

Egy új vérsejt típus, a sokmagvú óriássejt szerepe a *Drosophila* sejt-közvetítette immunválaszában

Ph.D. értekezés

Lerner Zita

Témavezetők: Professzor Dr. Andó István és Dr. Honti Viktor



Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet, Immunológiai Témacsoport



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem Természettudományi
és Informatikai Kar

2020.

Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
A rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	7
1.1. A veleszületett immunitás	7
1.2. A <i>Drosophila melanogaster</i> immunrendszere	9
1.2.1. A humorális immunválasz folyamatai	10
1.2.2. A <i>Drosophila melanogaster</i> vérsejtjei és vérsejtképző kompartmentumai ...	11
1.2.3. A sejt-közvetítette immunválasz folyamatai	17
1.2.3.1. A baktériumok és gombák eliminálása: a fagocitózis	17
1.2.3.2. A parazitoid darázssal szembeni hatékony immunválasz: a tokképzés és a melanizáció	18
1.3. A <i>Drosophila</i> vérsejtek vizsgálatának lehetőségei	22
1.3.1. Vérsejt-specifikus molekuláris markerek használata	22
1.3.2. Vérsejt-specifikusan kifejeződő <i>in vivo</i> riportererek alkalmazása	23
1.4. A <i>Drosophila ananassae</i> , mint modellszervezet	24
2. Célkitűzések	27
3. Anyagok és módszerek	28
3.1. Anyagok	28
3.2. Ellenanyagok:	29
3.3. Felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek	29
3.4. Felhasznált parazitoid darázs fajok	30
3.5. <i>Drosophila ananassae</i> és <i>Drosophila bipectinata</i> vérsejt-specifikus monoklonális ellenanyagok előállítása	30
3.6. Transzgenikus vonalak előállítása <i>Drosophila ananassaeban</i>	30
3.7. Indirekt immunfluoreszcencia	31
3.8. Western blot analízis	32
3.9. A központi nyirokszerv vizsgálata	32
3.10. A vérsejtek kolhicinnel való kezelése, a sejt váz festése	32
3.11. A <i>Drosophila ananassae</i> lárvális vérsejtek magjainak megjelölése BrdU-val és a vérsejtek fúziójának <i>ex vivo</i> vizsgálata	33
3.12. <i>In vivo</i> fagocitózis kísérletek	33
3.13. Elektronmikroszkópos vizsgálatok	33
3.14. A sebzés helyén végbemenő melanizációs folyamatok vizsgálata	35
3.15. A NO szerepének vizsgálata a <i>D. ananassae</i> immunválaszában	35
3.16. A NO szintézis intenzitás mérése	36
3.17. A sokmagvú óriássejtek kialakulásának vizsgálata videómikroszkópia segítségével	36
4. Eredmények	37
4. 1. A sokmagvú óriássejtek azonosítása és szerkezeti jellemzése	37
4.2. A <i>Drosophila ananassae</i> és <i>Drosophila bipectinata</i> vérsejt alpopulációk azonosítása immunológiai markerek alapján	40
4.3. A plazmatociták és a sokmagvú óriássejtek szerepe a sejt-közvetítette immunválaszban	44
4.4. Transzgenikus <i>D. ananassae</i> vonalak létrehozása és az <i>in vivo</i> meghajtóelemek kifejeződése a vérsejtképző kompartmentumokban	47
4.5. A sokmagvú óriássejtek differenciálódása a vérsejtképző kompartmentumokban ..	50
4.6. A sokmagvú óriássejtek kialakulása	53

4.7. A sokmagvú óriássejtek differenciálódása különböző parazitoid darázsajok által történő immunindukciót követően.....	56
4.8. A <i>D. ananassae</i> hatékony immunválaszának hátterében álló mechanizmusok vizsgálata	59
5. Az eredmények megvitatása.....	64
6. Összefoglalás	71
7. Summary.....	74
8. Köszönetnyilvánítás	77
9. Irodalomjegyzék	79
10. Közlemények listája	94

A rövidítések jegyzéke

1. AMP: antimikrobiális peptid
2. BSA: borjú szérumalbumin
3. *crq*: *croquemort*
4. DAP: diaminopimelinsav
5. DAPI: 4,6-diaminido-2-fenillindol
6. *Dif*: Dorsal-related immunity factor
7. DMP: dimetil-pimelimidát-dihidroklorid
8. DMSO: dimetil-szulfoxid
9. D-NAME: N_{ω} -Nitro-D-arginin metil-észter hidroklorid
10. *dome*: *domeless*
11. *Dredd*: Death related ced-3/Nedd2-like caspase
12. ECM: extracelluláris mátrix
13. EDTA: 2-[2-(Bisz(karboximetil)amino)etil-(carboximetil)amino]ecetsav
14. EGF: epidermális növekedési faktor
15. EM: elektronmikroszkóp
16. FBS: újszülött borjúsérum
17. FITC: fluoreszcein-izotiocianát
18. GFP: zöld fluoreszcens protein
19. GTP: guanozin-trifoszfát
20. HAT: hipoxantin-aminopterín-timidin
21. *He*: *Hemese*
22. *Hml*: *hemolektin*
23. Ig: immunoglobulin
24. Imd: immundeficiencia
25. JAK Jánusz-kináz
26. JNK c-Jun N-terminális kináz

- 27. *l(3)mbn*: *lethal (3) malignant blood neoplasm*
- 28. LG: központi nyirokszerv
- 29. L-NAME: N_{ω} -Nitro-L-arginin metil-észter hidroklorid
- 30. *lz*: *lozenge*
- 31. LPS: lipopoliszacharid
- 32. mAb: monoklonális ellenanyag
- 33. MGH: Multinucleated Giant Hemocyte, sokmagvú óriássejt
- 34. NO: nitrogén-monoxid
- 35. NOS: nitrogén-monoxid szintáz
- 36. PAMP: patogén-asszociált molekuláris mintázat
- 37. PBS: foszfátokkal pufferelt fiziológiás sóoldat
- 38. PBT: foszfátokkal pufferelt fiziológiás sóoldat+0,05% Tween 20
- 39. PEG: polietilén-glikol
- 40. PG: peptidoglikán
- 41. PGRP: peptidoglikán felismerő fehérje
- 42. PHT: poszterior vérképző szövet
- 43. PO: fenoloxidáz
- 44. PPO: polifenoloxidáz
- 45. proPO: profenoloxidáz
- 46. PRR: mintázat felismerő receptor
- 47. PSC: poszterior szignalizációs központ
- 48. PTU: 1-fenil-2-tiourea
- 49. PVDF: poli-1,1 difluoretilén
- 50. *Pxn*: *Peroxidasin*
- 51. RNS: reaktív nitrogén származékok
- 52. ROS: reaktív oxigén származékok
- 53. SDS: sodium dodecil sulphate

- 54. SPZ: *Spätzle*
- 55. ST: szesszilis szövet
- 56. STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
- 57. TLR: Toll-like receptor
- 58. UAS: upstream activating sequence
- 59. VLP: vírus-szerű részecskék

