és Auld, 1999 közleménye alapján hajtottuk végre. *w; P{GawB}^{5015}; P{LacZ}hdc^{B5}* hímeket *w; SM6b/Sp; TM3,Δ2-3/CxD* szűz nőstényekhez kereszteztük. Az utódok közül *w; P{GawB}/SM6b; P{LacZ}hdc^{B5}/TM3,Δ2-3* genotípusú, "jump starter" szüzeket gyűjtöttünk, annak érdekében, hogy a konverzióhoz feltehetően szükséges rekombinációs mechanizmus működését biztosítsuk. A szüzeket párkeresztezésbe vittük *w^{1118}* hímekkel. Az utódok közül a *w; SM6b/+; P{GawB}hdc/+* genotípusú (piros szemű) hímeket kereszteztük, *w^{1118}* szüzekhez. A szegregáció alapján kromoszómára térképeztük a



17. ábra. A *P{GawB}hdc* beépülés előállítási sémája.

beépüléseket. Harmadik kromoszómásnak tekintettük az inszerciót, ha az *SM6b* balanszer kromoszómától és a nemtől függetlenül szegregált. A jelölteket *y, w; UAS-2xEGFP* szüzekhez kereszteztük, a kifejeződési mintázat ellenőrzése érdekében. A harmadik kromoszómás, *hdc*-nek megfelelő kifejeződési mintázatot mutató vonalak hím egyedeit *w; TM3/TM6D*^{3} szüzekhez kereszteztük, és az inszerciót balanszer kromoszóma felett törzsbe állítottuk (**17.ábra**). A *P{GawB}* elem elvesztését X-gal festéssel ellenőriztük.

3.3.11. A P elem beépülések molekuláris térképezése polimeráz láncreakcióval:

A *P{LacZ}hdc*^{B5} elem beépülésének pontos meghatározásához polimeráz láncreakción alapuló szűrővizsgálatot végeztünk, melyhez a P elemre specifikus reverse primert és a *hdc* genomi régiójára specifikus forward primereket alkalmaztunk. A reakciókhoz 100-100 ng genomi DNS templátot használtunk, melyet a GenEluteTM Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma) felhasználásával izoláltunk. Az *hdc*^{B5} *oligo 1* és *hdc*^{B5} *oligo 2* primerpár alkalmazásával egy 701 bp hosszúságú DNS szakaszt sokszoroztunk fel, melyet a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen) és a 3500-Genetic Analyzer (Applied Biosystems) platform felhasználásával szekvenáltunk és elemeztünk. A szekvenáláshoz a *hdc*^{B5} *oligo 3* primert alkalmaztuk. A szekvencia elemzése során kiderült, hogy a *P{LacZ}* elem a transzlációs kezdőponttól upstream irányban 1017 bázis távolságban helyezkedik el.

hdc^{B5} *oligo 1*	5'-CGAGCCGCAACGAAAGTG-3'
hdc^{B5} *oligo 2*	5'-CCACCTTATGTTATTTCATCATG-3'
hdc^{B5} *oligo 3*	5'-TGAAGAAGTGCGGAAAATCGG-3'
hdc-Gal4 oligo 1	5'-TCCCACCACTCGAAGCACTC-3'
hdc-Gal4 oligo 2	5'-GCTATGACCATGATTACGCCAAG-3'

1. táblázat. A P elem beépülések molekuláris térképezéséhez használt primerek listája.

Hasonló startégiát alkalmaztunk a P{GawB} elemek pontos molekuláris pozíciójának a meghatározása során is a három vizsgálni kívánt konvertáns esetében (*hdc*^{19}*-Gal4, hdc*^{31}*-Gal4, hdc*^{55}*-Gal4*). A polimeráz láncreakció során a *hdc-Gal4 oligo 1* és a *hdc-Gal4 oligo 2* primereket alkalmaztuk. A felsokszorozott, 1748 bázispárnyi DNS szakaszt a *hdc-Gal4 oligo 2* primer segítségével szekvenáltuk meg. Kiderült, hogy a P elem mindhárom esetben a transzlációs kezdőponttól upstream irányban, 1025 bázis távolságban helyezkedik el. A térképezéshez használt primerek szekvenciáját az **1. táblázat** tartalmazza.

3.3.12.* w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi *rekombináns előállítása és ellenőrzése:

w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP hímeket *w; UAS-hdcRNSi* nőstényekkel kereszteztünk, majd az első utódnemzedékből *w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP / UAS-hdcRNSi* genotípusú rekombináló szűz nőstényeket gyűjtöttünk, és azokat *w; SM6b/Sco* hímekhez kereszteztük. Az utódok közül azokat a legerősebb szemszínű hímeket kereszteztük tovább *w; SM6b/Sco* szüzekhez, amelyek GFP kifejeződést mutattak. Az első utódnemzedékből *SM6b* balanszer kromoszóma felett vittük tovább a rekombináns kromoszómákat, majd a balanszer elhagyásával homozigóta törzseket hoztunk létre (**18. ábra**). A rekombináció igazolása érdekében a törzseket letalitás tesztnek vetettük alá, melyhez a *hdc*^{8}*–Gal4* recesszív letális allélt hordozó törzset alkalmaztuk:

w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP ♂ **x** ♀ ***w; UAS-hdcRNSi***

w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP / UAS-hdcRNSi ♀ **x** ♂ ***w; SM6b/Sco***

w; SM6b/Sco ♀ **x** ♂ ***w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi / SM6b***

w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi / SM6b ♂ **x** ♀ ***w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi / SM6b***

w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi ♂ **x** ♀ ***w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi***

18. ábra. A *w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi* rekombináns előállítási sémája.

a *w; HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi/+; hdc*^{8}*–Gal4/+* egyedek nem élik túl a báb stádiumot.

3.3.13.* w; Dot-Gal4, UAS-hdcRNSi *és* w; Pcol85-Gal4, UAS-hdcRNSi *rekombinánsok előállítása:

Mivel mind a *Dot-Gal4,* mind pedig a *Pcol85-Gal4* a második kromoszómán található, ezért a két rekombináns létrehozása során ugyan azt a keresztezési sémát és ellenőrző módszereket alkalmaztuk. *UAS-hdcRNSi* szüzek és a megfelelő meghajtóelemet hordozó hímek keresztezéséből származó rekombináló szüzeket *SM6b/Sco* hímekhez kereszteztük. (A két keresztezési séma közötti egyetlen eltérés az első keresztezésből származó utódok válogatásakor jelentkezett: míg a *Dot-Gal4* homozigóta életképes, vagyis az F1 szüzek mindegyike hordozta a meghajtóelemet, addig a *Pcol85-Gal4* letális, *CyO* balanszerrel kombinálva tartható fent, vagyis ezesetben az F1 szüzek fele hordozta a meghajtóelemet, amelynek meglétét a balanszer kromoszóma domináns markerére történő kontraszelekcióval biztosítottuk.) A szülői vonalakénál erősebb szemszínű, feltehetően rekombináns második kromoszómát hordozó hímeket *SM6b/Sco* szüzekkel párkeresztezésbe vittük, majd a jelölt kromoszómát *SM6b* felett törzsbe állítottuk (**19. ábra**). A meghajtóelemek jelenlétét *UAS-*

w; Pcol85Gal4/CyO ♂ **x** ♀ ***w; UAS-hdcRNSi***

w; Pcol85Gal4/ UAS-hdcRNSi ♀ **x** ♂ ***w; SM6b/Sco***

w; SM6b/Sco ♀ **x** ♂ ***w; Pcol85Gal4, UAS-hdcRNSi / SM6b***

w; Pcol85Gal4, UAS-hdcRNSi / SM6b ♂ **x** ♀ ***w; Pcol85Gal4, UAS-hdcRNSi / SM6b***

19. ábra. A *Pcol85Gal4, UAS-hdcRNSi* rekombináns előállítási sémája.

2xEGFP riporterrel ellenőriztük, a csendesítő konstrukciót pedig letalitás teszttel mutattuk ki: az *UAS-hdcRNSi* kombinációja a *hdc*^{19}*-Ga4*-gyel bábletális.

3.3.14. Amorf* hdc *allél létrehozása P elem mozgatáson alapuló mutáns előállítás módszerével:

hdc deficiencia létrehozása érdekében az általunk izolált beépülések közül a *P{GawB}hdc*^{19}*-Gal4* elemet mozgattuk. A *w; P{GawB}hdc*^{19}*-Gal4/TM6D*^{3} szüzek és *w; pbx*^{2}*, Δ2-3, ry*$^{+}$*/TM3, Δ2-3, ry*$^{+}$ hímek keresztezéséből származó, *w; P{GawB}hdc*^{19}*-Gal4/TM3, Δ2-3, ry*$^{+}$ genotípusú jumpstarter hímeket *w; TM6/TM3* szüzekhez kereszteztük. Az utódok közül a TM6 balanszert hordozó, fehér szemű hímeket egy másik, a konverzió során létrehozott letális beépüléshez kereszteztük (*P{GawB}hdc*^{31}*-Gal4/TM3*). A *hdc*^{31}*-Gal4* beépüléssel kombinációban letális, vagy *hdc* fenotípusokat mutató jelöltekből *TM3,Sb,Kr-GFP* balanszer kromoszóma fölött törzseket alapítottunk (**20. ábra**).

***w; pbx*^{2}*, Δ2-3, ry+/TM3, Δ2-3, ry*$^{+}$ ♂ x ♀ *w; P{GawB}hdc*^{19}*-Gal4/TM6D*^{3}**

***w; TM6/TM3* ♀ x ♂ *w; P{GawB}hdc*^{19}*-Gal4/TM3, Δ2-3, ry*$^{+}$**

w; Deficiencia / TM6* ♀ x ♂ *Pbl / TM3,Sb,Kr-GFP

w; Deficiencia / TM3,Sb,Kr-GFP* ♂ x ♀ *w; Deficiencia / TM3,Sb,Kr-GFP

20. ábra. A *hdc* deficiencia előállítási sémája.

3.3.15. A deficienciák molekuláris térképezése polimeráz láncreakcióval:

A deficienciák töréspontjainak pontos feltérképezése érdekében polimeráz lancreakción alapuló szűrővizsgálatot végeztünk. Az első szűrést a P elem beépülés és a transzlációs kezdőpont ATG közé tervezett *szűrés oligo 1* és az első exont kódoló régióra specifikus *szűrés*

oligo 2 primerekkel végeztük. Mivel amorf allélt kívántunk létrehozni, amelyben a deficiencia érinti a *hdc* gén fehérje kódoló régióját is, ezért azt a jelöltet vizsgáltuk tovább, amelyből az első szűrés során nem lehetett felsokszorozni a kiválasztott, 823 bp hosszúságú DNS szakaszt. A deficiencia töréspontjait végül a következő primerek felhasználásával azonosítottuk: az upstream töréspontot az *töréspont oligo 1* és *töréspont oligo 2* primerekkel, a downstream töréspontot pedig a *töréspont oligo 3* és *töréspont oligo 4* primerekkel. A deficienciák molekuláris jellemzéséhez használt primerek szekvenciáit a **2. táblázat** tartalmazza.

szűrés oligo 1	5'-ACCAATCTCGGTTAGAAACCCACT-3'
szűrés oligo 2	5'-TCCCACCACTCGAAGCACTC-3'
töréspont oligo 1	5'-ACCAAATTCTGGCCTACAGTGG-3'
töréspont oligo 2	5'-CCACCTTATGTTATTTCATCATG-3'
töréspont oligo 3	5'-TGGCATCATTGAAACAGCAAGG-3'
töréspont oligo 4	5'-GGATATCTCGCCACTGGACTG-3'

2. táblázat. A *hdc* deficienciák molekuláris jellemzéséhez használt primerek listája.

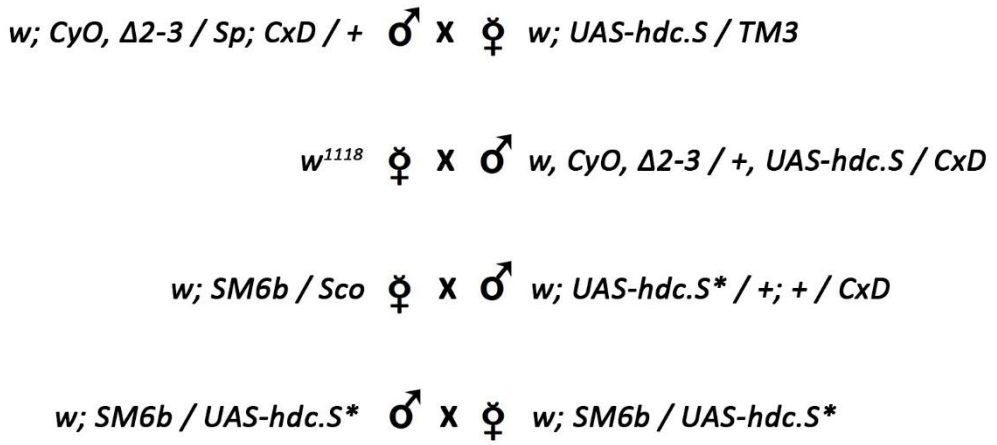
3.3.16. Szűrővizsgálat a* hdc *genetikai együttműködő partnereinek azonosítására:

A *hdc* lehetséges PSC-beli együttműködő partnereinek azonosítása érdekében PSC-specifikus *hdc* csendesítéssel párhuzamosan olyan jelátviteli utak elemeit termeltettük túl, vagy csendesítettük, amelyekről korábban már ismert volt, hogy szerepük van a lamellocita képződés

szabályozásában. *Pcol85Gal4, UAS-hdcRNAi/CyO, GFP* szüzeket kereszteztünk a jelölt faktorokat túltermelő, vagy csendesítő transzgenikus konstrukciókat hordozó hímekkel. Az F1 vándorló lárvák keringő hemocitáit indirect immunfluoreszcencia módszerrel vizsgáltuk. A lamellociták arányát az L1 marker festődése alapján az ImageJ szoftver segítségével állapítottuk meg. A szignifikancia meghatározására kétmintás Student's t-próbát alkalmaztunk.

3.3.17. Második kromoszómás* UAS-hdc.S *beépülés létrehozása:

A *hdc* mutációjának szövetspecifikus menekítéséhez második kromoszómás *P{UAS-hdc.S}* beépülést kívántunk létrehozni. *w; CyO, Δ2-3/Sp; CxD/+* hímek és *w; UAS-hdc.S/TM3* szüzek keresztezéséből származó, *w, CyO, Δ2-3/+, UAS-hdc.S/CxD* genotípusú jumpstarter hímeket w^{1118} szüzekhez kereszteztük. A P elem w^{mini} markerét és a *CxD* balanszert egyaránt hordozó, azonban a *CyO, Δ2-3* kromoszómát nem hordozó, jelölt hímeket *w; SM6b/Sco* szüzekkel párkeresztezésbe vittük. Annak érdekében, hogy az új beépülést kromoszómára térképezzük, az utódok közül a w^{mini} markert és *SM6b* balanszert hordozó hímeket w^{1118} szüzekkel kereszteztük. A nemtől független öröklődést mutató, *SM6b*-től szegregáló beépüléseket második kromoszómásnak tekintettük és *SM6b* fölött törzsbe állítottuk (**21. ábra**).



21. ábra. Második stádiumú *UAS-hdc.S* beépülés előállítási sémája.