1. Bevezetés

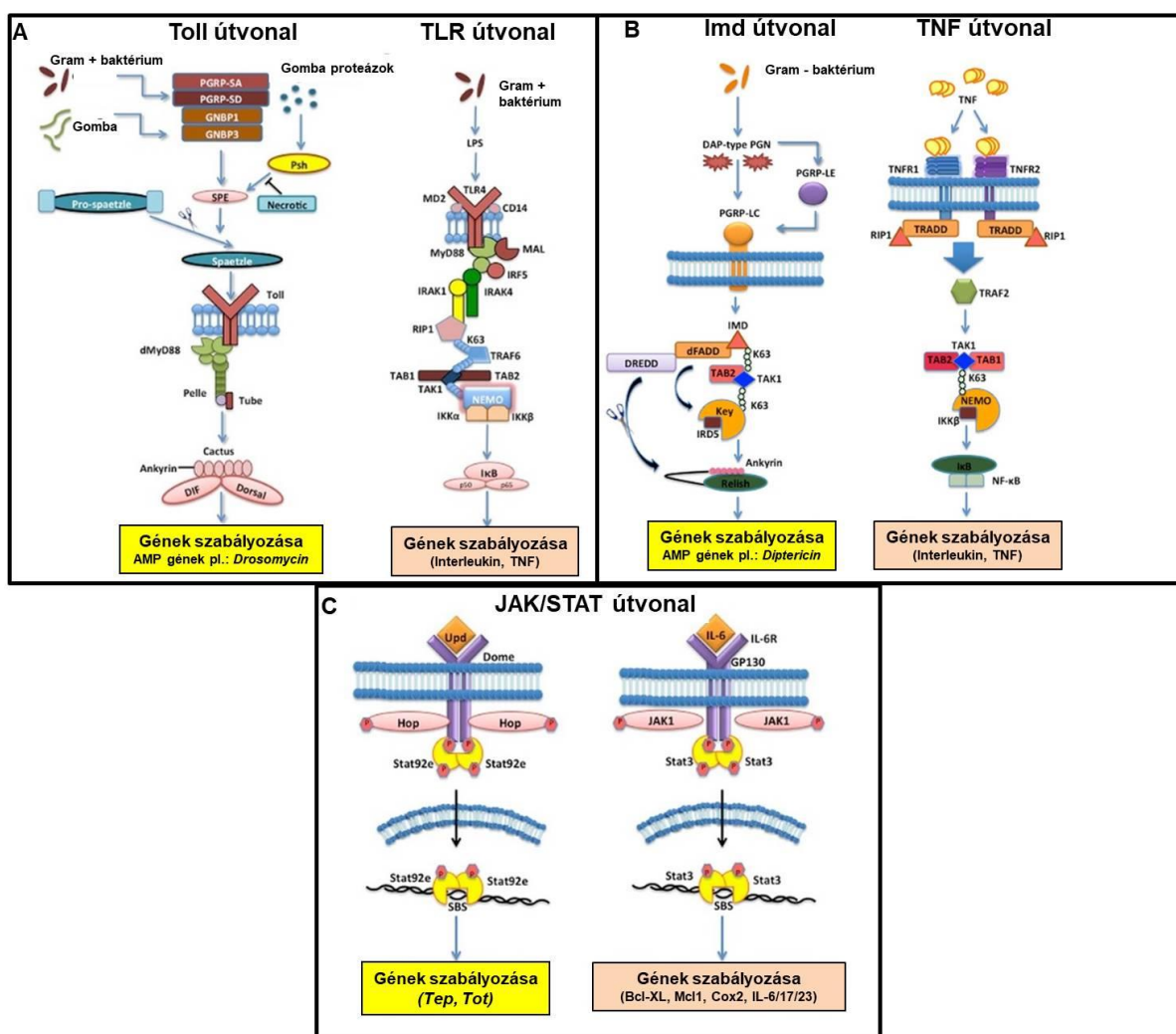
1.1. A veleszületett immunitás

Az élő szervezeteket károsító mikroorganizmusokkal és parazitákkal szemben az immunrendszer tartja fenn a gazdaszervezet belső homeosztázisát [Müller és mtsai., 2008; Buchmann, 2014]. Feladata a saját és testidegen anyagok megkülönböztetése és az élőlényt fertőző ágensek, valamint a tumorok eliminálása [Pastor-Pareja és mtsai., 2008]. A veleszületett immunitás már a gerincesek és gerinctelenek közös ősében kialakult, nagyjából 500 millió éve [Kimbrell és Beutrell, 2001]. Néhány óra alatt végbemenő konzervált immunfolyamatok alkotják, melyek a gazdaszervezetek első számú védelmi vonalát képezik a fertőzést követően. A gerincesek adaptív immunitása is erre a filogenetikailag ősi rendszerre épül, és azzal szorosan együtt működik. Ennek kialakulása immunológiai memórián alapul, és a vérkeringés T- és B sejtjei (limfocitái) által valósul meg [Greaves, 1970; Roelants, 1972].

A veleszületett vagy elsődleges immunválaszban humorális és sejtes komponensek egyaránt részt vesznek. A rendszer működése receptor-szignál kapcsolaton alapszik. Az ún. mintázatfelismerő receptorok (PRR: pattern recognition receptor) azonosítják és magukhoz kötik a testidegen részecskék bizonyos sejtfelszíni molekuláit (PAMP: pathogen associated molecular pattern) [Zhang és Mosser, 2008]. A felismerést és megkötést követően evolúciósan konzervált szignáltranszdukciós útvonalak aktiválódnak. Ilyen útvonal például gerinctelenekben a Toll jelátviteli útvonal, ami gerincesekben a TLR (Toll-like receptor) jelátvitelnek felel meg (1. ábra A). Szintén konzervált komponensekből épül fel az Imd (immunodeficiency) útvonal (1. ábra B), melyet a szervezetbe jutó Gram-negatív baktériumok aktiválnak [Lindsay és Wasserman, 2014; Myllymäki és mtsai., 2014]. A szabályozás néhány komponense (pl. az NF κ B) a gerinces emlősök TNF (tumor necrosis factor) útvonalával mutat hasonlóságot. A harmadik fő szignalizációs útvonal a JAK/STAT (Janus Kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription), amely vírusfertőzés és szeptikus sérülés hatására aktiválódik [Lemaitre és Hoffmann, 2007] (1. ábra C).

Mindhárom jelátviteli út az immunválaszban nélkülözhetetlen fehérjéket kódoló gének transzkripcióját indítja be. Ezek a fehérjék a későbbiekben szignálmolekulaként, vagy közvetlenül a patogének elpusztításában szerepet játszó effektor molekulaként

funkcionálnak. A humorális immunválasz fontos komponensét képezik az antimikrobiális peptidek (AMP), melyeket részben a zsírtest - a gerinces máj funkcionális analógja – részben - a gerincesek fehérvérsejtjeinek megfelelő – hemociták, termelnek. Ezek a kis molekulák a testidegen sejtek membránját károsítják, ami által a sejt ionháztartása felborul. Ezen kívül olyan proteolitikus kaszkád rendszereket aktiválnak, melyek később a testidegen anyag melanizációját és koagulációját eredményezik [Hoffman, Jiravanichpaisal és mtsai., 2006].



1. ábra: Az elsődleges immunválasz során aktiválódó legfontosabb szignalizációs útvonalak. A: A *Drosophila* Toll és az emlős TLR útvonala. B: A *Drosophila* Imd és az emlős TNF útvonala. C: A *Drosophila* és emlős JAK/STAT útvonala. [Stokes és mtsai., 2015 alapján]

A melanizáció folyamata az egész állatvilágra jellemző, és alapvetően megegyezik a gerincesek és gerinctelenek esetében. A melanin pigment monofenolok és difenolok oxidációja révén keletkezik. Gerinctelenekben, így a rovarokban is a polifenoloxidázok

(POs) a keringésben oldott állapotban vannak jelen. Ezek a fehérjék részt vesznek különböző szklerotizációs és melanizációs folyamatokban, - mint például a sebgyógyulás - fontos szerepet játszva a veleszületett immunitásban [Nappi és mtsai., 2009].

A sejt-közvetítette immunválasz során különböző folyamatok révén (fagocitózis, noduláció, tokképzés), az immunsejtek közvetlenül pusztítják el a szervezetbe került testidegen anyagokat, illetve elhatárolják a rosszindulatú sejtes elváltozásokat, a tumorokat [Hoffman, 1995]. A makrofág szerű sejtek speciális sejtfelszíni receptoraikkal, a már említett szignál-receptor kapcsolat révén, felismerik, megkötik és fagocitózissal eliminálják a gazdaszervezetet támadó patogéneket. Bizonyos esetekben a baktériumok és gombák aggregátumot képeznek, amelyek így már egyetlen vérsejt számára nem fagocitálható méretűvé válnak, ekkor a vérsejtek összetapadnak és több rétegben körbeveszik az aggregátumot, ezt nodulációnak nevezzük [Ratcliffe és Gagen, 1977; Garcia és mtsai., 2007; Satyavathi és mtsai., 2014]. Rovarokban a sejtnél nagyobb organizmusokat, - mint például a parazitoid darázs petéje - az enkapszuláció, azaz a tokképzés során pusztítják el a sejt-közvetítette immunválasz résztvevői. Ez a folyamat az emlősök granulóma képzéséhez hasonlít [Helming és Gordon, 2009].

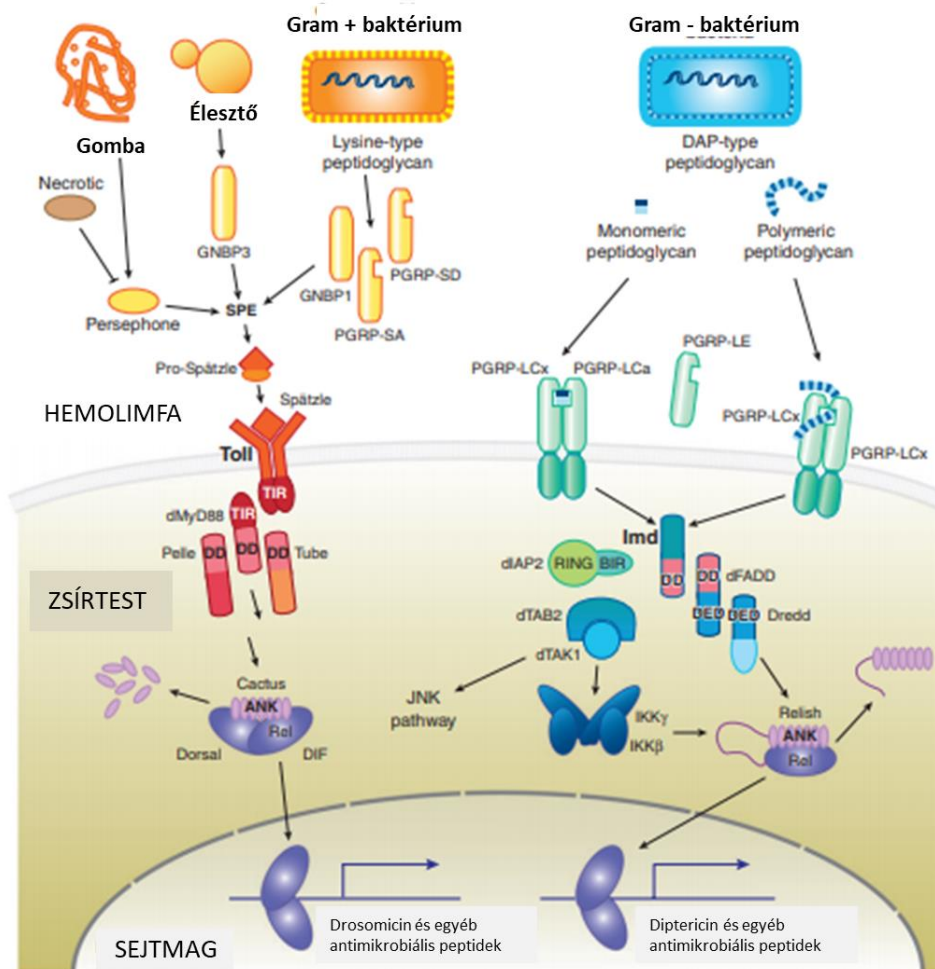
1.2. A *Drosophila melanogaster* immunrendszere

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) genetikai és molekuláris biológiai vizsgálatok gyakran használt modell organizmusa, hiszen teljes genomszekvenciája ismert, gyors generációs idő jellemzi és laboratóriumi körülmények között könnyen tartható. A *D. melanogaster* a többi rovarhoz és gerinctelenhez hasonlóan nem rendelkezik adaptív - immunglobulinokra és immunológiai memóriára épülő - immunrendszerrel, azonban rendkívül hatékony veleszületett immunválasza van. Ez egyrészt a szolubilis, szekretált faktorokra épülő humorális immunválasz, másrészt a vérsejtek által végrehajtott sejt-közvetítette immunfolyamatok által valósul meg [Lemaitre, 2007]. Ezen folyamatok számos tekintetében, - mint például a vérsejtek differenciálódását irányító faktorok - hasonlítanak a gerincesekben megtalálható immunmechanizmusokhoz, ezért a *D. melanogaster* a veleszületett immunitás kulcsfontosságú modellszervezetévé vált (Hultmark, 1994; Lemaitre és Hoffmann, 2007; Kurata, 2010; Williams, 2007; Jiravanichpaisal és mtsai., 2006).

1.2.1. A humorális immunválasz folyamatai

A gazdaszervezet folyamatosan ki van téve a különböző patogének általi fertőzéseknek, melyek bejuthatnak a tápcsatornán, a tracheán, vagy a kutikulán keresztül. A baktériumokkal és gombákkal szemben az első, mechanikai védelmi vonalat, a testet borító kitin kutikula képezi. A kutikula sérülése következtében azonnali, lokális immunválasz alakul ki. Ez a folyamat később a kórokozók túlélése esetén szisztémássá alakulhat, és a sejt-közvetítette valamint a humorális immunreakciók szoros együttműködésével valósul meg. A sérülés helyén gyülekező vérsejtek elindítják a sebgyógyuláshoz szükséges koagulációs és melanizációs folyamatokat. [Nehme és mtsai., 2007; Stramer és Dionne, 2014; Theopold és mtsai., 2002, 2004, 2014]. A szekretált vagy a membránhoz kötött receptorok felismerik a patogének specifikus antigénjeit, ami jelátviteli utak beindításához vezet a vérsejtekben és a zsírtestben. Az egysejtű patogénekkel szemben két fő szignalizációs útvonal aktiválódik: a Toll és az Imd [De Gregorio és mtsai., 2002, Engstrom és mtsai., 1993; Ip és mtsai., 1993; Dushay és mtsai., 1996; Lemaitre és Hoffman, 2007], míg szeptikus sérülés és vírusfertőzés során a JAK/STAT útvonal is hozzájárul az immunválasz kialakításához [Boutros és mtsai., 2002].

A Toll útvonal szerepét elsőként a hát-hasi (dorso-ventralis) tengely kialakításában írták le a *Drosophila* embrionális fejlődése során [Anderson és Nüsslein-Volhard, 1984]. A jelátviteli útvonalat többnyire a Gram-pozitív, lizin-típusú peptidoglikánnal rendelkező baktériumok, valamint a gombák aktiválják (2. ábra). Az Imd [Georgel és mtsai., 2001] jelátviteli útvonal legfőbb aktivátorai a diaminopimelinsav-típusú (DAP-típusú) peptidoglikánok, amelyek a Gram-negatív, valamint egyes Gram-pozitív baktériumok sejtfalának alkotóelemei (*Bacillus* és *Listeria* génusz) (2. ábra) [Leulier és mtsai., 2003; Neyen és mtsai., 2012]. Az aktiválódott NFκB-szerű (Dorsal, Dif és Relish) transzkripciósfaktorok antimikrobiális peptideket (AMP) kódoló géneket aktiválnak, majd az újonnan szintetizálódott nagy mennyiségű antimikrobiális fehérje (Drosomicin, Diptericin) a hemolimfába szekretálódik és ott a fertőző ágensek elpusztításához járul hozzá. A legtöbb azonosított AMP támadáspontja a bakteriális sejtmembrán, ahol ioncsatornákhöz hasonló szerkezeteket hoznak létre és felborítják a kórokozók ionegyensúlyát, ami annak elpusztulásához vezet [Sharma és mtsai., 2015].



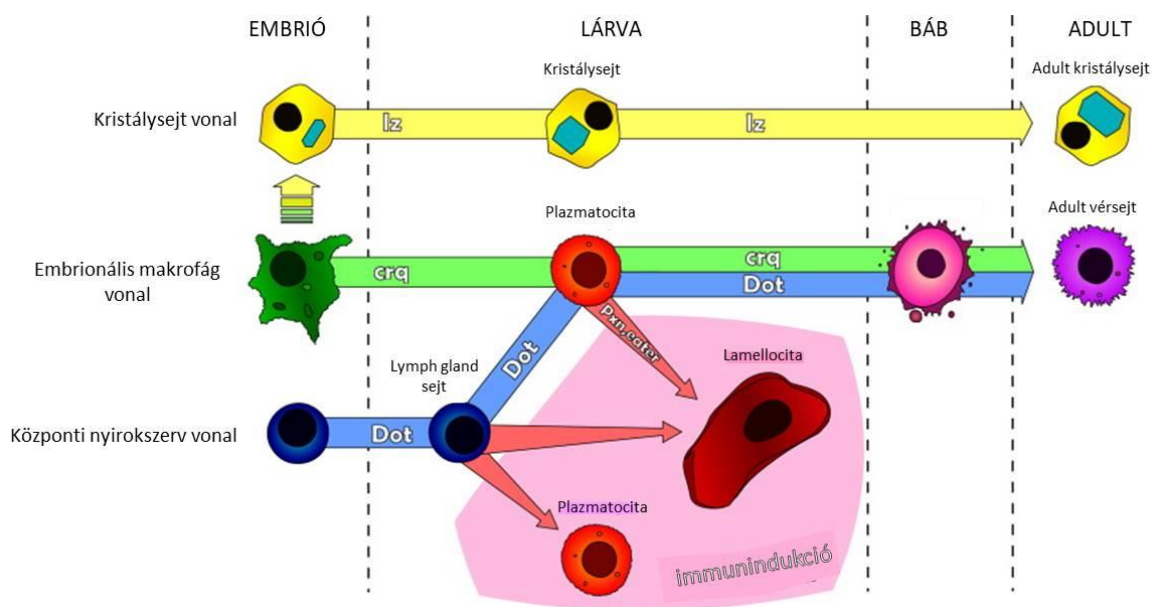
2. ábra A Toll és Imd útvonalak. [Lemaitre és Hoffman 2007 alapján]

1.2.2. A *Drosophila melanogaster* vérsejtjei és vérsejtképző kompartmentumai

A sejt-közvetítette immunválasz effektor sejtjei, a vérsejtek, a *D. melanogaster* teljes életciklusában jelen vannak. A gerincesekhez hasonlóan vérsejtképző kompartmentumokban osztódnak és differenciálódnak (Lanot és mtsai., 2001; Márkus és mtsai., 2009). A különböző fejlődési szakaszokban más-más veszélynek van kitéve a rovar, így a vérsejtek és azok funkciója is eltérő az embrió, lárva, báb és kifejlett rovar esetében.