3.3.18. Amorf hdc *mutáns lárva szövetspecifikus menekítése:*

Az amorf *hdc*^{43} allél lamellocita képződési fenotípusának PSC-specifikus menekítése érdekében egy két irányból induló, többlépéses keresztezési sémát hajtottunk végre: az *UAS-hdc.S* szüzek és *If/CyO;TM6,Tb/MKRS* hímek keresztezéséből származó *UAS-hdc.S/CyO;+/TM6,Tb* szüzekhez a *hdc*^{43}*/TM3* szüzek és *CyO,GFP/Sp;TM3/CxD* hímek keresztezéséből származó *+/CyO,GFP;hdc*^{43}*/CxD* hímeket kereszteztünk. Az *UAS-hdc.S/CyO,GFP;hdc*^{43}*/TM6,Tb* genotípusú utódokból törzset alapítottunk (**22. ábra**).

w; +; UAS-hdc.S ♀ x ♂ w; If / CyO; TM6,Tb / MKRS

hdc^{43} / TM3 ♀ x ♂ CyO, GFP / Sp; TM3 / CxD

w; UAS-hdc.S / CyO; + / TM6,Tb ♀ x ♂ w; + / CyO, GFP; hdc^{43} / CxD

w; UAS-hdc.S / CyO, GFP; hdc^{43} / TM6,Tb ♂ x ♀ w; UAS-hdc.S / CyO, GFP; hdc^{43} / TM6,Tb

w; UAS-hdc.S; hdc^{43} / TM6,Tb ♂ x ♀ w; UAS-hdc.S; hdc^{43} / TM6,Tb

22. ábra. Az *UAS-hdc.S; hdc*^{43} */ TM6,Tb* genotípus kombináció előállítási sémája.

A másik irányból a *Pcol85-Gal4/CyO,GFP* szüzek és *If/CyO;TM6,Tb/MKRS* hímek keresztezéséből származó *Pcol85-Gal4/CyO;+/TM6,Tb* szüzeket *+/CyO,GFP;hdc*^{43}*/CxD* hímekhez kereszteztük, és a *Pcol85-Gal4/CyO,GFP;hdc*^{43}*/TM6,Tb* genotípusú utódokból törzset alapítottunk (**23. ábra**).

w; Pcol85-Gal4 / CyO, GFP ♂ x ♀ If / CyO; TM6,Tb / MKRS

w; Pcol85-Gal4 / CyO; + / TM6,Tb ♀ x ♂ w; + / CyO, GFP; hdc^{43} / CxD

w; Pcol85-Gal4 / CyO, GFP; hdc^{43} / TM6,Tb ♀ x ♂ w; Pcol85-Gal4 / CyO, GFP; hdc^{43} / TM6,Tb

23. ábra. A *Pcol85Gal4 / CyO, GFP; hdc*^{43} */ TM6, Tb* genotípus kombináció előállítási sémája.

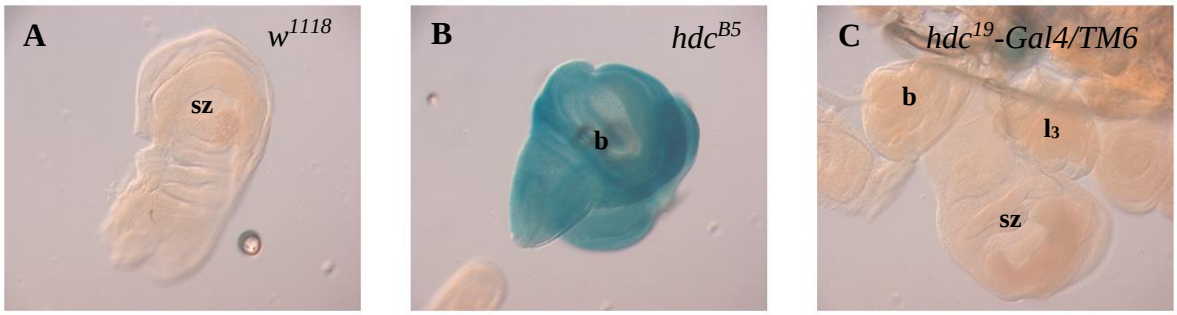
Végül *UAS-hdc.S;hdc*^{43}*/TM6,Tb* szüzek és *Pcol85-Gal4/CyO,GFP;hdc*^{43}*/TM6,Tb* hímek keresztezésével hoztuk létre a vizsgálni kívánt *Pcol85-Gal4/UAS-hdc.S;hdc*^{43}*/hdc*^{43}

genotípusú lárvákat. Kontrollként *w; hdc*^{43} */ TM6b, Tb* szüzek és *Pcol85-Gal4 / CyO, GFP; hdc*^{43} */ TM6, Tb* hímek keresztezéséből származó *Pcol85-Gal4 / +; hdc*^{43} */ hdc*^{43} genotípusú lárvákat alkalmaztuk.

4. Eredmények

4.1 *hdc-Gal4* genetikai meghajtóelem létrehozása P elem konverzióval

A *hdc* kifejeződésének *in vivo* követése érdekében P elem konverzió módszerével a hdc^{B5} allélban található *P{LacZ}* enhanszer csapdázó elemet (Weaver és White, 1995) kicseréltük egy szintén enhanszer csapdázó *P{GawB}* elemre, ezáltal *hdc-Gal4* genetikai meghajtóelemet hoztunk létre, melyben a Gal4 transzkripciós aktivátor termelődését a *hdc* kifejeződéséért felelős genetikai szabályozó elemek biztosítják. A konverziót Sepp és Auldt (1999) alapján a két P elem együttes mozgatása révén értük el (részletesen lásd az Anyagok és módszerek fejezetben). *A P{LacZ}* elem elvesztését X-gal festéstődés elvesztésével igazoltuk (**24.ábra**).



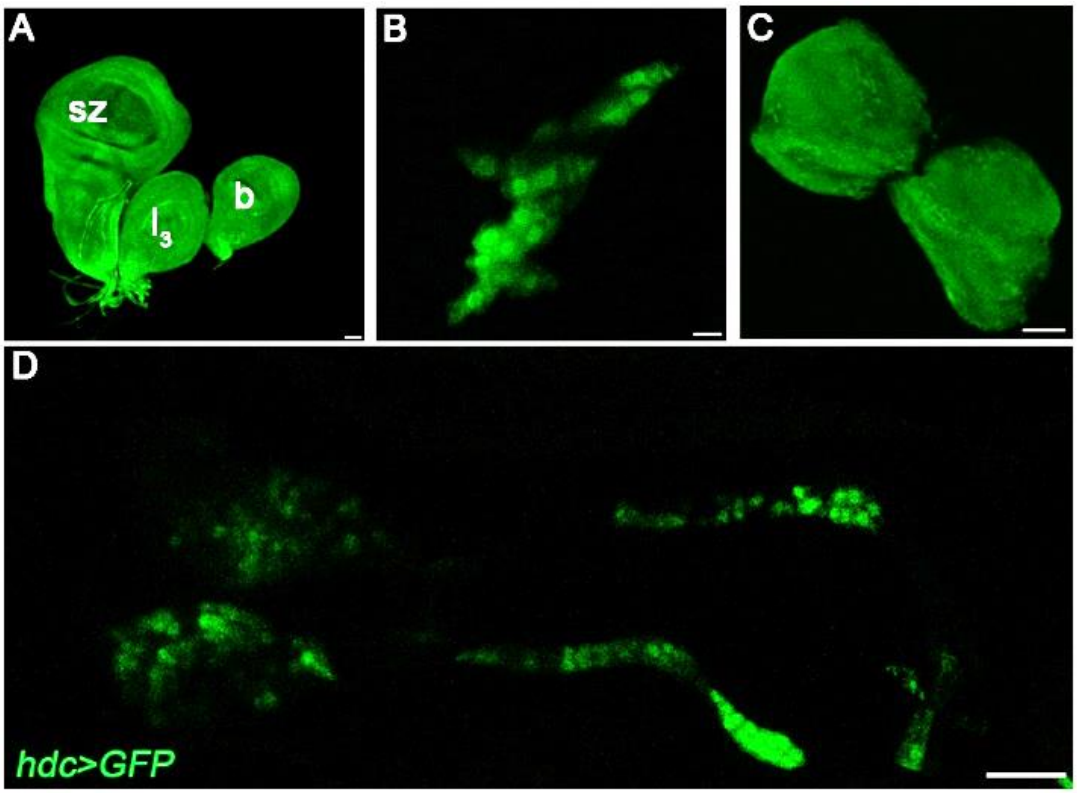
24. ábra. A *P{LacZ}* elem remobilizálásának ellenőrzése x-gal festéssel. A **A)** negatív kontroll és a **C)** hdc^{19}*-Gal4/TM6* lárvák imágókorongjaiban nem fejeződik ki a LacZ, ezért nem jelölődnek az X-gallal, míg a pozitív kontroll **B)** hdc^{B5} imágókorongjai igen. sz – szárny lemez, b – billér lemez, l_3 – metatorakális láb lemez.

A létrehozott - a *hdc*-nek megfelelő kifejeződési mintázatot mutató - beépülések hdc^{B5}-tel alkotott interallélikus kombinációi esetében megfigyeltük a hipomorf *hdc* allélokra jellemző

fentotípusokat (Weaver és White, 1995): elégtelen háti záródást, csökevényes szkutellumot, valamint a humerális és szkutelláris szőrzet növekedési hibáit (**25. ábra**).

25. ábra. A *hdc*^{B5}/*hdc*^{12}-*Gal4* egyedek *hdc* fenotípusai. **A)** A humerális szőrzet hiánya, **B)** a szkutellum fejlődési hibája és **C)** tor záródási rendellenesség.

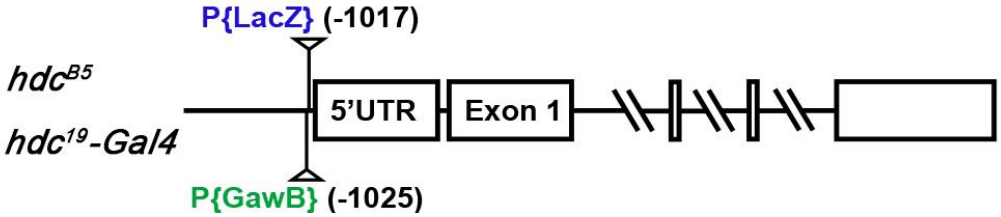
A beépüléseket UAS-GFP riporterhez kereszteztük és további vizsgálatokra azt a három vonalat választottuk ki, amelyek esetében a legerősebb GFP expressziót tapasztaltuk (*hdc*^{19}-*Gal4*, *hdc*^{31}-*Gal4* és *hdc*^{55}-*Gal4*). Az egyes keresztezésekből származó utódokban a GFP kifejeződési mintázatában nem figyeltünk meg különbségeket. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a konverzió sikeres volt, a kiválasztott konvertáns vonalak működése hűen követi a *hdc* kifejeződési mintázatát: a meghajtóelem kifejeződik az imágó korongokban, az ivarlemezben és az abdominális hisztoblasztokban egyaránt (**26. ábra A-C**). A *hdc* aktivitását az imaginális szövetek mellett a központi nyirokszervben is megfigyeltük (**26. ábra D**), azonban a *hdc*^{B5}-höz hasonlóan a keringő és szesszilis hemocitákban nem tapasztaltunk GFP kifejeződést.



26. ábra. A *hdc* kifejeződési mintázata. A *hdc>GFP* kifejeződik **A)** az imágókorongokban (sz - szárny, l_3 - metatorakális láb, b - billér), **B)** az abdominális hisztoblasztokban, **C)** az ivarlemezben és **D)** a központi nyirokszervben is. Méretarány: 25 µm.

4.2 A P elem beépülések molekuláris térképezése

Szekvenálással azonosítottuk a *hdc*^{B5}, *hdc*^{19}*-Gal4/TM6*, *hdc*^{31}*-Gal4/TM3* és *hdc*^{55}*-Gal4/TM3* vonalakban a P elem beépülés pontos genomi helyét. A *hdc*^{B5} vonalban a *P{LacZ}* elem a transzláció kezdőpontjától 5' irányban 1017 bázispár távolságban helyezkedik el, míg a *P{GawB}* elem mindhárom vizsgált vonalban a transzláció kezdőpontjától 5' irányban 1025 bázispár távolságban található (**27. ábra**). Tehát megállapíthatjuk, hogy a P elemek kicserélődése majdnem tökéletes pontossággal történt meg.



27. ábra. A P elem beépülések molekuláris térképe. A *hdc*^{B5} allél esetén a *P{LacZ}* elem a transzláció kezdőpontjától 5' irányban 1017 bázispár távolságra helyezkedik el, míg a *hdc*^{19}*-Gal4* allél *P{GawB}* eleme ugyanebben az irányban a start kodontól 1025 bázispárra található.

4.3 A *hdc-Gal4* beépülések genetikai jellemzése

Amíg a *hdc*^{B5} allél homozigóta életképes (Weaver és White, 1995), addig a *hdc-Gal4* beépülések az erős hipomorf *hdc* allélokra jellemzően báb stádiumban letalitást okoztak mind homozigóta állapotban, mind pedig egymással, illetve a *hdc*^{43}, korábban azonosított deléciós alléllal (Weaver és White, 1995) alkotott interallélikus kombinációban (**3. táblázat**). Ez a letalitás a faktor túltermelésével menekíthető: a *hdc-Gal4*/*hdc-Gal4 UAS-hdc.S* genotípusú egyedek életképesek, ami arra utal, hogy a letalitást nem egy másodlagos mutáció okozza. Amikor a meghajtóelemmel *hdc* RNS interferencia konstrukciót működtettünk (*UAS-hdcRNSi/+; hdc-Gal4/+*), ugyancsak letalitást tapasztaltunk báb stádiumban.

	hdc^{B5}	*hdc*^{19}*-Gal4*	*hdc*^{31}*-Gal4*	*hdc*^{55}*-Gal4*	*hdc*^{43}	*hdc-Gal4, UAS-hdc*	*UAS-hdcRNSi*
hdc^{B5}	életképes	életképes	életképes	életképes	n.a.	n.a.	n.a.
hdc^{19}*-Gal4*	életképes	letális	letális	letális	letális	életképes	letális
hdc^{31}*-Gal4*	életképes	letális	letális	letális	n.a.	életképes	n.a.
hdc^{55}*-Gal4*	életképes	letális	letális	letális	n.a.	életképes	n.a.
hdc^{43}	n.a.	letális	n.a.	n.a.	letális	n.a.	n.a.

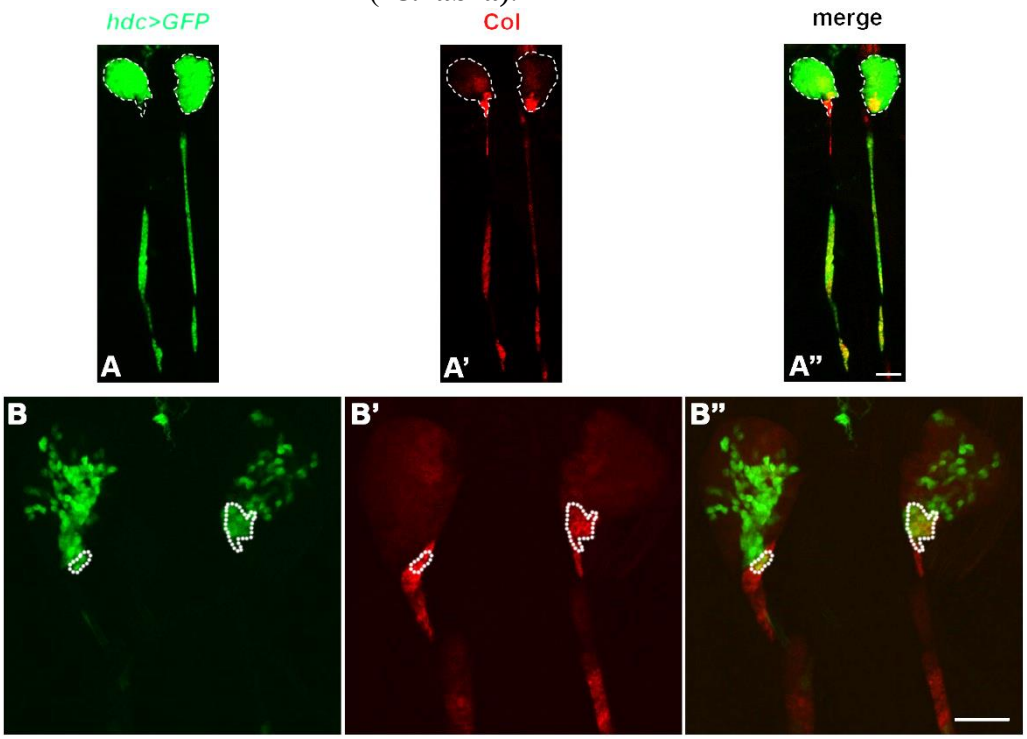
3. táblázat. A különböző *hdc* allélok interallélikus kombinációinak, illetve a *hdc* túltermelésének és csendesítésének hatása az életképességre. n.a. – nincs adat.

Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy a *hdc-Gal4* beépülések erős hipomorf *hdc* allélként viselkednek. További vizsgálatainkat a *hdc*^{19}*-Gal4* meghajtóelemmel végeztük.

4.4. A *hdc* kifejeződésének követése a központi nyirokszervben a lárva egyedfejlődése során:

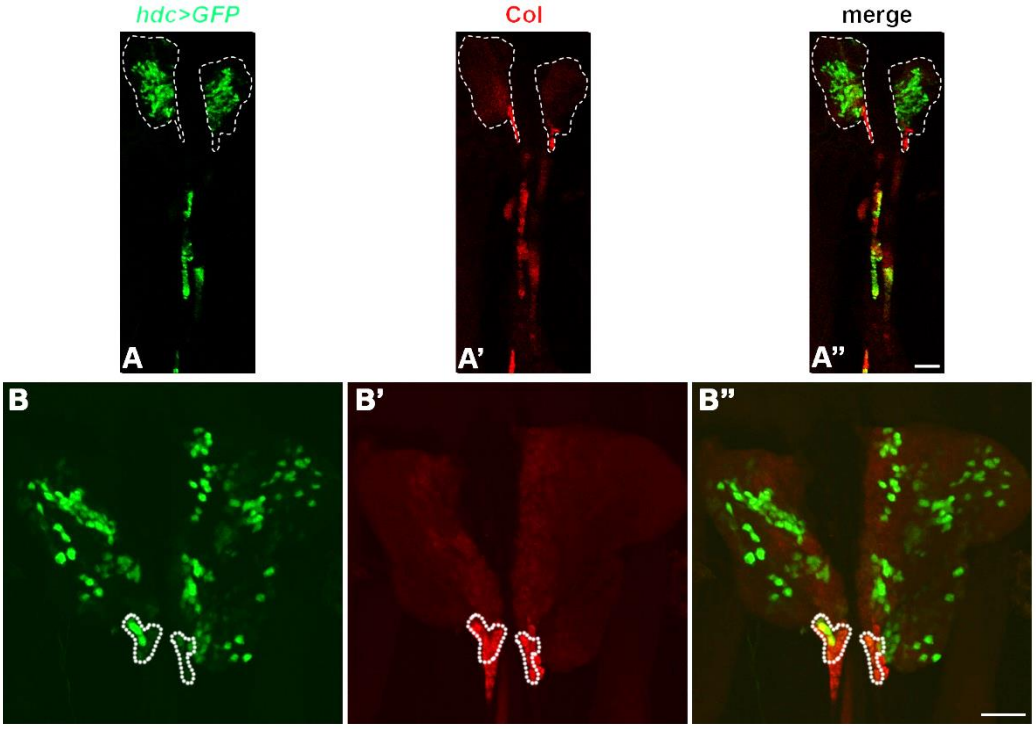
A szakirodalmi adatok és saját korábbi eredményeink szerint a *hdc* kifejeződik a lárva központi nyirokszervében, azonban immunindukció hatására a nyirokszervből a keringésbe jutó és differenciálódó hemocitákban a gén aktivitása lecseng (Weaver és White, 1995; Márkus és mtsai., 2009). Arról azonban nem volt ismeretünk, hogy a központi nyirokszerv fejlődése során hogyan változik a gén kifejeződési mintázata. Ennek vizsgálatára *UAS-GFP* riporter konstrukció alkalmazásával követtük a *hdc*^{19}*-Gal4* meghajtóelem aktivitásának változását a központi nyirokszervben a lárva egyedfejlődése során.

Megfigyeltük, hogy a második lárva stádiumban a *hdc* kifejeződik a központi nyirokszerv kérgi zónájában és velőállományában elhelyezkedő sejtek nagyrészében, továbbá jelentős átfedést tapasztaltunk a *hdc*^{19}*>GFP* és a PSC-t, valamint a másodlagos lebenyeket jelölő αCol festés mintázatai között (**28. ábra**).



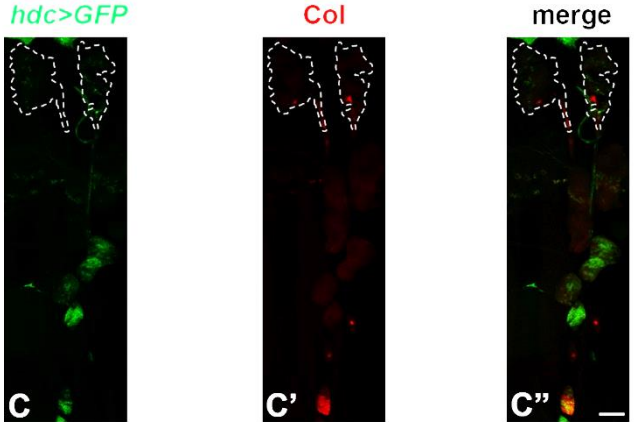
28. ábra. A *hdc*^{19}*>GFP* kifejeződési mintázata a második stádiumos lárva központi nyirokszervében. **A-A'')** A *hdc* kifejeződik az elsődleges lebeny nagy részében és a másodlagos lebenyekben is. A szaggatott vonal az elsődleges lebenyt jelzi. **B-B'')** A *hdc*^{19}*>GFP* és a PSC-t kijelölő anti-Col festés (piros) mintázata egymással átfed. A szaggatott vonal a kettős pozitív PSC-sejteket jelzi. Méretarány: 25 µm.

A harmadik stádiumú lárva központi nyirokszervének elsődleges lebenyében a *hdc* mintázatának kiterjedése jelentősen csökkent, azonban a PSC-ben és a másodlagos lebenyekben továbbra is megmaradt (**29. ábra**).



29. ábra. A *hdc*^{19}*>GFP* kifejeződési mintázata a harmadik stádiumos lárva központi nyirokszervében. **A-A")** A *hdc*^{19}*>GFP* mintázata az elsődleges lebenyben fokozatosan csökken, azonban **B-B")** a PSC-ben továbbra is jelentős átfedést mutat a PSC-t kijelölő anti-Col festéssel (piros). A szaggatott vonal az A-A") elsődleges lebenyt, illetve a B-B") kettős pozitív sejteket jelöli. Méretarány: 25 µm.

A vándorló lárva stádiumra a *hdc* mintázata az elsődleges lebenyben tovább zsugorodott, a PSC-ből teljesen visszahúzódott, a másodlagos lebenyekben viszont ebben a stádiumban is fennmaradt (**30. ábra**).



30. ábra. A *hdc*^{19}*>GFP* kifejeződési mintázata a vándorló lárva központi nyirokszervében. A *hdc*^{19}*>GFP* mintázata az elsődleges lebenyben tovább csökken, a másodlagos lebenyekben azonban megmarad. A szaggatott vonal az elsődleges lebenyt jelöli. Méretarány: 25 µm.

A gén kifejeződési mintázata tehát a központi nyirokszerv fejlődése során fokozatosan csökken, ami arra utal, hogy a *hdc* kapcsolatban állhat a központi nyirokszerv és a benne képződő hemociták fejlődésével.

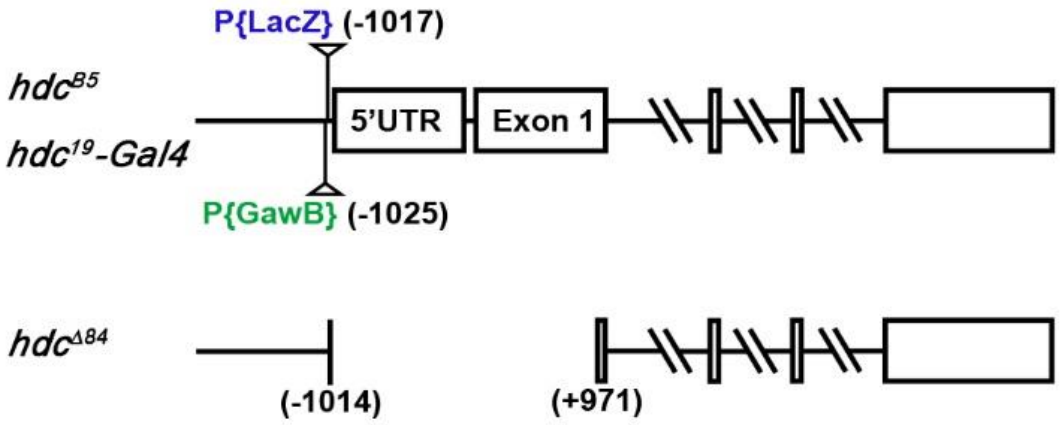
4.5. A *hdc* allélok vérsejtdifferenciálódásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a *hdc*-nek van -e hatása a vérsejtek érésére, megvizsgáltuk a homozigóta hdc19-Gal4 lárvák keringő hemocitáit. Megfigyeltük, hogy a keringő sejtek nagy többsége kifejezte a P1 plazmatocita specifikus immunológiai markert, ugyanakkor a naiv lárvákban, immunindukció hiányában L1 markert kifejező lamelociták jelentek meg 19%-os penetranciával, melyek a keringő sejtek 2,6%-át tették ki (**32. ábra A**).

Mivel a korábbi vizsgálataink alapján a hdc19-Gal4 hipomorf allélnak tekinthető, a homozigóta lárvák keringésében spontán megjelenő lamellociták arra utalnak, hogy a hdc részt vehet ezen sejtek képződésének szabályozásában.

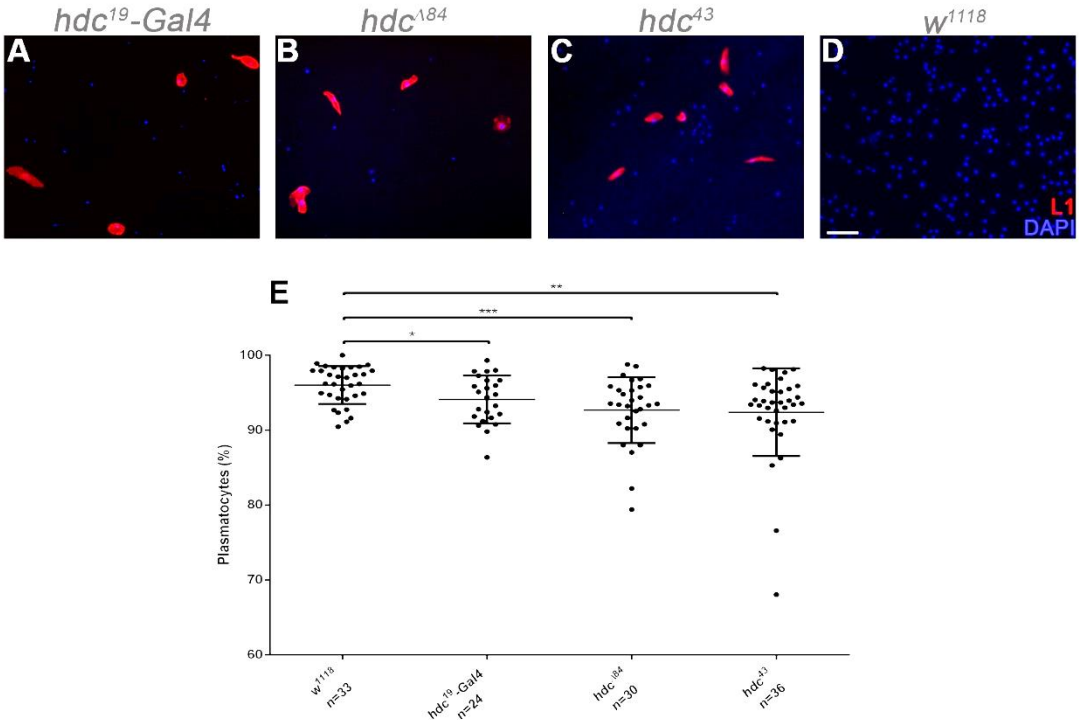
A megfigyelt vérsejtképződési fenotípust klasszikus *hdc* allélok vizsgálatával kívántuk megerősíteni. Mivel a törzsközpontokban nem állt rendelkezésre molekulárisan jellemzett allél, ezért a hdc^{19}-*Gal4* beépülés felhasználásával P elem mozgatáson alapuló mutáns előállítás módszerével deléciós vonalakat hoztunk létre. A mintegy 40 deléció közül tizenhármat minősítettünk letális allélnak, melyek közül polimeráz láncreakcióval szűrtük ki a feltehetően amorf allélokat. Ehhez a *P{GawB}* elem eredeti pozíciója és a transzlációs kezdőpont közé tervezett forward primerrel és az első exont kódoló szakaszra tervezett reverse primerrel végeztük el a polimeráz láncreakciót. A vizsgálat során a $hdc^{\Delta 84}$ deléció esetén nem keletkezett PCR termék. Ez az eredmény arra utalt, hogy a deléció ebben az esetben érintheti az ATG transzlációs startkodont, vagyis potenciálisan amorf mutációt okozhat. Ezt követően további polimeráz láncreakciós vizsgálatokkal feltérképeztük a deléció töréspontjait és szekvenálással megállapítottuk azok pontos molekuláris helyét: a kitörölt szakasz a transzláció

kezdőpontjától 5' irányban 1014 bázist, 3' irányban 971 bázist érintett, vagyis a gén 5' nem transzlálódó régiója és az első exont kódoló szakasz jelentős része hiányzik (**31. ábra**). Ezek alapján a *hdc*$^{\Delta 84}$ amorf allélnak tekinthető.



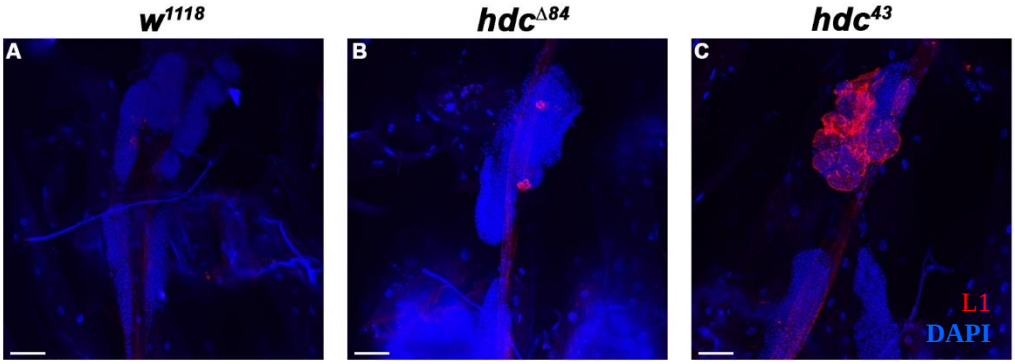
31. ábra. A *hdc*$^{\Delta 84}$ deficiencia molekuláris térképe. A deléció töréspontjai a transzláció kezdőpontjától 5' irányban 1014, 3' irányban pedig 971 bázispárra találhatók.

Megvizsgáltuk az újonnan létrehozott *hdc* $^{\Delta 84}$ allél, és a szakirodalomból ismert, de molekulárisan nem jellemzett *hdc*^{43} allél (Weaver és White, 1995) vérsejtképződésre gyakorolt hatását. Mindkét mutáció esetében a homozigóta lárvákban spontán lamellocita képződést tapasztaltunk: a *hdc*$^{\Delta 84}$ a vizsgált lárvák 83%-ában vezetett a tokképző sejtek kialakulásához, a lamellociták átlagos aránya a keringésben 2,15% volt (ábra); a *hdc*^{43} mutáns lárvák mindegyikében megjelenő lamellociták átlagosan a keringő sejtek 6%-át tették ki (**32. ábra B és C**). A lamellociták megjelenésével párhuzamosan a keringő plazmatociták aránya jelentősen csökkent a mutáns lárvákban (**32. ábra E**).