Embrió stádiumban a mezoderma feji (procefalikus) és laterális (kardiogén) szegmensében kezdődik a vérsejtek differenciálódása és ezen leszármazási vonalakból erednek a későbbi fejlődési stádiumok speciális effektor hemocitái (3. ábra). A procefalikus régióban embrionális makrofágok és kristálysejtek differenciálódnak. A makrofágok elsődleges funkciója az apoptotikus sejtek és sejtörmelékek eliminálása, ami elengedhetetlen az idegrendszer megfelelő struktúrájának kialakulásához [Tepass és mtsai.,

1994; Evans és mtsai., 2010], emellett extracelluláris mátrix fehérjét termelnek. Az embrionális kristálysejtek funkciója nem ismert. A laterális mezodermából az embrionális központi nyirokszerv differenciálódik, ami ebben a stádiumban még csak néhány sejtből, fagocita- és kristálysejt prekursorokból áll (Lebetsky és mtsai., 2000; Mandal és mtsai., 2004).



3. ábra A *Drosophila melanogaster* különböző véresejt-leszármazási vonalából származó effektor hemociták a fejlődési stádiumokban. [Honti és mtsai., 2014. alapján]

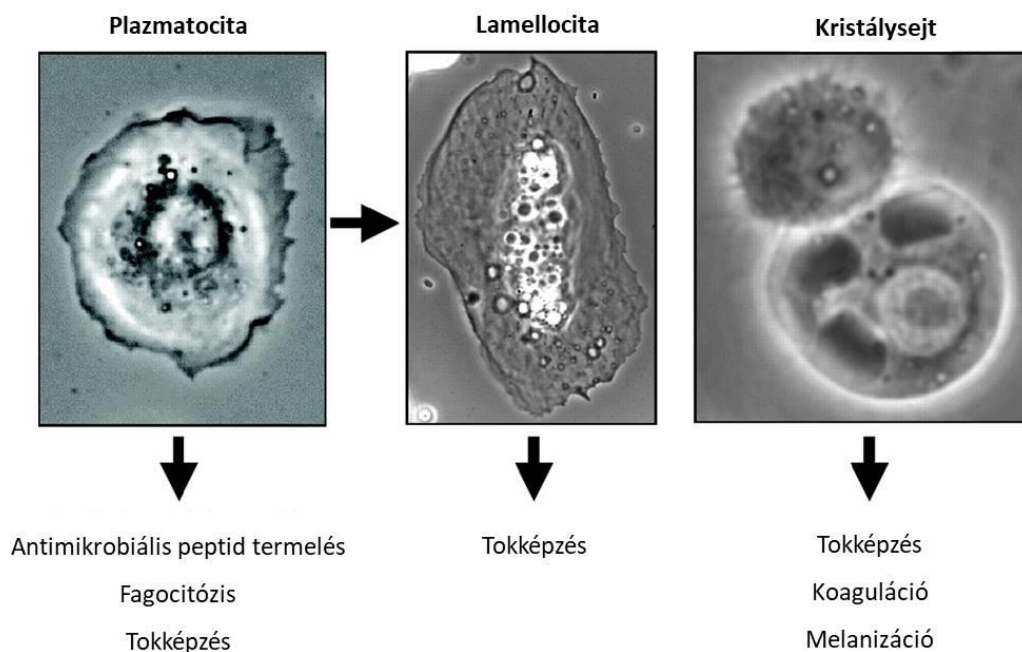
Az ecetmuslica véresejtképződése szempontjából a lárva stádium a legjobban jellemzett. A *D. melanogaster* lárva sejt-közvetítette immunválaszában három morfológiailag és funkcionálisan is eltérő véresejttípus vesz részt.

A plazmatociták az embrionális makrofág vonalból származnak (3. ábra). Kerek, 8-10 μm átmérőjű sejtek, melyek a keringő hemociták nagyjából 95 százalékát teszik ki [Rizki, 1957] (4. ábra). Ezek a sejtek - a gerinces makrofágokhoz hasonlóan - fagocitálják a sejtől kisebb testidegen anyagokat és az apoptotikus sejttermeléket. Extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék szekréciója révén minden fejlődési stádiumban aktívan részt vesznek a szöveti átrendeződésekben, és a sebgyógyulásban is fontos szerepük van [Wood és Jacinto, 2007; Martinek és mtsai., 2008]. Ezen kívül antimikrobiális peptideket termelnek, melyeknek a betolakodók lokális elpusztításában lehet szerepe, illetve olyan jelmolekulaként szolgálhatnak, melyek aktiválják a Toll és Imd útvonalakat, így kialakítva a szisztémás immunválaszt. Aktívan osztódó sejtek, számuk a lárvastádiumok folyamán jelentősen megnő [Holz és mtsai., 2003; Leitão és Sucena, 2015; Makhijani és mtsai., 2011].

A vérsejtek, a nem fagocitálható mérettartományú idegen testeket a tokképző reakció során pusztítják el. A plazmatociták a folyamat inicializálásában vesznek részt. A folyamat elején kitapadnak a testidegen részecskéhez, melyen egybefüggő sejtréteget alakítanak ki.

A keringésben sokkal kisebb számban (5%) található meg a kristálysejtek, amelyek szintén kerek morfológiájú, 10-12 μm átmérőjű sejtek. A citoplazmájukban profenoloxidáz-kristályokat tartalmaznak [Rizki és Rizki, 1959], melyek immunindukciót követően a sejtekből a hemolimfába jutnak és aktiválódnak. Az aktivált fenoloxidáz a fenolokat kinonokká alakítja, és beindítja a melanizációt. A melanizáció során keletkező reaktív oxigéngyökök hozzájárulnak a sikeres immunválaszhoz (4. ábra).

A harmadik típusú effektor sejtek a lamellociták, amelyek 40-50 μm átmérőjű, kiterült sejtek (4. ábra). A késői harmadik stádiumú lárvák keringésében, a naiv állatban is megfigyelhetők, de nagy mennyiségben parazitoid darázsfertőzést követően differenciálódnak [Nappi, 1973; Rizki és Rizki, 1992], illetve különböző tumoros mutásokban (pl.: *l(3)mbn-1*) is megfigyelhetők. A lamellociták a plazmatocitákkal együtt többrétegű tokot képeznek a parazitoid pete körül, mely később melanizálódik [Nappi, 1973; Williams és mtsai., 2005]. A reaktív oxigén- (ROS) és nitrogén származékok (RNS) megnövekedett koncentrációja valamint a tápanyagtól való elzárttság a parazitoid pete elpusztulásához vezet [Nappi, 1973, 2005].



4 ábra A *Drosophila melanogaster* lárvális vérsejtjei és az immunválaszban betöltött szerepük.
[Fauvarque és Williams, 2011. alapján]