32. ábra. A *hdc* allélok vérsejt-differenciálódási fenotípusa. **A-C)** A *hdc* funkcióvesztése esetén a lárvák keringésében spontán lamellociták jelentek meg, amit **D)** a w^{1118} kontroll lárvákban nem tapasztaltunk. Lamellocita – L1 (piros), sejtmag – DAPI (kék). Méretarány: 20 µm. **E)** A lamellociták megjelenésével párhuzamosan csökkent a plazmatociták aránya a keringésben. ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$. A szignifikancia értékeket párosítatlan Student's t-teszttel állapítottuk meg.

A spontán lamellocita differenciálódást nem csak a keringésben, hanem a központi nyirokszervben is megfigyeltük (**33. ábra**).



33. ábra. A *hdc* allélok vérsejt-differenciálódási fenotípusa. **B és C)** Az amorf *hdc* mutáns lárvák központi nyirokszervében spontán lamellociták jelentek meg, amit **A)** a w^{1118} kontroll lárvákban nem tapasztaltunk. Lamellocita – L1 (piros), sejtmag – DAPI (kék). Méretarány: 50 µm.

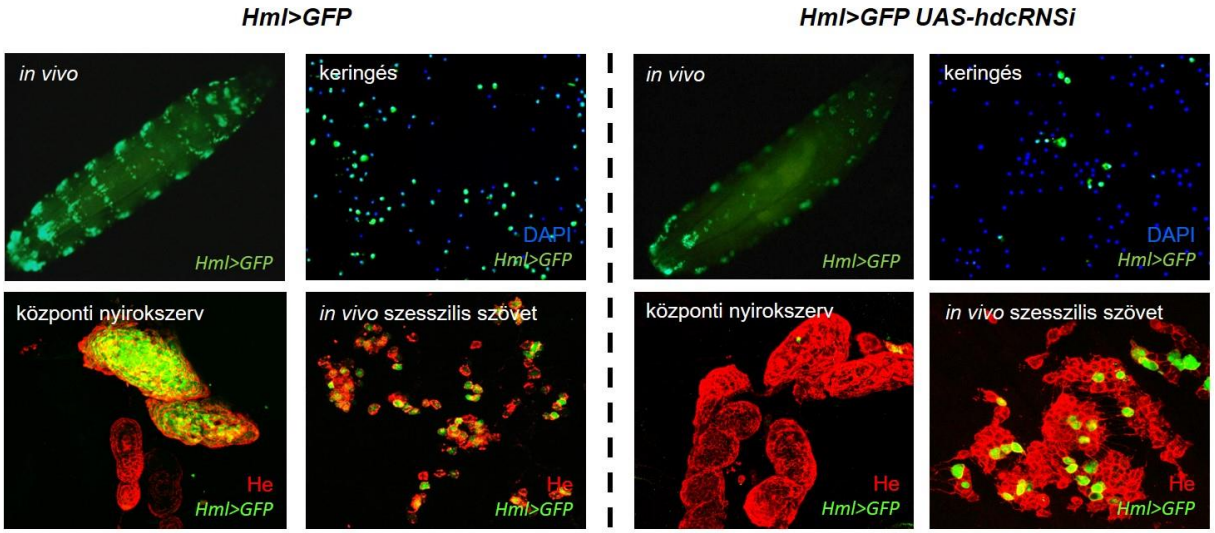
A mutánsokon végzett vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a *hdc* részt vesz az ecetmuslica lárva vérsejtképződésének szabályozásában. Mivel a gén funkcióvesztéses alléljai spontán lamellocita képződést okoznak, ebből arra következtethetünk, hogy a *hdc* a tokképzősejtek differenciálódásának gátlásában játszik szerepet.

4.6. A *hdc* mutáció fókuszának felderítése

Eddigi vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a *hdc* gén aktív a központi nyirokszerv elsődleges lebenyének mindhárom funkcionális zónájában, valamint a másodlagos lebenyekben, azonban sem a keringő hemocitákban, sem pedig a szesszilis vérsejtekben nem tapasztaltuk a faktor kifejeződését. Megállapítottuk továbbá, hogy a *hdc* hatással van a lamellociták differenciálódására, hiszen funkcióvesztéses mutációja spontán lamellocita képződéshez vezet.

Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a központi nyirokszerv melyik területén van szükség a gén megfelelő működésére a tokképző sejtek kialakulásának gátlásához. Ennek a kérdésnek a megválaszolása érdekében az RNS-interferencián alapuló géncsendesítés módszerét alkalmaztuk. A vizsgálathoz olyan genetikai meghajtóelemeket választottunk, amelyek a központi nyirokszerv eltérő területein fejeződnek ki, tehát különböző mintázatban hozzák működésbe a *hdc* csendesítésére alkalmas *UAS-hdcRNSi* konstrukciót.

Az első lépésben a *HmlΔ-Gal4* meghajtóelemet alkalmaztuk, amely a vérsejtképző kompartmentumokban általánosan kifejeződik: biztosítja a Gal4 termelődését a keringés és a szesszilis vérsejtképző szövet plazmatocitáiban, valamint a központi nyirokszerv elsődleges lebenyének kérgi zónájában. A *HmlΔ-Gal4* vezérelte *hdc* csendesítés nem eredményezett spontán lamellocita képződést, a *HmlΔ-Gal4, UAS-GFP, UAS-hdcRNSi* genotípusú vándorló lárvák keringésében nem figyeltünk meg L1 pozitív sejteket. Ellenben azt tapasztaltuk, hogy a *HmlΔ-Gal4, UAS-GFP* kontroll lárvákhoz képest a csendesített lárvák mindhárom vérsejtképző kompartmentumában nagymértékben csökkent az *UAS-GFP* riportert kifejező sejtek száma (**34. ábra**).



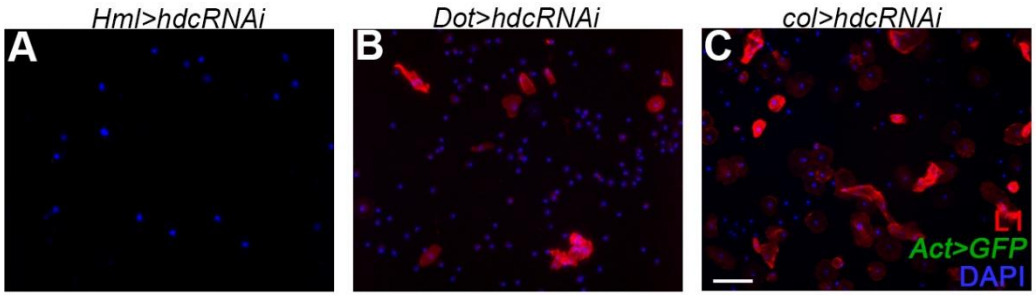
34. ábra. A *Hml-Gal4* meghajtóelemmel történő *hdc* csendesítés hatása. A kontroll *Hml-Gal4, UAS-GFP* (*Hml>GFP,* bal oldal) lárvákhoz képest a *Hml>GFP, UAS-hdcRNSi* (jobb oldal) lárvák mindhárom vérsejtképző kompartmentumában csökken a plazmatocita markert (*Hml>GFP*, zöld) kifejező sejtek száma. A vérsejtek jelölésére az anti-Hemese pánhemocita markert (piros) használtuk, a sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük.

Mivel a *HmlΔ-Gal4* az érett plazmatocitákban fejeződik ki, a GFP mintázat szűkülése azt sugallta, hogy a csendesítés hatására megváltozhat a plazmatociták érési állapota. Mivel azonban $hdc^{\Delta 84}$ háttéren nem tapasztaltunk jelentős csökkenést a *Hml>GFP* mintázatban, arra a következtetésre jutottunk, hogy a csendesítés esetén valószínűleg a *hdcRNSi* eddig ismeretlen off-target hatása okozhatta a *HmlΔ-Gal4* kifejeződési mintázatának szűkülését.

Mindazonáltal a csendesítés nem okozott lamellocita képződést (**35. ábra A**), ezért megállapíthatjuk, hogy a *hdc* mutáció fókusza kívül esik a *HmlΔ-Gal4* meghajtóelem aktivitási mintázatán.

Ezek után olyan meghajtóelemeket alkalmaztunk a gén csendesítésére, amelyek specifikusan a központi nyirokszervben biztosították az RNS-interferencia konstrukció működését, ráadásul kifejeződési mintázatuk csak részben, vagy egyáltalán nem fedett át a *HmlΔ-Gal4*-ével: a *Dot-Gal4* az elsődleges lebeny kérgi zónájában és a poszterior szignalizációs központban, valamint a másodlagos lebenyekben aktív, míg a *Pcol85-Gal4* csak a poszterior szignalizációs központban és a másodlagos lebenyekben fejeződik ki. Mindkét

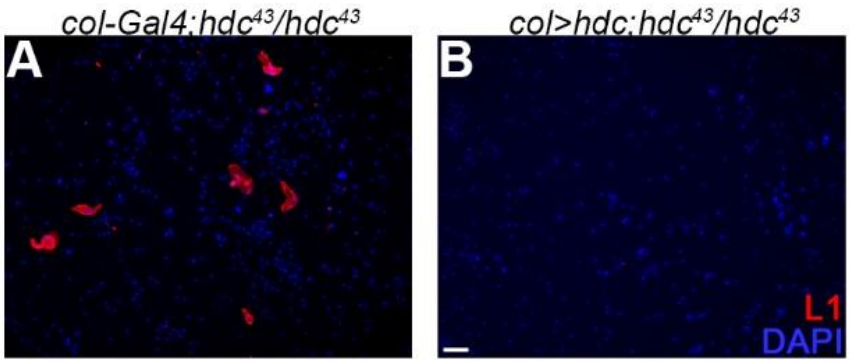
meghatóelem esetében a csendesítés hatására spontán lamellocita képződést figyeltünk meg (**35. ábra B és C**).



35. ábra. A *hdc* mutáció fókuszának felderítése. **A)** A *Hml-Gal4* meghajtóelemmel történő *hdc* csendesítés nem okozott lamellocita differenciálódást, azonban mind **B)** a *Dot-Gal4,* mind pedig **C)** a *Pcol85Gal4* alkalmazása esetén spontán lamellocita képződést tapasztaltunk. Lamellocita – L1 (piros), sejtmag – DAPI (kék). Méretarány: 20 µm.

Ebből arra következtettünk, hogy a *hdc* mutáció fókusza a két meghajtóelem kifejeződési mintázatának átfedő részében található, tehát a poszterior szignalizációs központban, illetve a másodlagos lebenyekben.

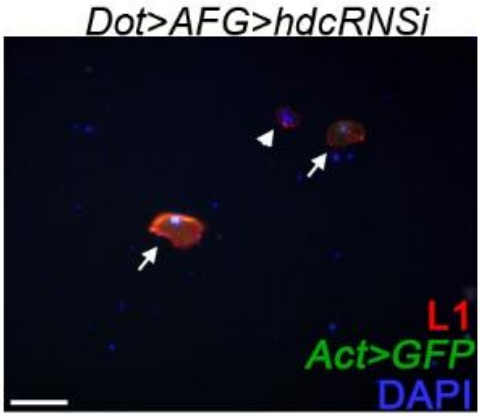
Következtetéseinket megerősítette a *hdc* mutáns fenotípusának menekítése. A menekítéshez a *Pcol85-Gal4* meghajtóelemmel termeltettük túl a *hdc*-t a központi nyirokszervben: a *Pcol85-Gal4/UAS-hdc.S; hdc43/hdc43* genotípusú lárvák keringésében jelentősen csökkent az L1 markert kifejező sejtek aránya (0,25%, n=12) a *Pcol85-Gal4/+; hdc43/hdc43* genotípusú kontroll lárvákhoz képest (2,85%, n=12) (**36. ábra**).



36. ábra. A *hdc* mutáció lamellocita fenotípusának menekítése a faktor PSC-specifikus túltermelésével. A) A kontrollhoz képest B) a *hdc* túltermelése hatékonyan menekítette a mutáns fenotípust. Lamellocita – L1 (piros), sejtmag – DAPI (kék). Méretarány: 20 µm.

4.7. A *hdc* csendesítése a *Dot* vonalban

Mivel eredményeink arra utaltak, hogy a *hdc* a PSC sejtjein keresztül nem-sejtautonóm hatás révén szabályozza a központi nyirokszerv hemocitáinak fejlődését, ezért a *Dot-Gal4* által kijelölt vérsejtleszármazási vonalban - mely a központi nyirokszerv mindhárom funkcionális régiójából származó sejteket magába foglal – csendesítettük a gén kifejeződését és az L1 marker mintázatán keresztül vizsgáltuk a képződő lamellociták eredetét. Megfigyeléseink alapján a *y, w, UAS-Flp; Dot-Gal4, AFG/UAS-hdcRNSi* genotípusú lárvák keringésében megjelenő lamellociták 32%-a származott a *Dot-Gal4* leszármazási vonalból, tehát a *hdc* csendesítése nagyobbrészt a vizsgált sejtleszármazási vonalon kívül – nem sejtautonóm módon - idézett elő lamellocita képződést (**37. ábra**).

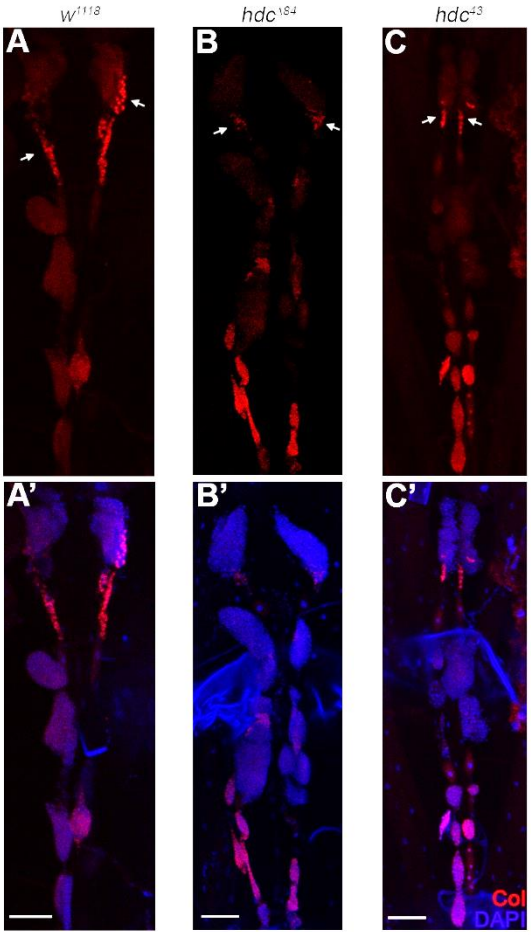


37. ábra. A *hdc* csendesítése a központi nyirokszerv eredetű *Dot* leszármazási vonalban. A csendesítés hatására a *Dot*-vonalból (nyíl) és attól függetlenül (nyílhegy) is keletkeztek lamellociták. Lamellocita – L1 (piros), sejtmag – DAPI (kék). Méretarány: 20 µm.

4.8. A Col kifejeződési mintázatának vizsgálata a *hdc* mutáns lárvák központi nyirokszervében

Korábban kimutatták, hogy a vérsejt homeosztázis fenntartásához elengedetlenül szükséges a vérsejtképző niche méretének pontos szabályozása (Pennetier és mtsai, 2012), ezért megvizsgáltuk, hogy a *hdc* mutációja, illetve csendesítése hatással van -e a PSC sejtjeit kijelölő Col kifejeződésére és a PSC méretére a központi nyirokszervben.