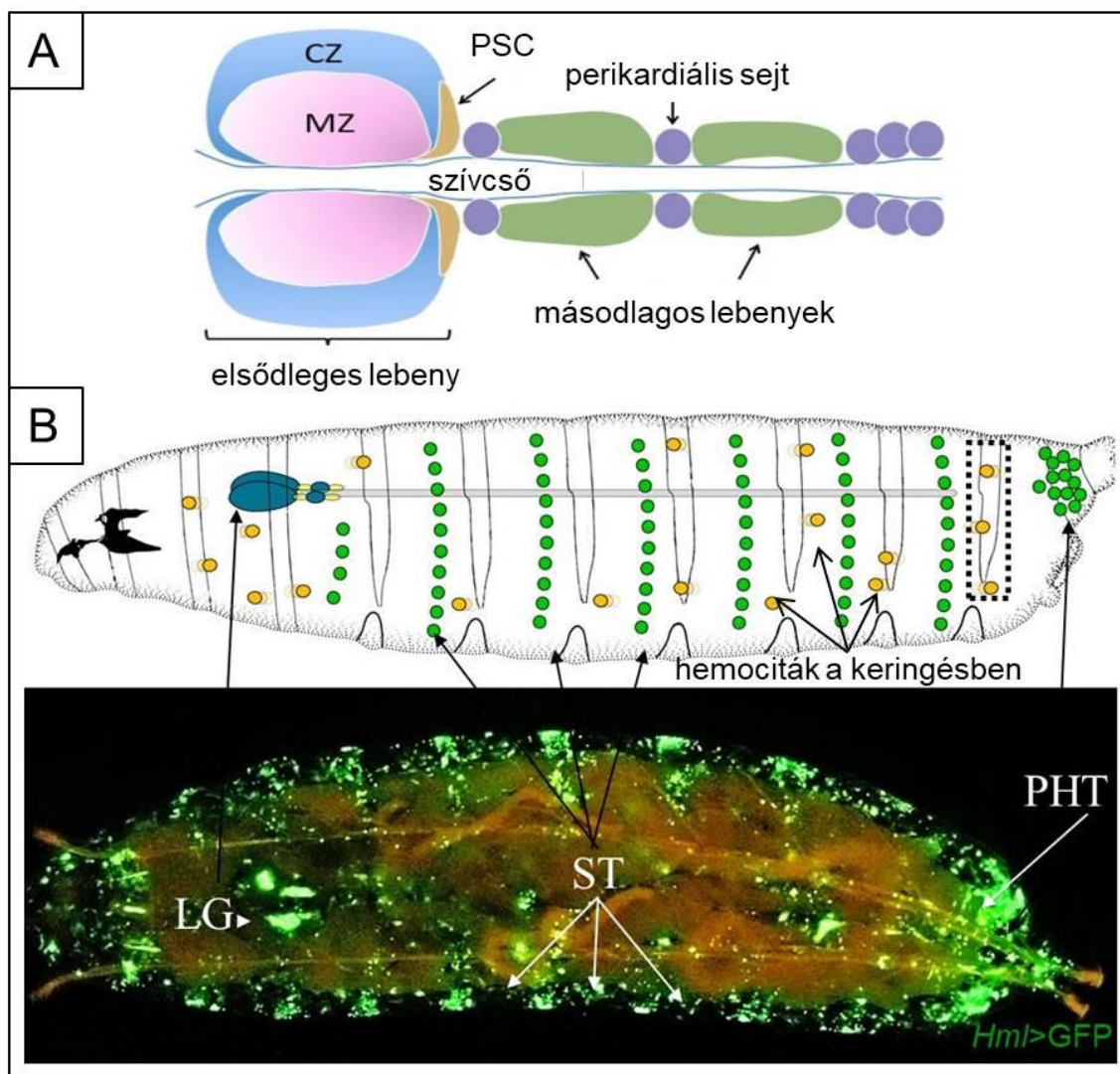
Az *ecetmuslica* vérsejtjeinek egy része szabadon áramlik a hemolimfában. Az áramlást a szívcső biztosítja, mely a lárva poszterior régiójából anterior irányba pumpálja a hemolimfát [Tao és Schulz, 2007] (5. ábra A). A lárvában három vérsejtképző kompartmentum különíthető el: a keringés, a központi nyirokszerv és a szesszilis vérképző szövet [Lanot és mtsai., 2001; Zetervall és mtsai., 2004] (5. ábra).

A keringésben áramló sejtek aktívan osztódnak a lárvastádiumok során. Parazitoid darázs fertőzést követően, a plazmatociták és a kristálysejtek mellett újonnan differenciálódott sejtek, a lamellociták jelennek meg. [Sorrentino és mtsai., 2002; Márkus és mtsai., 2009; Honti és mtsai., 2010].

A központi nyirokszerv (lymph gland) a szívcső anterior szakaszán elhelyezkedő, páros, lebenyes vérsejtképző szerv (5. ábra A, B). A lebenyek között és a szívcső poszterior irányába perikardiális sejtek találhatóak [Röhrborn, 1961] (5. ábra A). A központi nyirok szervet alkotó sejtek száma, a keringő sejtekéhez hasonlóan, a lárvális fejlődés során folyamatosan növekszik. Az elsődleges lebeny kérgi- (kortikális) és velő (medulláris) zónára tagolódik, és a hátsó, kitüntetett szereppel rendelkező része az ún. poszterior szignalizációs központ (PSC: Posterior Signalling Centre) [Jung és mtsai., 2005; Krzemien és mtsai., 2007] (5. ábra A). A kortikális zónát differenciálódott effektor sejtek alkotják, míg a medulláris zónában éretlen prohemociták találhatóak, amelyek érésük és differenciálódásuk során a kérgi zónába jutnak. Ezt a folyamatot a PSC szabályozza [Krzemien és mtsai., 2010; Lebestky és mtsai., 2003]. A PSC-t alkotó sejtek nyúlványokat bocsátanak a medulláris zónába és szignálmolekulákat juttatnak az ott található prohemocitákhoz [Mandal és mtsai., 2007]. Ilyen szignálmolekula például a Hedgehog (Hh) fehérje, amely a medulláris zóna sejtjeinek prohemocita állapotát tartja fenn vagy a Collier (Col) fehérje, ami az emlősök korai B-sejt faktorának (EBF: early B cell factor) *Drosophila* homológja és hiánya a központi nyirokszerv sejtjeinek korai differenciálódásához vezet [Croizatier és mtsai., 2004; Krzemien és mtsai., 2007].

A szesszilis vérsejtképző szövet a lárva testüregének falához tapadó és onnan időszakosan kilépő vérsejtekből áll [Zetervall és mtsai., 2004; Márkus és mtsai., 2009], szerkezete sávos mintázatot mutat (5. ábra B). A szesszilis szövet része a PHT (poszterior vérképző szövet), mely a lárva poszterior végén található vérsejtcsoport [Kurucz és mtsai., 2007] (5. ábra B). Ez a vérsejtképző kompartmentum akár mechanikai behatások révén is felbomolhat, illetve immunindukciót követően is leválnak innen vérsejtek [Márkus és mtsai., 2009; Makhijani és mtsai., 2011]. Ezért az intakt szesszilis szövet megfigyelésére

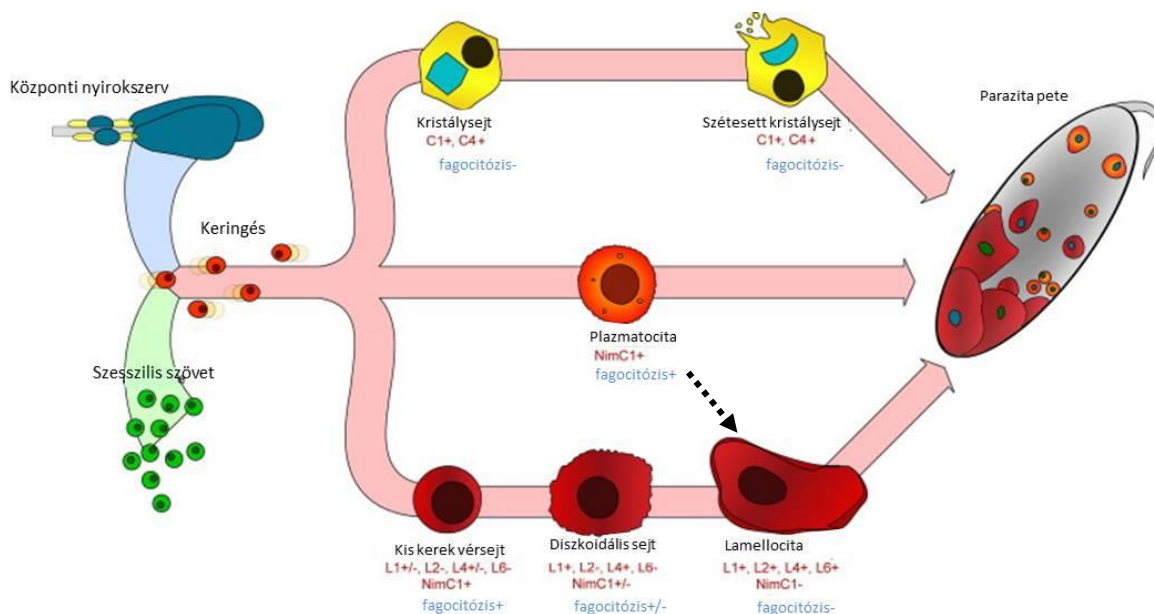
leginkább az élő állatban van lehetőség, például a vérsejt specifikusan GFP-t kifejező lárvákban (5. ábra B).



5. ábra A *Drosophila melanogaster* vérsejtképző kompartmentumai. A központi nyirokszerv felépítése (A). CZ: kortikális zóna, MZ: medulláris zóna, PSC: poszterior szignalizációs központ [Seung-Hye Jung és mtsai. 2005. alapján]. A lárva vérsejtkompartmentumai sematikus rajzon és az élő *Hml>GFP* transzgenikus egyedben (B). LG: központi nyirokszerv, ST: szesszilis szövet, PHT: poszterior vérképző szövet. [Dr. Csordás Gábor és Dr. Márkus Róbert ábrái alapján].

Csoportunk korábbi eredményei alapján ismert, hogy a naiv lárva keringésében és a szesszilis szövetben a feji mezoderma két leszármazási vonalából, a kristálysejt leszármazási vonalból (*lz*: *lozenge*) és az embrionális makrofág vonalból (*crq*: *croquemort*) származó plazmatociták és kristálysejtek vannak jelen (3. ábra). Az embrionális központi nyirokszervből származó sejtek a lárva stádium során sem hagyják el a központi nyirokszervet. Immunindukciót követően azonban mindhárom vérsejtképző kompartmentumban differenciálódnak a tokképzés effektor vérsejtjei és együttesen

vesznek részt a parazitoid darázs petéje körüli tok képzésében [Honti és mtsai., 2010] (6. ábra). A parazitoid fertőzés hatására, a korábban terminálisan differenciálódott sejtként leírt fagocitáló plazmatociták képesek lamellocitává alakulni (6. ábra) [Honti és mtsai., 2010, 2014].



6. ábra Az ecetmuslica mindhárom vérsejtképző kompartmentuma hozzájárul a parazitoid darázs elpusztításában szerepet játszó vérsejtek differenciálódásához immunindukciót követően. [Honti és mtsai., 2014. alapján]

Az egyedfejlődés további szakaszában, a bábozódás során a lárvális szövetek felbomlanak. A makrofágok, a keletkező nagy mennyiségű apoptotikus sejttermelék fagocitálják, illetve részt vesznek a sebgyógyulásban is [Sander és mtsai., 2013]. Báb stádiumban ismert vérképző szövet nincs.

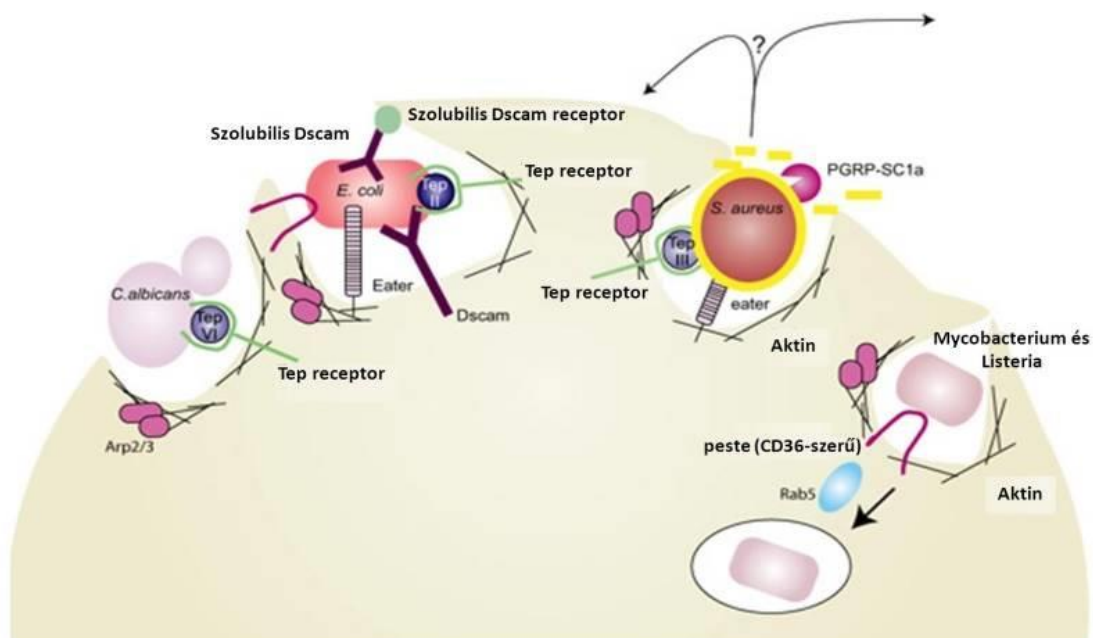
A kifejlett ecetmuslica keringő vérsejtjeinek 99%-a plazmatocita, 1%-a kristálysejt, ebben a stádiumban tokképző lamellociták nincsenek jelen. Ghosh és munkatársai ugyan leírtak egy speciális vérképző szövetet a potroh dorzális részén [Ghosh és mtsai., 2015], de az adultban az aktív vérsejtképzés meglete vitatott. Az erre irányuló vizsgálatok nagy részében, immunindukciót követően sem figyeltek meg újonnan differenciálódó hemocitákat [Bosch és mtsai., 2019].

1.2.3. A sejt-közvetítette immunválasz folyamatai

1.2.3.1. A baktériumok és gombák eliminálása: a fagocitózis

A fagocitózis a legősibb sejt-közvetítette immunfolyamatnak tekinthető. Már a primitív gerinctelenek esetében is jelen vannak makrofágszerű sejtek, amelyek a sejtörmelékek és az extracelluláris kórokozók bekebelezését végzik. [Ulvila és mtsai., 2011]. A fagocitózis első lépése, a testidegen részecskék felismerése és megkötése, a plazmatociták sejtfelszíni receptorai, az ún. mintázat felismerő receptorok (PRR) révén valósul meg. Ezek evolúciósan erősen konzervált és a patogénekre általánosan jellemző molekuláris mintázatokat (PAMP) ismernek fel [Kurata, 2014]. A felismert ligandok lehetnek a bakterális sejtfal esszenciális alkotóelemei (lipopoliszacharid, lipoteikolsav, peptidoglikán) vagy a gombákra specifikus mintázatok (β -1,3-glükán). A felismerést és megkötést követően a plazmatociták, a plazmamembrán egy részének betűródése révén, bekebelezik a fagocitálandó részecskéket (endocitózis), és kialakul a fagoszóma. Ezt követően a felvett részecskék a fagolizoszómákba kerülnek, végül a lizoszómákban lebomlanak. *Drosophilában* többféle fagocitózis receptor ismert, melyek eltérő szerkezetűek és más-más ligandot ismernek fel. Megkülönböztetünk peptidoglikán felismerő receptorokat (peptidoglycan recognition proteins, PGRP) [Yoshida és mtsai., 1996; Kang és mtsai., 1998], mint pl: a PGRP-LC, ami a Gram-negatív *Escherichia coli* baktérium felismerésében vesz részt és ezáltal az Imd útvonalat aktiválja (7. ábra). Egy másik receptor családdhoz tartoznak az EGF (epidermal growth factor) doménhez hasonló NIM domént tartalmazó receptor fehérjék, mint az Eater [Kocks és mtsai., 2005], a Draper [Hashimoto és mtsai., 2009; Manaka és mtsai., 2004] és a NimC1 [Kurucz és mtsai., 2007b, Zsámboki és mtsai., 2013] receptorok, amelyek részt vesznek mind a Gram-negatív mind a Gram-pozitív baktériumok felismerésében. Ismertek még a nonaspanninok családjába tartozó transzmembrán fehérjék, mint a TM9SF1-TM9SF4 ezen kívül *Drosophilában* leírtak még két, a humán CD36-hoz hasonló receptor molekulát is: a Croquemort (CRQ), és a Peste [Franc és mtsai., 1999; Philips és mtsai., 2005] fehérjéket. Ismert szolubilis fehérje a *Drosophila* TEP (thiolester-containing protein), amely a felismerő receptor funkción kívül a baktériumok és gombák opszonizációjában fontos, ez által hozzájárul a fagocitózis hatékonyságához (7. ábra). A sikeres fagocitózishoz, a felismerésen és megkötésen kívül, a citoplazma nagymértékű átrendeződésére van szükség. Feltételezhetően a fagocitózis receptorok olyan koreceptorokkal lépnek kapcsolatba - mint

például a megkötésben is szerepet játszó integrinek -, amelyek a kis GTP-ázok (Rho, Rac1, Rac2) aktiválásán keresztül hozzájárulnak a sejtvázas átalakulásához. A kis GTP-ázok immunindukciót követően olyan sejtvázas-asszociált fehérjéket aktiválnak (Scar, Arp2/3), amelyek az előbb említett fagoszóma kialakításán kívül a vérsejtek morfológiai változását eredményezik.