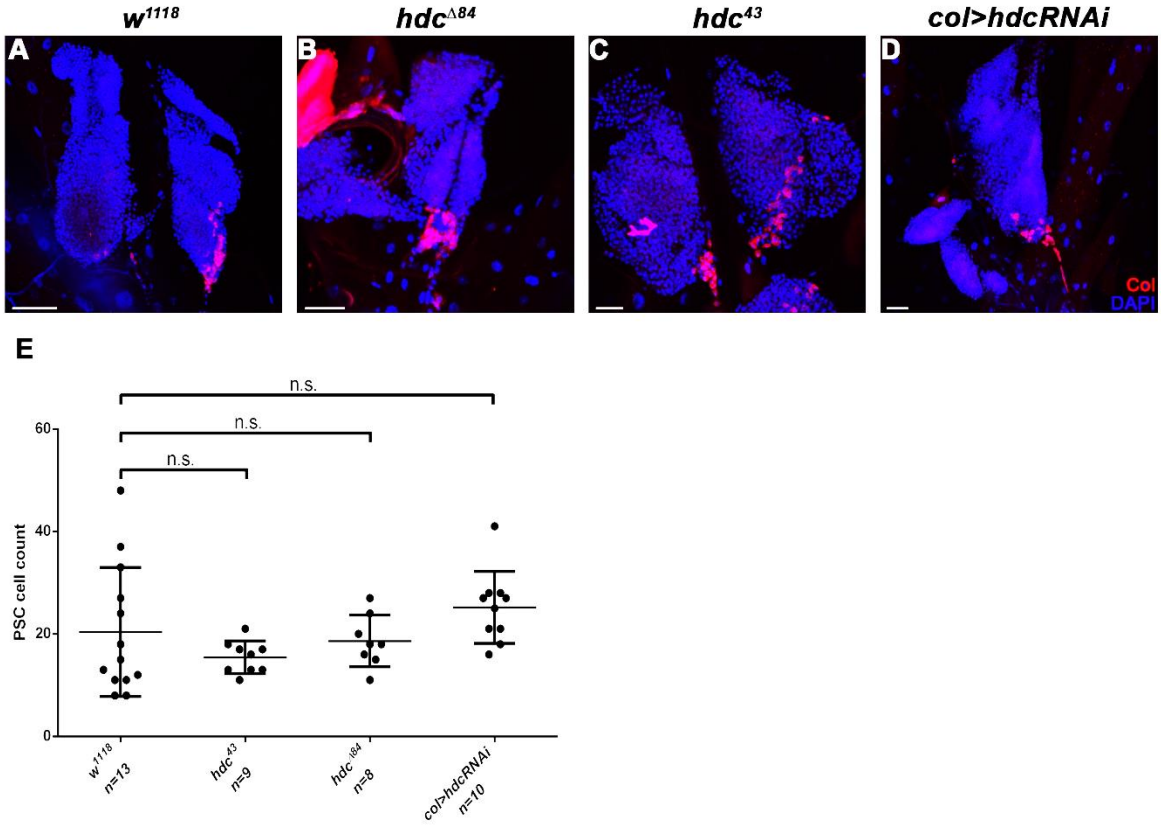
Megfigyeltük, hogy a w^{1118} kontrollhoz hasonlóan a hdc^{43} és $hdc^{\Delta 84}$ lárvákban is fennmarad a Col termelődése, mind a poszterior szignalizációs központban, mind pedig a másodlagos lebenyekben (**38. ábra**).



38. ábra. A Collier mintázata a központi nyirokszervben *hdc* mutáns háttéren. A Collier kifejeződése a *hdc* mutáns lárvákban is fennmarad, mind a PSC-ben (nyíl), mind pedig a másodlagos lebenyekben. PSC – anti-Col (piros), sejtmag – DAPI (kék). Méretarány: 50 µm.

A Colliert kifejező PSC sejtek száma sem a mutánsokban, sem pedig a *hdc* csendesítés hatására nem változott meg jelentősen (**39. ábra**).

Mivel a poszterior szignalizációs központ lamellocita képződés szabályozásában játszott szerepét számos közleményben leírták (Jung és mtsai, 2005; Mandal és mtsai, 2007; Krzemien és mtsai, 2007; Pennetier és mtsai, 2012; Dey és mtsai, 2016), míg a másodlagos lebenyekben zajló regulációról nincs ismeretünk, ezért az a feltevésünk, hogy a *hdc* vérsejtképződési fenotípusának hátterében a szignalizációs központ működési zavara állhat. Azt is megállapíthatjuk, hogy ezt a működési hibát nem a niche méretének, vagy a PSC-sejtek identitásának megváltozása okozza.



39. ábra. A PSC mérete a *hdc* mutáns lárvákban és a csendesítés esetén. A PSC sejtek száma sem **B és C)** a mutánsokban, sem pedig **D)** a PSC-specifikus *hdc* csendesítés hatására nem változik meg jelentősen. PSC – anti-Col (piros), sejtmag – DAPI (kék). Méretarány: 25 µm. **E)** A PSC mérete az egyes mutánsok, illetve a csendesített lárvák központi nyirokszervében. n.s. – nem szignifikáns. A szignifikancia értékeket párosítatlan Student's t-teszttel állapítottuk meg.

4.9. A Hdc lehetséges együttműködő partnereinek vizsgálata

Korábban az ecetmuslica központi idegrendszerében végzett vizsgálatok során leírták a citoplazmában elhelyezkedő Hdc-nek a JAK/STAT és az mTOR jelátviteli utakkal való együttműködését (Bach és mtsai, 2003;Avet-Rochex és mtsai, 2014; Li és mtsai, 2019), ezért feltételeztük, hogy a lamellocita képződés szabályozásában is jelátviteli útvonalak befolyásolása révén vehet részt.

Ezért a következő lépésben a Hdc lehetséges együttműködő partnereinek azonosítása érdekében szűrővizsgálatot végeztünk. Jelöltjeink olyan jelátviteli utak elemei voltak, melyekről korábban már megfigyelték, hogy szerepet játszanak a lamellocita képződés

szabályozásában: ezek a Hh, a Dpp, a JAK/STAT, a JNK és az Alk (Zetterval és mtsai, 2004; Sorrentino és mtsai, 2004; Jung és mtsai, 2005; Mandal és mtsai, 2007; Krzemien és mtsai, 2007; Bidla és mtsai, 2007; Tokusumi és mtsai, 2009; Makki és mtsai, 2010; Fossett, 2013; Dey és mtsai, 2016).

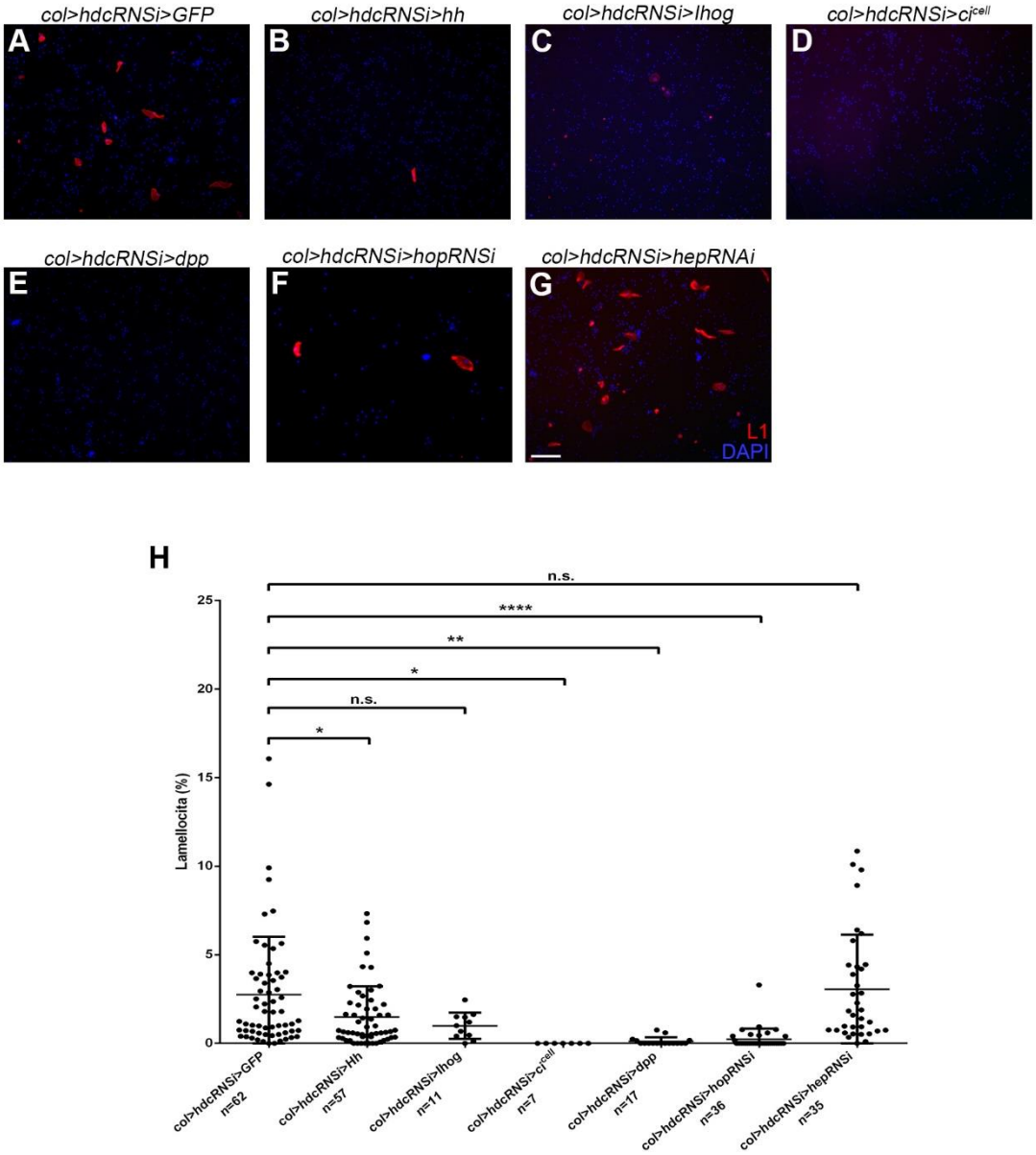
A jelölt faktorokat PSC specifikus *hdc* csendesítés hátterében (*Pcol85-Gal4 UAS-hdcRNSi*) túltermeltettük (vagyis az adott jelátviteli útvonalat túlaktiváltuk), illetve RNS-interferenciával csendesítettük (tehát a jelátvitelt gátoltuk) és az L1 marker segítségével vizsgáltuk a beavatkozások keringő vérsejtekre gyakorolt hatását. Annak érdekében, hogy az UAS elemek között a Gal4 forrásért potenciálisan fellépő versengés hatását az eredmények értékelésekor kizárhassuk, kontrollként a vérsejtképződés szempontjából indifferens GFP-t termeltettük túl.

Megfigyeltük, hogy a Hh és a Dpp útvonalak aktiválása (a Hh és a Dpp túltermelése) egyaránt szuppresszálta a *hdc* csendesítés lamellocita képződési fenotípusát: mind a *Pcol85-Gal4, UAS-hdcRNSi/UAS-hh,* mind pedig a *Pcol85-Gal4, UAS-hdcRNSi/UAS-dpp* genotípusú lárvákban jelentősen csökkent a keringő lamellociták aránya a *Pcol85-Gal4, UAS-hdcRNSi/+;UAS-2xEGFP/+* genotípusú kontroll lárvákhoz viszonyítva (**40. ábra A, B, E és H**). Érdekes, hogy a Hh jelátviteli kaszkád két további elemének – az Ihog-nak, amely a Hh koreceptora és a Cubitus interruptusnak (Ci), amely a Hh jelátvitel útvonal intracelluláris komponense – *col*-specifikus túltermelése szintén mérsékelte a *hdc* csendesítés hatását (**40. ábra C, D és H**).

Azt tapasztaltuk továbbá, hogy a JAK/STAT útvonal gátlása (vagyis a *hop* csendesítése) ugyancsak szuppresszálta a *hdc* csendesítés fenotípusát, azonban a JNK útvonal gátlása (a *hep* csendesítése) nem volt hatással a lamellocita képződésre: a *Pcol85-Gal4, UAS-hdcRNSi/UAS-hopRNSi* genotípusú lárvák keringésében jelentősen csökkent a lamellociták aránya a kontroll

lárvákhoz képest, ugyanakkor a *Pcol85-Gal4, UAS-hdcRNSi/UAS-hepRNSi* genotípusú lárvákban nem változott szignifikánsan a tokképző sejtek aránya (**40. ábra F, G és H**).

Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a *hdc* a lamellocita képződést a Hh, a Dpp és a JAK/STAT jelátviteli útvonalakon keresztül szabályozza, míg a JNK útvonalnak ebben a folyamatban nincs szerepe.



40. ábra. A *hdc* interakciója a lamellocita képződésben szerepet játszó jelátviteli útvonalakkal. **A)** a *hdc* csendesítés fenotípusát **B-D)** a Hh jelátvitel elemeinek, valamint **E)** a Dpp-nek a túltermelése szuppresszálta. **F)** A *hop* csendesítése ugyancsak ellensúlyozta a *hdc* csendesítés hatását, **G)** a *hep* csendesítése azonban hatástalan maradt. Lamellocita – L1 (piros), sejtmag – DAPI (kék). Méretarány: 20 µm. **H)** A lamellociták arányának változása a különböző interakciós kombinációk esetében. ****: $p < 0.0001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; n.s. – nem szignifikáns. A szignifikancia értékeket párosítatlan Student's t-teszttel állapítottuk meg.

5. Az eredmények megvitatása

Az ecetmuslica kiváló modellrendszer a vérsejtek és a vérsejtképző kompartmentumok kialakulásának és működésének a vizsgálatára. A rendelkezésre álló molekuláris markerek (Kurucz és mtsai, 2003 és 2007b), vérsejt- és kompartmentum specifikus genetikai meghajtóelemek (Sinenko és Mathey-Prevot, 2004; Zetterval és mtsai, 2004; Tokusumi és mtsai, 2009), valamint a vizsgálni kívánt faktorok csendesítésére és túltermelésére alkalmas transzgenikus konstrukciók felhasználásával a differenciálódási és szerveződési folyamatok részletesen és számos megközelítési irányból, akár *in vivo* is vizsgálhatók (Csordás és mtsai, 2014).

Jelen dolgozatban közölt munkánk során a klasszikus genetikai és molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával a vérsejtképződés szabályozásának új szereplőjét azonosítottuk az ecetmuslicában.

Bemutattuk, hogy a humán tumorszuppresszor HECA Drosophila homológja, a Hdc a vérsejtdifferenciálódás központi regulátor eleme. A három vérsejtképző kompartmentum közül kizárólag a központi nyirokszervben fejeződik ki, ami arra utal, hogy a Hdc specifikusan ebben a szervben fejti ki szabályozó hatását. Csoportunkban korábban megfigyeltük, hogy a központi nyirokszerv eredetű lamellocitákban a *hdc* aktivitása lecseng (Márkus és mtsai, 2009). Schmid és munkatársai megállapították, hogy a *hdc* túltermelése szuppresszálja a szesszilis szövet szerkezetének a $Toll^{10b}$ mutánsokban megfigyelt felbomlását (Schmid és mtsai, 2016). Ezen megfigyelésekből arra következtettünk, hogy a Hdc a vérsejtképződés gátló faktora.

A hdc^{B5} allél *hdc-Gal4* meghajtóelemmé történt konverziója lehetővé tette a gén kifejeződési mintázatának időbeli követését. Figyelemre méltó, hogy bár a konverzió nyolc bázispár eltéréssel, gyakorlatilag tökéletesen megvalósult és a LacZ és Gal4 kifejeződési mintázata megegyezik, mégis a hdc^{B5}-tel szemben a *hdc-Gal4* allélok letálisak, ami arra utal,

hogy erősebb hipomorf allélok. Tekintettel arra, hogy a P elemek pozíciója gyakorlatilag azonos, a letalitás logikus magyarázatának az tűnik, hogy a *P{GawB}* elemben található promóter erősebb csapdázó hatást fejthet ki a *hdc* gén enhanszereire, mint a *P{LacZ}* promótere, ezáltal jobban gátolja a gén megfelelő kifejeződését.