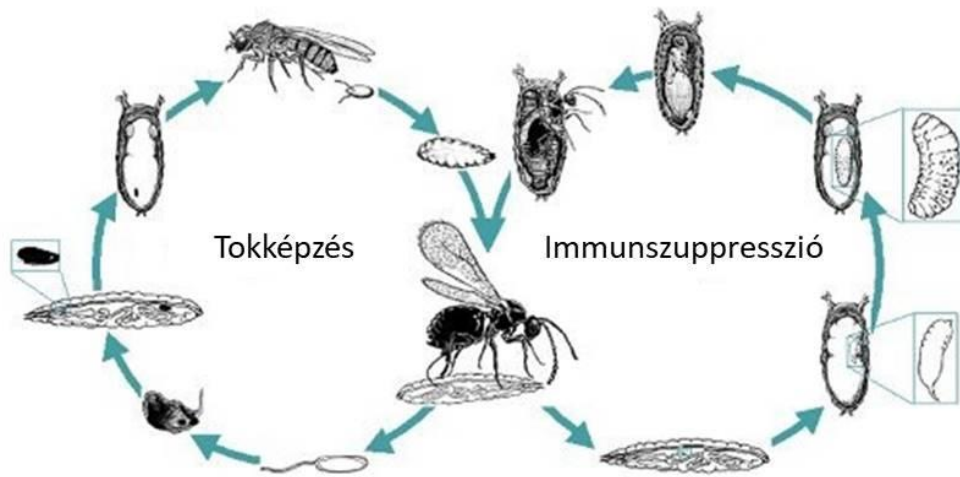
7. ábra A fagocitózisban szerepet játszó receptorok és a sejtvázas átalakításáért felelős fehérjék.

[Cherry és Silverman, 2006 alapján]

1.2.3.2. A parazitoid darázssal szembeni hatékony immunválasz: a tokképzés és a melanizáció

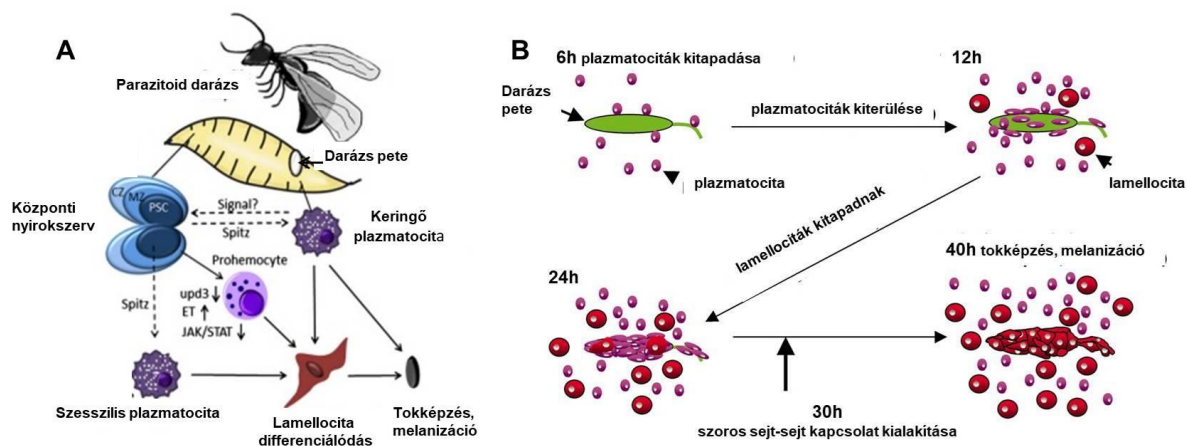
A gazdaszervezet a nagyobb méretű, nem fagocitálható testidegen részecskéket, a tokképzés során határolja el a test többi részétől. Ilyen részecskék lehetnek parazitoidok petéi és lárvái, különböző *Nematoda* fajok (pl.: *Howardula aoronymphium*) vagy megváltozott szerkezetű saját szövetek. A *Drosophila* leggyakoribb kártevői közé tartoznak a különböző parazitoid fürkészdarázs fajok, melyek közös jellemzője, hogy egyedfejlődésükhöz szükségük van egy gazdaszervezetre. A *Trichopria* nemzetség fajtái a muslica bábba helyezik petéiket, míg a *Leptopilina* és *Ganapsis* génusz képviselői a lárvastádiumban fertőzik a gazdát [Small és mtsai., 2012]. A darazsak a gazda lárvájának testüregébe helyezik petéjüket, és a kikelő darázs lárvája a gazda testéből táplálkozik. A darázsfertőzésnek két lehetséges kimenetele van. Amennyiben a gazda hatékony védekező mechanizmussal eliminálja a darázspetét, a *Drosophila* lárvája tovább fejlődik és bábbá,

majd adulttá vedlik (8. ábra). Ha azonban a gazda immunrendszere nem hatékony, a parazitoid elpusztítja, és a bábból darázs fejlődik ki (8. ábra). A koevolúció mindkét fél részéről különböző túlélési stratégiák kialakításához vezetett [Kraaijeveld és mtsai., 1998].



8. ábra A parazitoid darázsfertőzés lehetséges kimenetelei. [Small és mtsai., 2012. alapján]

Sikeres immunválasz esetén a *Drosophila* lárvát testidegen részecskéként érzékeli a parazitoid darázs petéjét és többretegű tokot képez körülötte [Nappi és mtsai., 2004] (9. ábra B). A parazitoid fertőzést követően lamellociták, - a tokképzés speciális effektorsejtjei - differenciálódnak a központi nyirokszervben, a szesszilis vérképző szövetben és a keringésben egyaránt [Carton és Nappi, 1997; Lanot és mtsai., 2001; Márkus és mtsai., 2009; Honti és mtsai., 2010; 2014] (8. ábra A). A lamellociták a plazmatocitákkal és a kristálysejtekkel együttműködve eliminálják a betolakodót. A tokképzés kezdeti lépése, a felismerés folyamata kevésbé ismert. A darázspete korion burkára elsőként, immunindukciót követően már 6 órával a plazmatociták tapadnak ki és szétterülnek annak felületén, majd szoros sejt-sejt kapcsolatokat (septate junction) alakítanak ki egymással [Williams, 2007] (9. ábra B). Ebben a folyamatban leírták, például az Nrg (Neuroglian) sejtmembrán fehérje rövid izoformájának szerepét. Ezt követően több rétegben lamellociták tapadnak a darázs petét beborító plazmatocita rétegre [Williams és mtsai., 2005; 2006]. A kitapadás során megváltozik a vérsejtek morfológiája és kitapadási képessége, melynek szabályozásában kis GTP-ázok vesznek részt (Rho, Rac1, Rac2) [Burridge és Wennerberg, 2004; Raftopoulou és Hall, 2004; Wertheim és mtsai., 2005; Williams és mtsai., 2005, 2006].

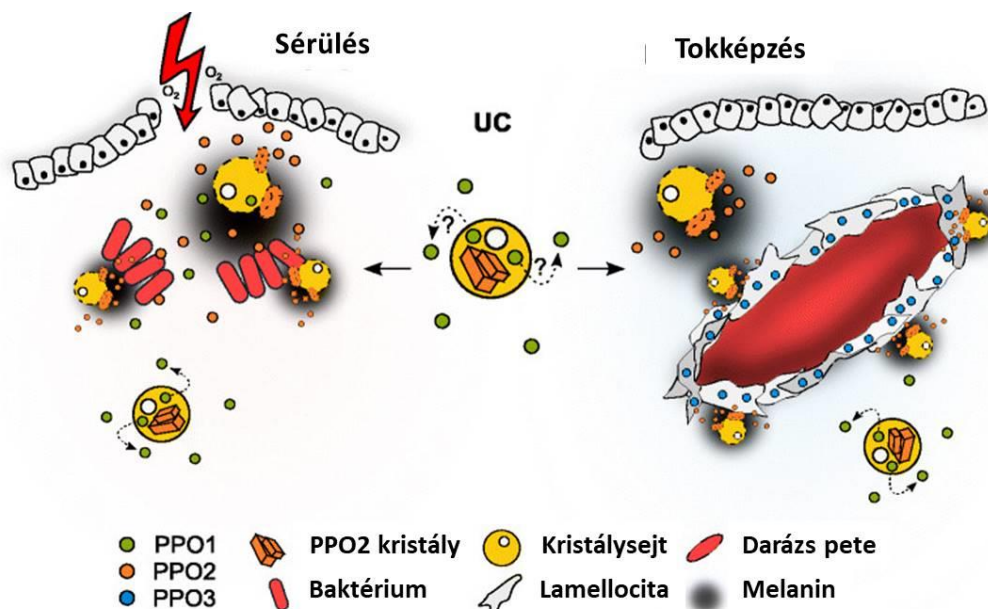


9. ábra A parazitoid darázsfertőzést követő folyamatok: lamellocita differenciálódás a különböző véresejtképző kompartmentumokban (A) és a tokképzés lépései (B). [Myllymaky és Ramet, 2014. (A) és Williams, 2007. (B) alapján]

A tokképzés utolsó szakaszában aktiválódik a melanizációs kaszkád, amelynek beindításában a *Drosophila* kis GTP-ázok mellett a JNK jelátviteli útvonalban résztvevő *Basket* (*Bsk*) és *hemipterous* (*hep*), valamint a TNF (tumor necrosis factor) homológ *Eiger* is szerepet játszik [Russo és mtsai., 1996; Bidla és mtsai., 2007] (9. ábra A).