A *hdc* kutatását megalapozó cikkben vizsgált $hdc^{B5\{LacZ\}}$ allélról leírták, hogy mintázata megegyezik az anti-Hdc monoklonális ellenanyaggal történő immunfestés esetén kapott mintázattal (az imágókorongokban, hisztoblasztokban, tracheoblasztokban, központi nyirokszervben, stb.) (Weaver és White, 1995). A $hdc^{B5\{LacZ\}}$ kifejeződését a központi nyirokszervben csoportunkban is megfigyeltük, valamint azt is leírtuk, hogy immunindukciót követően a nyirokszervet elhagyó sejtekben a gén aktivitása megszűnik (Márkus és mtsai, 2009). A konverzió során az enhanszer csapdázó *P{LacZ}* elem helyére 8 bp pontossággal épült be a *P{GawB}* elem, ezért feltételeztük, hogy kifejeződéséhez ugyan azokat a szabályozó elemeket használja, mint a korábbi P elem. Ezt alátámasztották az *UAS-GFP* riprter segítségével végzett megfigyeléseink, amikor a *Gal4/GFP* kifejeződését a korábbi közleményekben leírt mintázatban tapasztaltuk. A hdc^{19}-*Gal4*-gyel végeztünk sejtvonal-jelöléses vizsgálatot embrióban és ott is megfigyeltük, hogy a többi vérsejtképző kompartmentumban nem fejeződik ki a transzgén. Ezek alapján hűségesnek tekintettük a hdc^{19}-*Gal4* mintázatát.

Megfigyeltük, hogy a második lárvastádiumban a *hdc* kifejeződése kiterjed a központi nyirokszerv nagy részére, majd az egyedfejlődés folyamán ez a mintázat fokozatosan csökken, ami arra utalt, hogy a fehérjének szerepe lehet a központi nyirokszervben a vérsejt előalakok differenciálatlan állapotának fenntartásában. Ezt a feltevésünket igazolta, hogy mind a *hdc* mutációja, mind pedig a PSC-specifikus csendesítése spontán lamellocita differenciálódáshoz vezetett. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a *hdc* a lamellocita képződés represszora, és gátló hatását a PSC-n keresztül fejti ki.

Az újonnan előállított *hdc*$^{\Delta 84}$ deficiencia homozigóta formában a korábban izolált *hdc*^{43} amorf mutánshoz hasonlóan immunindukció nélkül lamellocita differenciálódást okoz. Mivel az allél létrehozásakor a gén teljes 5' UTR szakasza (amely fontos szerepet tölt be a transzláció, és esetenként a transzkripció szabályozásában is), valamint a transzlációs kezdőponttal együtt majdnem a teljes első exon törlődött, ráadásul báb stádiumban letalitást okoz, ezért a deléciót amorf allélnak tekintettük, annak ellenére, hogy expresszivitása és penetranciája kisebb a *hdc*^{43} allélénál. A fenotípus erősségében és gyakoriságában megfigyelt különbséget magyarázhatja, hogy a *hdc*^{43} egy nagyobb méretű deléció, azonban molekulárisan csak nagyon durva felbontásban térképezték fel, ezért nem tudjuk pontosan milyen további szekvenciákat érint, amik esetleg a különbség hátterében állhatnak (Weaver és White, 1995).

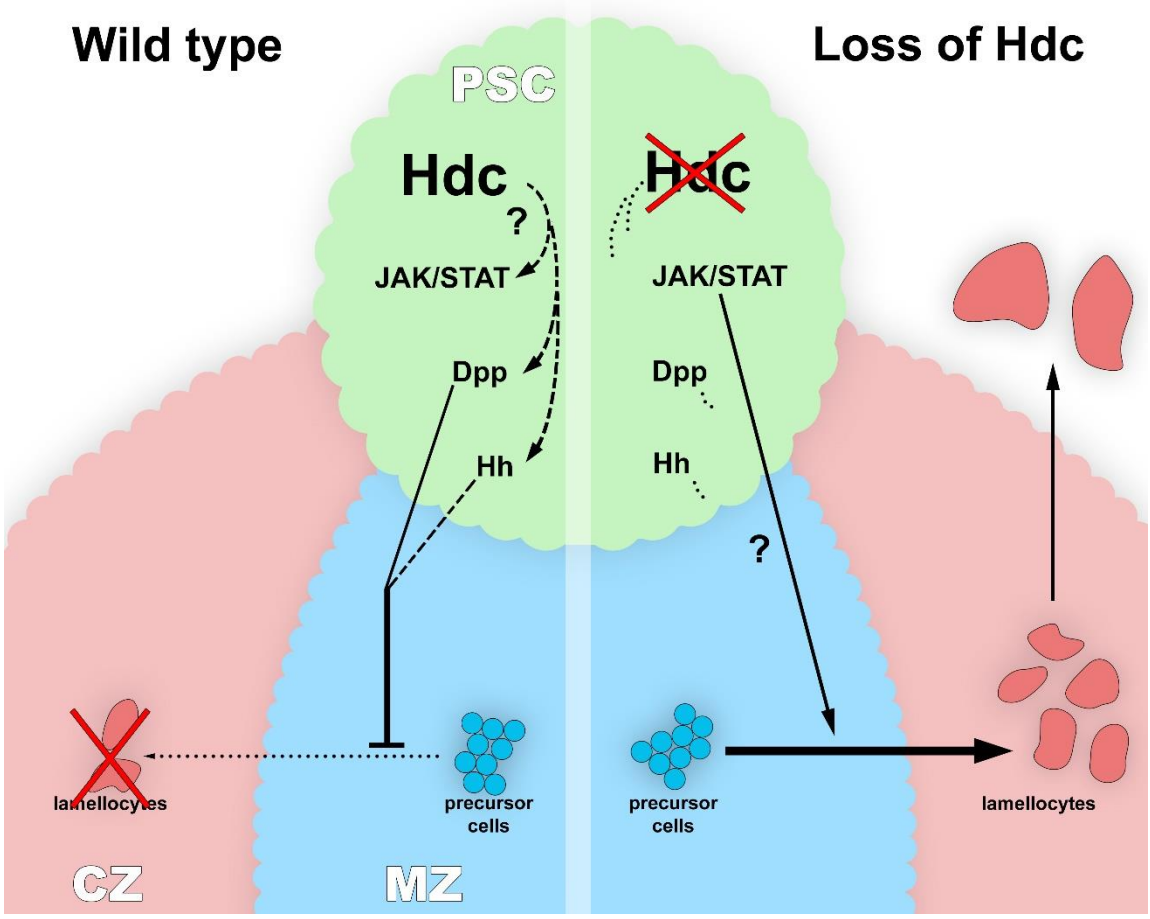
Korábban már leírták, hogy a Hdc szükséges a here őssejt niche-ben a „hub" sejtek fennmaradásához (Resende és mtsai, 2013). Ez a megfigyelés és a mi eredményeink arra engednek következtetni, hogy a Hdc-nek szerepe lehet a központi nyirokszervben a vérsejtképző niche fenntartásában. Habár néhány közlemény vitatja a PSC-nek a központi nyirokszerv fejlődésében betöltött szerepét (Sinenko és mtsai, 2009; Benmimoun és mtsai, 2015; Oyallon és mtsai, 2016; Hao és Jin, 2017), az továbbra is elfogadott, hogy a parazitoid darázsfertőzést követően a prekurzorokból történő lamellocita képződés szabályozásához szükség van erre a sejtcsoportra (Louradour és mtsai, 2017). Dey és munkatársai (2016) közleménye szerint a vérképző őssejtek és vérsejt előalakok differenciálatlan állapotának megőrzéséhez a Dpp és a Hh jelátvitel összehangolt működésére van szükség a PSC-ben. A Dpp jelátvitel az első lárvastádiumban szükséges a HSC-k fennmaradásához, majd az azokból képződő vérsejt előalakok prohemocita állapotának megőrzését a Hh jelátvitel biztosítja (Dey és mtsai, 2016). Sőt, egy másik munkából az is kiderült, hogy a lárvák Smoothened (a Hh receptora) inhibítorral történő etetése a progenitorok nyugalmi állapotának megszűnéséhez és hemocita differenciálódáshoz vezet (Giordani és mtsai, 2016). Mivel mind a Dpp, mind pedig

a Hh túltermelése a PSC-ben szuppresszálta a *hdc* fenotípusát, arra következtettünk, hogy a Hdc kölcsönhat ezekkel a jelátviteli kaszkádokkal.

Meglepő módon azt is megfigyeltük, hogy a Hdc a JAK/STAT útvonallal is kölcsönhatásba lép a vérsejtképző niche-ben. A JAK/STAT jelátvitel hemocita képződésben betöltött sejtautonóm szerepét leírták már a velőállományban, azonban a PSC-ben betöltött funkciója eddig ismeretlen volt (Fossett, 2013; Hao és Jin, 2017). Az eredményeink arra utalnak, hogy a központi nyirokszerv niche-ben vizsgált jelátviteli útvonalak összetett szabályozási hálózatot alkotnak, melyben a JAK/STAT a Dpp és a Hh szignalizációval antagonisztikusan működik.

Eredményeinkből nem állapítható meg teljes biztossággal a Hdc és az együttműködő útvonalak pontos hierarchia viszonya, azonban mivel a Hdc-ről korábban leírták, hogy a JAK/STAT útvonalat szabályozza, ráadásul előzetes MS-MS adataink alapján a Hdc közvetlen kapcsolatban áll a Hh és a Dpp útvonalak faktoraival, valószínűbbnek tartjuk, hogy az említett útvonalak fölött és nem azokkal párhuzamosan működik (Bach és mtsai, 2003). Működési modellünket a **41. ábra** mutatja be.

A *hdc* funkcióvesztés lamellocita képződési fenotípusának további lehetséges magyarázata lehet a ROS szint megváltozása a PSC-ben, amiről már korábban bizonyították, hogy hatása lehet az effektor sejtek differenciálódására (Louradour és mtsai, 2017). Bár ezzel kapcsolatos vizsgálatokat nem végeztünk, ennek az eshetőségnek ellent mond az, hogy a ROS szint emelkedése hatására a központi nyirokszerv szerkezet szétesik, amit a *hdc* vizsgálata során nem figyeltünk meg.



41. ábra. A Hdc szerepe a lamellocita differenciálódás szabályozásában. A PSC-ben kifejeződő *hdc* a Dpp, a Hh és a JAK/STAT jelátviteli utak szabályozása révén vesz részt a prohemocita állapot fenntartásában (bal oldal). A *hdc* funkcióvesztése esetén (jobb oldal) a Hh és a Dpp aktivitás megszűnésének hatására a progenitorok lamellocitává differenciálódnak.

Az irodalmi adatok alapján a Hdc sejtautonóm és nem-sejtautonóm hatást is kifejthet a különböző fejlődési folyamatokban. Míg az imágókorongok differenciálódására, vagy a dendrit rövidülésre sejtautonóm módon hat, addig az embrionális trachea fejlődését nem-sejtautonóm módon befolyásolja (Weaver és White, 1995; Steneberg és mtsai, 1998; Steneberg és Samakovlis, 2001; Loncle és Williams, 2012). A *hdc* csendesítése a *Dot* vérsejt-leszármazási vonalban egyaránt vezetett *Dot*-vonal eredetű és attól független eredetű lamellociták keletkezéséhez, ami a fehérje nem-autonóm hatására enged következtetni (Honti és mtsai, 2010). Ennek legegyszerűbb magyarázata az lehet, hogy a Hdc a niche és a prekurzorok közötti kommunikációt befolyásolja. Ráadásul, mivel a *hdc* sem a keringésben, sem pedig a szesszilis szövetben nem fejeződik ki, hatása azonban ezekben a kompartmentumokban is érvényesül,

úgy tűnik, hogy a faktor a központi nyirokszervben kompartmentum autonóm, míg a másik két szövetben nem-kompartmentum autonóm módon szabályozza a hemociták érését. Másképpen megfogalmazva, valószínű, hogy nem csak a nyirokszerven belüli, hanem a kompartmentumok közötti kommunikációban is fontos szereppel bír. Sinenko és munkatársai (2012) leírták, hogy immunindukció hatására a PSC az EGFR ligand Spitz szekréciója révén serkenti a lamellocita differenciálódást a keringésben. Érdekes lehetőség lenne megvizsgálni a Hdc és a Spitz-szekréció kapcsolatát, ami a kompartmentumok kapcsolatának részletesebb megértését is lehetővé tenné.

A *hdc* mRNS-ről egy különleges transzlációs mechanizmusnak köszönhetően kétféle fehérje is képződhet (Steneberg és mtsai, 1998; Steneberg és Samakovlis, 2001). A hosszabb fehérje változat szerepét igazolták a tracheafejlődés szabályozásában, míg az imágókorongok fejlődésében a rövid izoforma jelentőségét írták le (Weaver és White, 1995; Steneberg és mtsai, 1998; Steneberg és Samakovlis, 2001). A dendrit rövidülés vizsgálata során a *hdc* mutáns fenotípusát a rövid forma túltermelésével sikeresen menekítették (Loncle és Williams, 2012). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a sejtautonóm hatást a rövid fehérje változat fejti ki, a nem-sejtautonóm hatás eléréséhez azonban a hosszú izoformára van szükség. A *hdc* lamellocita fenotípusának menekítéséhez egy olyan túltermelő konstrukciót alkalmaztunk, amely mindkét változat transzlációját lehetővé teszi, így érdekes kérdés marad, hogy a vérsejtképződésben kifejtett hatáshoz melyik formára van szükség.

Kevés információval rendelkezünk a *hdc* gén szabályozásával kapcsolatban. A tracheában a gén kifejeződéséért az Escargot transzkripciós faktor felel, melyet számos szöveti őssejtben azonosítottak már (Steneberg és mtsai, 1998). A ventrális imágókorongok fejlődése során pedig a Buttonhead és az Sp1 fehérjék aktiválják a *hdc* transzkripcióját (Estella és mtsai, 2003). A *hdc* szabályozó régióját még nem jellemezték és PSC-specifikus regulátor elemet sem azonosítottak még benne. Az általunk létrehozott P elem beépülések és deficienciák vizsgálata

a jövőben nagy mértékben hozzájárulhat a *hdc* kifejeződését szabályozó genetikai elemek felderítéséhez.

A *hdc* kifejeződésének szabályozásához hasonlóan a fehérje közvetlen együttműködő partnereiről is igen keveset tudunk. A Hdc molekuláris funkciója és doménstruktúrája sem ismert. Eddig mindössze egyetlen olyan fehérjét azonosítottak, amely közvetlen kölcsönhatásba lép a Hdc-szel. Ez a fehérje az Unkempt, amely a Hdc-szel közösen az InR/mTOR jelátviteli útvonal szabályozását végzi, ezáltal fontos szerepük van a szövetnövekedésnek és a differenciálódásnak az egyed tápláltsági állapotával való összehangolásában (Resende és mtsai, 2013; Li és mtsai, 2019). Érdekes megemlíteni, hogy egy nemrég megjelent közleményben kimutatták, hogy a Hdc humán ortológja, a HECA és az Unkempt ortológja, az UNK szintén részt vesznek a szövetnövekedés szabályozásában (Li és mtsai, 2019). Azt is megfigyelték, hogy a HECA ciklinekkel és CDK-kal lép kölcsönhatásba és azok szabályozásán keresztül tumorszuppresszor hatást fejt ki (Dowejko és mtsai, 2012). Megállapíthatjuk tehát, hogy a Hdc további együttműködő partnereinek azonosítása nem csak az ecetmuslica vérsejtképződésének megértése szempontjából fontos, de az így nyert ismeretek a tumorbiológia vagy a tumorterápia területén is hasznosulhatnak.

A humán vérképzéssel kapcsolatban még nem vizsgálták a HECA-t, azonban kimutatták, hogy kifejeződik a lépben, a csecsemőmirigyben és a perifériás leukocitákban egyaránt, elképzelhető tehát, hogy a fehérje szerepet játszik az emberi vérsejtek kialakulásának szabályozásában is. (Chien és mtsai, 2006).

Jelen dolgozat rávilágít a Hdc eddig ismeretlen funkciójára a hemocita sejtsors szabályozásában, mely feladatát a Dpp és a Hh jelátviteli útvonalakkal történő együttműködésen keresztül látja el az ecetmuslica lárva központi nyirokszervében. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Hdc-nek központi szerepe van a vérképző őssejt állapot és a vérsejtképződés szabályozásában.

6. Az eredmények összefoglalása

A Drosophila Headcase egy rendezetlen szerkezetű citoplazmatikus fehérje, melyet különböző szövetekben úgy azonosítottak, mint a differenciálódás gátló faktorát. Szabályozó hatását autonóm és nem-autonóm módon is kifejtheti. Mivel a fehérje a vérsejtképző kompartmentumok egyikében - a központi nyirokszervben - is kifejeződik, kíváncsiak voltunk, hogy milyen szerepet tölthet be a hemociták képződésében.

Kísérleteink során a *hdc* kifejeződésének *in vivo* követése érdekében P elem konverzióval *hdc-Gal4* genetikai meghajtóelemet hoztunk létre, melynek megfelelő működését *UAS-GFP* riporter konstrukció segítségével ellenőriztük. A meghajtóelem hűen követte a *hdc* mintázatát - így kifejeződött az imaginális szövetekben és a központi nyirokszervben egyaránt. A beépülés pontos genomi pozícióját szekvenálással állapítottuk meg. Kiderült, hogy a P elemek kicserélődése 8 bázispár híján pontosan történt a *hdc* gén 5' szabályozó régiójában.

Megállapítottuk, hogy a létrehozott *hdc-Gal4* allél, a hipomorf *hdc* allélokhoz hasonlóan a báb stádiumban recesszív letális fenotípust okozott. A faktor túltermelésével és csendesítésével igazoltuk, hogy a letalitást a P elem beépülése, vagyis a *hdc* működésének megzavarása és nem a konverzió során létrejött egyéb mutáció okozza. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a *hdc-Gal4* hipomorf allélnak tekinthető.

Az előállított genetikai meghajtóelem segítségével megfigyeltük, hogy a lárvális fejlődés során a központi nyirokszerv elsődleges lebenyében a *hdc* korai kiterjedt kifejeződési mintázata a lárva életszakasz végére fokozatosan csökken. Ráadásul, míg a második lárva stádiumban a vérsejtképző niche-ben is jelentős *hdc-Gal4* expressziót tapasztaltunk, addig a vándorló lárvák PSC-jében megszűnt a gén aktivitása. Ezek a megfigyelések megerősítették azt az elképzelésünket, mely szerint a *hdc*-nek szerepe lehet a központi nyirokszerv és a benne elhelyezkedő vérsejtek fejlődésének szabályozásában.

A P elem mozgatáson alapuló mutánselőállítás módszerével létrehoztunk egy közel 2 kilobázis kiterjedésű delédiót, mely magába foglalja a gén teljes 5' nem transzlálódó régióját és majdnem a teljes első exont. Az új amorf allél (*hdc*$^{\Delta 84}$), valamint egy korábban leírt, ám molekulárisan nem jellemzett *hdc* deficiencia (*hdc*^{43}) és a *hdc*^{19}*-Gal4* vizsgálata során kiderült, hogy a homozigóta mutáns lárvákban immunindukció hiányában, spontán lamellocita differenciálódás zajlik. Így megállapítottuk, hogy a Hdc valóban részt vesz a hemociták képződésének szabályozásában, mint a lamellocita sejtsorsot gátló faktor.

A mutáció fókuszának felderítése érdekében a központi nyirokszervben egymástól eltérő kifejeződési mintázatot mutató genetikai meghajtóelemek és a *hdc* kifejeződését gátló RNS interferencia konstrukció felhasználásával a nyirokszerv különböző funkcionális egységeiben csendesítettük a faktort. A különböző mintázatban történt csendesítések lamellocita differenciálódási fenotípusa alapján megállapítottuk, hogy a *hdc* mutáció fókusza a PSC-ben van; vagyis a hematopoietikus niche-ben van szükség a faktorra a lamellocita képződés gátlásához. Ráadásul, amikor a *hdc* csendesítését kiterjesztettük a *Dot* vérsejt leszármazási vonalra, azt is megfigyeltük, hogy a beavatkozás sejtautonóm és nem-sejtautonóm módon is lamellocita differenciálódást okoz.

Vizsgálatainkból az is kiderült, hogy a *hdc* mutációjának, vagy PSC-specifikus csendesítésének nincs hatása a vérsejtképző niche méretére, amiből arra következtettünk, hogy a vizsgált gén nem a niche méretének kialakításában és sejtjei identitásának megőrzésében játszik szerepet, hanem valószínűleg a vérsejt előalakokra gyakorolt hatásukat befolyásolja.

Azt feltételeztük, hogy a *hdc* a központi nyirokszervben működő jelátviteli útvonalak befolyásolása révén vesz részt a differenciálódás szabályozásában, ezért megvizsgáltuk genetikai interakcióját olyan szignalizációs kaszkádok elemeivel, amelyek lamellocita képződésben betöltött szerepét korábban már igazolták. Kísérleteink alapján

megállapítottuk, hogy a Hdc működése során a Dpp, a Hh és a JAK/STAT útvonalakkal lép kölcsönhatásba a vérsejtképző niche-ben.

A dolgozatban bemutatott eredmények alapján felállítottuk modellünket, mely bemutatja a Hdc működését a központi nyirokszerv vérsejtképző niche-ben, valamint leírja a jelátviteli útvonalak befolyásolása révén kifejtett hatását a lamellocita differenciálódás szabályozásában.

7. Summary

Drosophila Headcase was described as a repressor of differentiation in the development of several tissues which can act either autonomously or non-autonomously. Since *hdc* is expressed in one of the larval hematopoietic tissues, namely the lymph gland, we were curious about its possible regulatory function during hematopoiesis.

To follow *hdc* expression *in vivo*, we carried out a P element conversion screen, and generated a hdc^{19}-*Gal4* transgenic driver which was tested with the *UAS-GFP* reporter. The pattern of the driver followed precisely the expression of *hdc;* it was active in the imaginal tissues and in the lymph gland as well. The exact genomic position of the insertion was determined by DNA sequencing, which revealed that the exchange of the P elements was virtually precise.

We found that similarly to the hypomorphic *hdc* alleles, the newly generated hdc^{19}-*Gal4* insertion caused pupal lethality. With the overexpression and the silencing of the factor, we verified that the lethality was provoked by the P element and not by second-site mutations, which might have appeared during the conversion process. Based on these results, we concluded that hdc^{19}-*Gal4* is a hypomorphic allele of *hdc*.

By the usage of the new driver, we observed that during larval development the initial extensive expression of *hdc* in the primary lobes of the lymph gland decreases gradually by the end of the larval stage. Moreover, while we noticed significant hdc^{19}-*Gal4* expression in the hematopoietic niche of second instar larvae, wandering larvae completely lacked *hdc* activity in the PSC. These results strengthened our hypothesis on the possible role of Hdc in the development of the lymph gland and on the differentiation of hemocytes within the organ.

In a P element remobilization mutagenesis screen, we isolated a deficiency (*hdc*$^{\Delta 84}$) of almost 2 kilobases, which overlapped with the complete 5' untranslated region and the first exon of *hdc*. We observed spontaneous lamellocyte differentiation in larvae homozygous for the *hdc*$^{\Delta 84}$ and the previously generated *hdc*^{43} null alleles, as well as in *hdc*^{19}*-Gal4* larvae. Accordingly, we concluded that Hdc plays a role in the regulation of hematopoiesis as a repressor of the lamellocyte fate.

In order to find the focus of *hdc*, we used several drivers with different expression patterns and a *hdc*-specific RNA interference construct to silence the factor in the distinct functional compartments of the lymph gland. On the basis of the hematopoietic phenotype of the different silencing combinations, we determined the focus of *hdc* in the PSC; in other words, the protein is required in the hematopoietic niche to impede the differentiation of lymph gland prohemocytes. Furthermore, when we silenced the factor in the entire *Dot* hemocyte lineage, we detected both autonomous and non-autonomous lamellocyte differentiation.

Our experiments also revealed that the mutation or the PSC-specific silencing of *hdc* does not affect the size of the hematopoietic niche, consequently we concluded that the factor does not regulate the niche size or the identity of the PSC cells, rather it has an influence on the prohemocyte regulating effect of the PSC.

We assumed that Hdc represses lamellocyte differentiation through the interaction with the signal transduction pathways in the lymph gland. Accordingly, we investigated the genetic interaction of *hdc* with the elements of distinct signaling cascades, which were described to affect the differentiation of lamellocytes. Our results implied that Hdc cooperates with the Dpp, the Hh and the JAK/STAT pathways.

On the basis of the results presented in this study, we set up our model on the function of Hdc in the hematopoietic niche of the lymph gland and on the cooperation of the factor with the different signaling cascades in the regulation of lamellocyte differentiation.

8. Hivatkozások

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

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

Bach, E.A., Vincent, S., Zeidler, M.P., Perrimon, N., 2003. A sensitized genetic screen to identify novel regulators and components of the Drosophila janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. Genetics 165, 1149–1166.

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

Benmimoun, B., Polesello, C., Waltzer, L., Haenlin, M., 2012. Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in Drosophila. Development 139, 1713–1717.

Beutler, B.A., 2009. TLRs and innate immunity. Blood 113, 1399–1407.

Bidla, G., Dushay, M.S., 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.

Brennan, C.A., Delaney, J.R., Schneider, D.S., Anderson, K.V., 2007. Psidin is required in Drosophila blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body. Curr. Biol. 17, 67–72.

Bretscher, A.J., Honti, V., Binggeli, O., Burri, O., Poidevin, M., Kurucz, É., Zsámboki, J., Andó, I., Lemaitre, B., 2015. The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in Drosophila melanogaster. Biol Open 4, 355–363.

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

Camp, D., Currie, K., Labbé, A., van Meyel, D.J., Charron, F., 2010. Ihog and Boi are essential for Hedgehog signaling in Drosophila. Neural Dev 5, 28.

Carton, Y., Nappi, A.J., 1997. Drosophila cellular immunity against parasitoids. Parasitol. Today (Regul. Ed.) 13, 218–227.

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. U.S.A. 106, 9797–9802.

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

Chung, Y.-S.A., Kocks, C., 2011. Recognition of pathogenic microbes by the Drosophila phagocytic pattern recognition receptor Eater. J. Biol. Chem. 286, 26524–26532.

Crozatier, M., Ubeda, J.-M., Vincent, A., Meister, M., 2004. Cellular immune response to parasitization in Drosophila requires the EBF orthologue collier. PLoS Biol. 2, E196.

Csordás, G., Varga, G.I.B., Honti, V., Jankovics, F., Kurucz, É., Andó, I., 2014. In vivo immunostaining of hemocyte compartments in Drosophila for live imaging. PLoS ONE 9, e98191.

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, 322–334.

Dey, N.S., Ramesh, P., Chugh, M., Mandal, S., Mandal, L., 2016. Dpp dependent Hematopoietic stem cells give rise to Hh dependent blood progenitors in larval lymph gland of Drosophila. Elife 5.

Dowejko, A., Bauer, R., Bauer, K., Müller-Richter, U.D.A., Reichert, T.E., 2012. The human HECA interacts with cyclins and CDKs to antagonize Wnt-mediated proliferation and chemoresistance of head and neck cancer cells. Exp. Cell Res. 318, 489–499.

Dowejko, A., Bauer, R.J., Müller-Richter, U.D.A., Reichert, T.E., 2009. The human homolog of the Drosophila headcase protein slows down cell division of head and neck cancer cells. Carcinogenesis 30, 1678–1685.

Dragojlovic-Munther, M., Martinez-Agosto, J.A., 2013. Extracellular matrix-modulated Heartless signaling in Drosophila blood progenitors regulates their differentiation via a Ras/ETS/FOG pathway and target of rapamycin function. Dev. Biol. 384, 313–330.

Dudzic, J.P., Kondo, S., Ueda, R., Bergman, C.M., Lemaitre, B., 2015. Drosophila innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. BMC Biol. 13, 81.

Elrod-Erickson, M., Mishra, S., Schneider, D., 2000. Interactions between the cellular and humoral immune responses in Drosophila. Curr. Biol. 10, 781–784.

Estella, C., Rieckhof, G., Calleja, M., Morata, G., 2003. The role of buttonhead and Sp1 in the development of the ventral imaginal discs of Drosophila. Development 130, 5929–5941.

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

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

Ferguson, G.B., Martinez-Agosto, J.A., 2017. The TEAD family transcription factor Scalloped regulates blood progenitor maintenance and proliferation in Drosophila through PDGF/VEGFR receptor (Pvr) signaling. Dev. Biol. 425, 21–32.

Ferjoux, G., Augé, B., Boyer, K., Haenlin, M., Waltzer, L., 2007. A GATA/RUNX cis-regulatory module couples Drosophila blood cell commitment and differentiation into crystal cells. Dev. Biol. 305, 726–734.

Fossett, N., 2013. Signal transduction pathways, intrinsic regulators, and the control of cell fate choice. Biochim. Biophys. Acta 1830, 2375–2384.

Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S.H., Schulz, R.A., 2003. Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during Drosophila hematopoiesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 11451–11456.

Fossett, N., Schulz, R.A., 2001. Functional conservation of hematopoietic factors in Drosophila and vertebrates. Differentiation 69, 83–90.

Fossett, N., Tevosian, S.G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S.H., Schulz, R.A., 2001. The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 7342–7347.

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

Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., White, K., 1999. Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila. Science 284, 1991–1994.

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

Gao, H., Wu, X., Fossett, N., 2011. Odd-skipped maintains prohemocyte potency and blocks blood cell development in Drosophila. Genesis 49, 105–116.

Gao, H., Wu, X., Simon, L., Fossett, N., 2014. Antioxidants maintain E-cadherin levels to limit Drosophila prohemocyte differentiation. PLoS ONE 9, e107768.

Ghosh, S., Singh, A., Mandal, S., Mandal, L., 2015. Active hematopoietic hubs in Drosophila adults generate hemocytes and contribute to immune response. Dev. Cell 33, 478–488.

Giordani, G., Barraco, M., Giangrande, A., Martinelli, G., Guadagnuolo, V., Simonetti, G., Perini, G., Bernardoni, R., 2016. The human Smoothened inhibitor PF-04449913 induces exit from quiescence and loss of multipotent Drosophila hematopoietic progenitor cells. Oncotarget 7, 55313–55327.

Goto, A., Kadowaki, T., Kitagawa, Y., 2003. Drosophila hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. Dev. Biol. 264, 582–591.

Grigorian, M., Mandal, L., Hartenstein, V., 2011. Hematopoiesis at the onset of metamorphosis: terminal differentiation and dissociation of the Drosophila lymph gland. Dev. Genes Evol. 221, 121–131.

Hanratty, W.P., Ryerse, J.S., 1981. A genetic melanotic neoplasm of Drosophila melanogaster. Dev. Biol. 83, 238–249.

Hao, Y., Jin, L.H., 2017. Dual role for Jumu in the control of hematopoietic progenitors in the Drosophila lymph gland. Elife 6.

Harrison, D.A., Binari, R., Nahreini, T.S., Gilman, M., Perrimon, N., 1995. Activation of a Drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. EMBO J. 14, 2857–2865.

Hartenstein, V., 2006. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22, 677–712.

Hoffmann, D., Hoffmann, J.A., 1990. Cellular and molecular aspects of insect immunity. Res. Immunol. 141, 895–896.

Hoffmann, J.A., 2003. The immune response of Drosophila. Nature 426, 33–38.

Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., Klapper, R., 2003. The two origins of hemocytes in Drosophila. Development 130, 4955–4962.

Honti, V., Csordás, G., 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, 47–56.

Honti, V., Csordás, G., Márkus, R., Kurucz, E., Jankovics, F., Andó, I., 2010. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in Drosophila melanogaster. Mol. Immunol. 47, 1997–2004.

Imler, J.L., Hoffmann, J.A., 2002. Toll receptors in Drosophila: a family of molecules regulating development and immunity. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 270, 63–79.

Irving, P., Ubeda, J.-M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., Meister, M., 2005. New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis. Cell. Microbiol. 7, 335–350.

Jankovics, F., Sinka, R., Erdélyi, M., 2001. An interaction type of genetic screen reveals a role of the Rab11 gene in oskar mRNA localization in the developing Drosophila melanogaster oocyte. Genetics 158, 1177–1188.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology 211, 213–236.

Jung, S.-H., Evans, C.J., Uemura, C., Banerjee, U., 2005. The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. Development 132, 2521–2533.

Kimbrell, D.A., Hice, C., Bolduc, C., Kleinhesselink, K., Beckingham, K., 2002. The Dorothy enhancer has Tinman binding sites and drives hopscotch-induced tumor formation. Genesis 34, 23–28.

Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., Stehle, T., Hoffmann, J.A., Reichhart, J.-M., Ferrandon, D., Rämet, M., Ezekowitz, R.A.B., 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in Drosophila. Cell 123, 335–346.

Konrad, L., Becker, G., Schmidt, A., Klöckner, T., Kaufer-Stillger, G., Dreschers, S., Edström, J.E., Gateff, E., 1994. Cloning, structure, cellular localization, and possible function of the tumor suppressor gene lethal(3)malignant blood neoplasm-1 of Drosophila melanogaster. Dev. Biol. 163, 98–111.

Krieg, A., 1958. [Immunity in insects; contribution to comparative immunology]. Z Immun exp ther 115, 472–477.

Kroeger, P.T., Tokusumi, T., Schulz, R.A., 2012. Transcriptional regulation of eater gene expression in Drosophila blood cells. Genesis 50, 41–49.

Krzemień, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., Crozatier, M., 2007. Control of blood cell homeostasis in Drosophila larvae by the posterior signalling centre. Nature 446, 325–328.

Krzemien, J., Oyallon, J., Crozatier, M., Vincent, A., 2010. Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the Drosophila lymph gland. Dev. Biol. 346, 310–319.

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

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

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

Kurucz, E., Zettervall, C.-J., Sinka, R., Vilmos, P., Pivarcsi, A., Ekengren, S., Hegedüs, Z., Ando, I., Hultmark, D., 2003. Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 2622–2627.

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

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

Leitão, A.B., Sucena, É., 2015. Drosophila sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. Elife 4.

Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of Drosophila melanogaster. Annu. Rev. Immunol. 25, 697–743.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 86, 973–983.

Lemaitre, B., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 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, 14614–14619.

Li, N., Liu, Q., Xiong, Y., Yu, J., 2019. Headcase and Unkempt Regulate Tissue Growth and Cell Cycle Progression in Response to Nutrient Restriction. Cell Rep 26, 733-747.e3.

Loncle, N., Williams, D.W., 2012. An interaction screen identifies headcase as a regulator of large-scale pruning. J. Neurosci. 32, 17086–17096.

Louradour, I., Sharma, A., Morin-Poulard, I., Letourneau, M., Vincent, A., Crozatier, M., Vanzo, N., 2017. Reactive oxygen species-dependent Toll/NF-κB activation in the Drosophila hematopoietic niche confers resistance to wasp parasitism. Elife 6.

Makhijani, K., Alexander, B., Tanaka, T., Rulifson, E., Brückner, K., 2011. The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the Drosophila larva. Development 138, 5379–5391.

Makhijani, K., Brückner, K., 2012. Of blood cells and the nervous system: hematopoiesis in the Drosophila larva. Fly (Austin) 6, 254–260.

Makki, R., Meister, M., Pennetier, D., Ubeda, J.-M., Braun, A., Daburon, V., Krzemień, J., Bourbon, H.-M., Zhou, R., Vincent, A., Crozatier, M., 2010. A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the Drosophila cellular immune response. PLoS Biol. 8, e1000441.

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. 279, 48466–48476.

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, 1019–1023.

Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., Evans, C.J., Hartenstein, V., Banerjee, U., 2007. A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains Drosophila haematopoietic precursors. Nature 446, 320–324.

Márkus, R., Kurucz, E., Rus, F., Andó, I., 2005. Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in Drosophila melanogaster. Immunol. Lett. 101, 108–111.

Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, E., 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. U.S.A. 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.

Martinez-Agosto, J.A., Mikkola, H.K.A., Hartenstein, V., Banerjee, U., 2007. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. Genes Dev. 21, 3044–3060.

Minakhina, S., Steward, R., 2010. Hematopoietic stem cells in Drosophila. Development 137, 27–31.

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

Mondal, B.C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C.J., Sinenko, S.A., Martinez-Agosto, J.A., Banerjee, U., 2011. Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. Cell 147, 1589–1600.

Mondal, B.C., Shim, J., Evans, C.J., Banerjee, U., 2014. Pvr expression regulators in equilibrium signal control and maintenance of Drosophila blood progenitors. Elife 3, e03626.

Morin-Poulard, I., Sharma, A., Louradour, I., Vanzo, N., Vincent, A., Crozatier, M., 2016. Vascular control of the Drosophila haematopoietic microenvironment by Slit/Robo signalling. Nat Commun 7, 11634.

Muratoglu, S., Garratt, B., Hyman, K., Gajewski, K., Schulz, R.A., Fossett, N., 2006. Regulation of Drosophila friend of GATA gene, u-shaped, during hematopoiesis: a direct role for serpent and lozenge. Dev. Biol. 296, 561–579.

Nappi, A.J., 1973. Hemocytic changes associated with the encapsulation and melanization of some insect parasites. Exp. Parasitol. 33, 285–302.

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

Narita, R., Yamashita, H., Goto, A., Imai, H., Ichihara, S., Mori, H., Kitagawa, Y., 2004. Syndecan-dependent binding of Drosophila hemocytes to laminin alpha3/5 chain LG4-5 modules: potential role in sessile hemocyte islets formation. FEBS Lett. 576, 127–132.

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

Oyallon, J., Vanzo, N., Krzemień, J., Morin-Poulard, I., Vincent, A., Crozatier, M., 2016. Two Independent Functions of Collier/Early B Cell Factor in the Control of Drosophila Blood Cell Homeostasis. PLoS ONE 11, e0148978.

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

Pastor-Pareja, J.C., Wu, M., Xu, T., 2008. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in Drosophila. Dis Model Mech 1, 144–154; discussion 153.

Pennetier, D., Oyallon, J., Morin-Poulard, I., Dejean, S., Vincent, A., Crozatier, M., 2012. Size control of the Drosophila hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 3389–3394.

Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P., Randsholt, N.B., 2002. Regulation of larval hematopoiesis in Drosophila melanogaster: a role for the multi sex combs gene. Genetics 162, 1259–1274.

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

Resende, L.P.F., Truong, M.E., Gomez, A., Jones, D.L., 2017. Intestinal stem cell ablation reveals differential requirements for survival in response to chemical challenge. Dev. Biol. 424, 10–17.

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, R.M., Rizki, T.M., 1974. Basement membrane abnormalities in melanotic tumor formation of Drosophila. Experientia 30, 543–546.

Rizki, R.M., Rizki, T.M., Bebbington, C.R., Roberts, D.B., 1983. Drosophila larval fat body surfaces : Changes in transplant compatibility during development. Wilehm Roux Arch Dev Biol 192, 1–7.

Röhrborn, G., 1961. Drosophila tumors and the structure of larval lymph glands. Experientia 17, 507–509.

Samakovlis, C., Kimbrell, D.A., Kylsten, P., Engström, A., Hultmark, D., 1990. The immune response in Drosophila: pattern of cecropin expression and biological activity. EMBO J. 9, 2969–2976.

Schmid, M.R., Anderl, I., Vo, H.T.M., Valanne, S., Yang, H., Kronhamn, J., Rämet, M., Rusten, T.E., Hultmark, D., 2016. Genetic Screen in Drosophila Larvae Links ird1 Function to Toll Signaling in the Fat Body and Hemocyte Motility. PLoS ONE 11, e0159473.

Sepp, K.J., Auld, V.J., 1999. Conversion of lacZ enhancer trap lines to GAL4 lines using targeted transposition in Drosophila melanogaster. Genetics 151, 1093–1101.

Shim, J., Mukherjee, T., Banerjee, U., 2012. Direct sensing of systemic and nutritional signals by haematopoietic progenitors in Drosophila. Nat. Cell Biol. 14, 394–400.

Shim, J., Mukherjee, T., Mondal, B.C., Liu, T., Young, G.C., Wijewarnasuriya, D.P., Banerjee, U., 2013. Olfactory control of blood progenitor maintenance. Cell 155, 1141–1153.

Shrestha, R., Gateff, E., 1982. Ultrastructure and Cytochemistry of the Cell-types in the Tumorous Hematopoietic Organs and the Hemolymph of the Mutant Lethal (1) Malignant Blood Neoplasm (l(1)mbn) of Drosophila Melanogaster. Development, Growth & Differentiation 24, 83–98.

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

Sinenko, S.A., Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., Banerjee, U., 2009. Dual role of wingless signaling in stem-like hematopoietic precursor maintenance in Drosophila. Dev. Cell 16, 756–763.

Sinenko, S.A., Mathey-Prevot, B., 2004. Increased expression of Drosophila tetraspanin, Tsp68C, suppresses the abnormal proliferation of ytr-deficient and Ras/Raf-activated hemocytes. Oncogene 23, 9120–9128.

Sinenko, S.A., Shim, J., Banerjee, U., 2011. Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in Drosophila. EMBO Rep. 13, 83–89.

Somogyi, K., Sipos, B., Pénzes, Z., Andó, I., 2010. A conserved gene cluster as a putative functional unit in insect innate immunity. FEBS Lett. 584, 4375–4378.

Somogyi, K., Sipos, B., Pénzes, Z., Kurucz, E., Zsámboki, J., Hultmark, D., Andó, I., 2008. Evolution of genes and repeats in the Nimrod superfamily. Mol. Biol. Evol. 25, 2337–2347.

Sorrentino, R.P., Melk, J.P., Govind, S., 2004. Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in Drosophila. Genetics 166, 1343–1356.

Sorrentino, R.P., Tokusumi, T., Schulz, R.A., 2007. The Friend of GATA protein U-shaped functions as a hematopoietic tumor suppressor in Drosophila. Dev. Biol. 311, 311–323.

Steneberg, P., Englund, C., Kronhamn, J., Weaver, T.A., Samakovlis, C., 1998. Translational readthrough in the hdc mRNA generates a novel branching inhibitor in the drosophila trachea. Genes Dev. 12, 956–967.

Steneberg, P., Samakovlis, C., 2001. A novel stop codon readthrough mechanism produces functional Headcase protein in Drosophila trachea. EMBO Rep. 2, 593–597.

Stofanko, M., Kwon, S.Y., Badenhorst, P., 2010. Lineage tracing of lamellocytes demonstrates Drosophila macrophage plasticity. PLoS ONE 5, e14051.

Stofanko, M., Kwon, S.Y., Badenhorst, P., 2008. A misexpression screen to identify regulators of Drosophila larval hemocyte development. Genetics 180, 253–267.

Tao, Y., Schulz, R.A., 2007. Heart development in Drosophila. Semin. Cell Dev. Biol. 18, 3–15.

Terriente-Felix, A., Li, J., Collins, S., Mulligan, A., Reekie, I., Bernard, F., Krejci, A., Bray, S., 2013. Notch cooperates with Lozenge/Runx to lock haemocytes into a differentiation programme. Development 140, 926–937.

Theopold, U., Krautz, R., Dushay, M.S., 2014. The Drosophila clotting system and its messages for mammals. Dev. Comp. Immunol. 42, 42–46.

Tokusumi, T., Shoue, D.A., Tokusumi, Y., Stoller, J.R., Schulz, R.A., 2009a. New hemocyte-specific enhancer-reporter transgenes for the analysis of hematopoiesis in Drosophila. Genesis 47, 771–774.

Tokusumi, T., Sorrentino, R.P., Russell, M., Ferrarese, R., Govind, S., Schulz, R.A., 2009b. Characterization of a lamellocyte transcriptional enhancer located within the misshapen gene of Drosophila melanogaster. PLoS ONE 4, e6429.

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

Vilmos, P., Nagy, I., Kurucz, E., Hultmark, D., Gateff, E., Andó, I., 2004. A rapid rosetting method for separation of hemocyte sub-populations of Drosophila melanogaster. Dev. Comp. Immunol. 28, 555–563.

Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataillé, L., Haenlin, M., 2003. Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during Drosophila hematopoiesis. EMBO J. 22, 6516–6525.

Wang, L., Kounatidis, I., Ligoxygakis, P., 2014. Drosophila as a model to study the role of blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. Front Cell Infect Microbiol 3, 113.

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

Williams, M.J., 2007. Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. J. Immunol. 178, 4711–4716.

Williams, M.J., Ando, I., Hultmark, D., 2005. Drosophila melanogaster Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. Genes Cells 10, 813–823.

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

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

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

Yu, S., Luo, F., Jin, L.H., 2018. The Drosophila lymph gland is an ideal model for studying hematopoiesis. Dev. Comp. Immunol. 83, 60–69.

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

Zsámboki, J., Csordás, G., Honti, V., Pintér, L., Bajusz, I., Galgóczy, L., Andó, I., Kurucz, É., 2013. Drosophila Nimrod proteins bind bacteria. cent.eur.j.biol. 8, 633–645.

9. Rövidítések jegyzéke

CDK: „Cyclin dependent kinase” – ciklin függő kináz, sejtciklust szabályozó fehérjecsalád

FOG: „Friend of GATA” – a GATA transzkripciós faktorokkal együttműködő transzkripciós faktor család összefoglaló neve

Pvf: „PDGF- and VEGF-related factor” – a vérlemezke eredetű- és a vaszkuláris-endoteliális növekedési faktorok *Drosophila* homológja

Pvr: „PDGF- and VEGF-receptor related” – a Pvf receptora

EGF: „epidermal growth factor” – epidermális növekedési faktor

l(3)mbn^{1}: „*lethal (3) malignant blood neoplasm*^{1}” – abnormális vérsejt proliferációt okozó recesszív mutáció.

hop^{Tum1}: a *hopscotch* gén domináns, tumoros allélja.

PSC: „posterior signaling centre” – poszterior szignalizációs központ

HSC: „hematopoietic stem sell” – vérképző őssejt

dMyc: a Myc proto-onkogén *Drosophila* homológja

TOR: „target of rapamycin”

ROS: „reactive oxigene species” – a reaktív oxigén szabadgyökök összefoglaló elnevezése

Adgf-A: „Adenosine deaminase-related growth factor A”

JAK/STAT: „Janus kinase / Signal-transducer and activator of transcription”

ddaC neuronok: C-típusú, kiterjedt dendrit hálózattal (dendritic arborization – da) rendelkező érző idegsejtek, amelyek az egyedfejlődés során nagyfokú dendrit rövidülést (dendrite pruning) szenvednek.

10. Saját közlemények listája

A doktori eljárás alapját képező közlemények:

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

Csordás, G., Varga, G.I.B., Honti, V., Jankovics, F., Kurucz, É., Andó, I., 2014. In vivo immunostaining of hemocyte compartments in Drosophila for live imaging. PLoS ONE 9, e98191.

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

Csordás, G., Varga, G.I.B., Honti, V., Jankovics, F., Kurucz, É., Andó, I., 2014. In vivo immunostaining of hemocyte compartments in Drosophila for live imaging. PLoS ONE 9, e98191.

Cinege, Gyöngyi, János Zsámboki, Maite Vidal-Quadras, Anne Uv, Gábor Csordás, Viktor Honti, Erika Gábor, és mtsai. „Genes Encoding Cuticular Proteins Are Components of the Nimrod Gene Cluster in Drosophila”. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 87 (2017): 45–54.

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