A melanizációs folyamatoknak azonban nem kizárólag a tokképzésben van szerepük. A szeptikus sérülés, valamint a parazitoid darázsak általi fertőzés gyors melanin szintézist vált ki a sérülés helyén, lokálisan [Tang, 2009]. A melanizációs kaszkád reakciót gomba eredetű β 1,3-glükánok, valamint a baktériumok sejtfalában jelen lévő lipopoliszacharidok (LPS) és peptidoglikánok (PG) indítják be, illetve a reakció aktivátorai még a sérült szövetekből felszabaduló foszfolipidek is [Cerenius és mtsai., 2004; 2008]. A melanizációs kaszkád kulcsenzime a profenoxidáz, amely a sejtekből immunindukciót követően kiszabadul és a hemolimfában enzimatis hasítást követően aktív fenoxidázzá alakul. Ez az aktív forma a fenolokat kinonokká oxidálja, melyek ezután melaninná alakulnak és a sérülés helyén, valamint a parazitoid petéket körülvevő tokban halmozódnak fel [Cerenius és mtsai., 2004; 2008]. A melanizáció során citotoxikus molekulák, reaktív oxigén- és nitrogén intermedierek is képződnek, melyek mérgezőek a mikroorganizmusok számára, ezáltal hozzájárulnak a hatékony immunválasz kialakításához [Eleftherianos és Revenis, 2011]. A *Drosophila* genomja három profenoxidáz enzimet kódol. A *proPO54* gén által kódolt *proPO1* és a *proPO45* gén által kódolt *proPO2* a kristálysejtekben aktívak és a sérülés helyén végbemenő melanizációban játszanak szerepet. A *proPO59* által kódolt *proPO3* a lamellocitákban fejeződik ki és a tokképzés során lejátszódó melanizációs folyamatokban vesz részt (10. ábra) [Dudzik és mtsai., 2015; Irving és mtsai., 2005; Nam és mtsai., 2008]. Azonban a *Drosophila* *proPO* enzimek részlegesen átfedő szereppel

bírnak, hiszen a tokképzésben a kristálysejtek és a lamellociták is aktívan részt vesznek. A proPO1 és a proPO2 a kristálysejtek szétesése során jutnak ki a citoplazmából a hemolimfába, felszabadulásukat a c-Jun N-terminális kináz (JNK) szabályozza [Cerenius és mtsai., 2008]. A melanizáció során felszabaduló toxikus vegyületek a környező szöveteket is károsíthatják, ezért fontos, hogy ezen folyamatok lokálisan menjenek végbe. A kaskád aktiválódását specifikus szerin proteáz inhibitor fehérjék, a szerpinek, térben és időben szigorúan szabályozzák. Ilyen ismert fehérje *Drosophilában* a serpin27A, ami azt a profenoloxidáz aktiváló enzimet gátolja, amely inaktív profenoloxidázt aktív fenoloxidázzá alakítja, így biztosítva, hogy a toxikus melanin kizárólag a sérülés közelében termelődjön [Ligoxygakis és mtsai., 2002; DeGregorio és mtsai., 2002 Tang és mtsai., 2006].



10. ábra A sérülés és a parazitoid pete körül lejátszódó melanizációs folyamatok. PPO1,2,3: különböző profenoloxidázok.[Dudicz és mtsai., 2015. alapján]

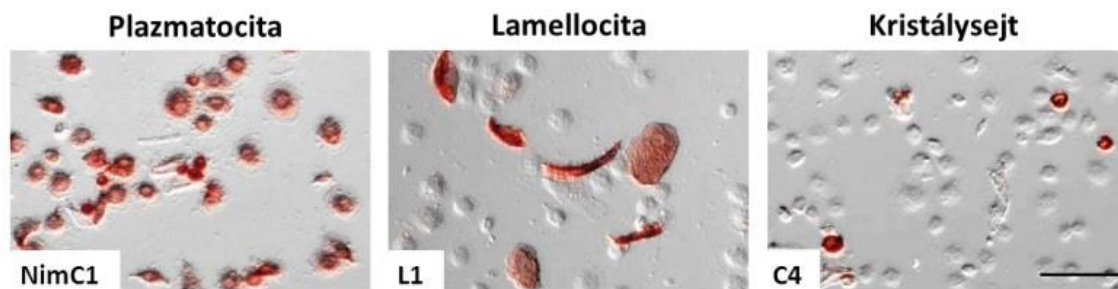
A fertőző darázs fajok különböző immunszuppresszív stratégiák és virulencia faktorok segítségével képesek elkerülni az immunválaszt [Prévost és mtsai., 2009; Small és mtsai., 2012]. Az *Asobara* fajok petéjének felszíne ragadós, szorosan a gazda szövetei közé tapad, ami által a gazdaszervezet hemocitái nehezebben tudják eliminálni [Kraaijeveld, 1998; Moreau és mtsai., 2003]. Egyes *Ganapsis* fajok a petével együtt egy SERCA típusú Ca-pumpát (sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase) injektálnak a lárva testüregébe, ami a citoplazmatikus Ca^{2+} szint csökkenését idézi elő. A Ca^{2+} -mediálta jelátviteli folyamatok hiányában elmarad a sikeres immunválaszhoz elengedhetetlen plazmatocita aktiváció, és a darázs kifejlődik. A *Leptopilina* fajok fertőzéskor a petével együtt

vírusszerű partikulumokat (VLP-virus like particles) is a gazdába juttatnak, amelyek hemocita deformációt okoznak, és így azok nem tudnak részt venni a tokképzésben [Rizki és Rizki, 1990]. A *Leptopilina boulandi* olyan fehérjét juttat a gazda szervezetébe (Rho-GAP homológ P4 fehérje), mely citoszkeletális átrendeződéseket okoz, ezen kívül a melanizációban szerepet játszó Rho-GTP-ázok működését gátolja [Zhang és mtsai., 2004]. A *Leptopilina heterotoma* által termelt vírusszerű részecskék (lamelloyysin) a lamellociták pusztulását okozzák, illetve megváltoztatják azok morfológiáját. A kiterült lamellociták helyett csökkent adhéziós képességű, elongált, orsó alakú sejtek keletkeznek, melyek nem tapadnak ki a darázs petére. [Ritzki és Ritzki, 1984; 1990a; 1990b; 1994]. A *Leptopilina victorae* toxinja a lamellociták sejt-sejt kapcsolatainak kialakulásához szükséges membrán fehérjék N-glikozilációját gátolja [Mortimer és mtsai., 2012].

1.3. A *Drosophila* vérsejtek vizsgálatának lehetőségei

1.3.1. Vérsejt-specifikus molekuláris markerek használata

A laboratóriumunkban előállított vérsejt-specifikus immunológiai markerrendszer segítségével elkülöníthetők és jellemezhetők a *Drosophila melanogaster* hemocita alpopulációi [Kurucz és mtsai., 2007b]. A markerek segítségével nyomonkövethetőek a lárva különböző hematopoetikus kompartmentumában jelen lévő és differenciálódó vérsejtek, a naiv állatban és darázzsal történő immunindukciót követően egyaránt. Leírtak olyan antigéneket, amelyek minden lárvális vérsejten jelen vannak (H antigen klaszter). Ezek közül a H2 aminosav szekvenciájának meghatározásával sikerült azonosítani a Hemese fehérjét [Kurucz és mtsai., 2003] (11. ábra). A P antigének plazmatocita-specifikusan fejeződnek ki. A P1 antigént NimC1 fehérjeként azonosították laboratóriumunkban, és a fagocitózis során a baktérium kötésében írták le szerepét [Kurucz és mtsai., 2007a, Zsámboki és mtsai., 2013]. Az L antigéneket kizárólag a lamellociták fejezik ki. Az L1 antigen aminosav sorrendjének azonosítása után, az Atila nevet kapta (11. ábra). A kristálysejtekre a C antigen-klaszter specifikus kifejeződése jellemző. A C1 markert felismerő 12F6 monoklonális ellenanyag a kristálysejtekben kifejeződő profenoloxidáz enzimet ismeri fel [Willott és mtsai., 1994], míg a C4 markert laboratóriumunkban azonosították, és kifejeződését a kristályok felszínén figyelték meg [Kurucz és mtsai., 2007b] (11. ábra).

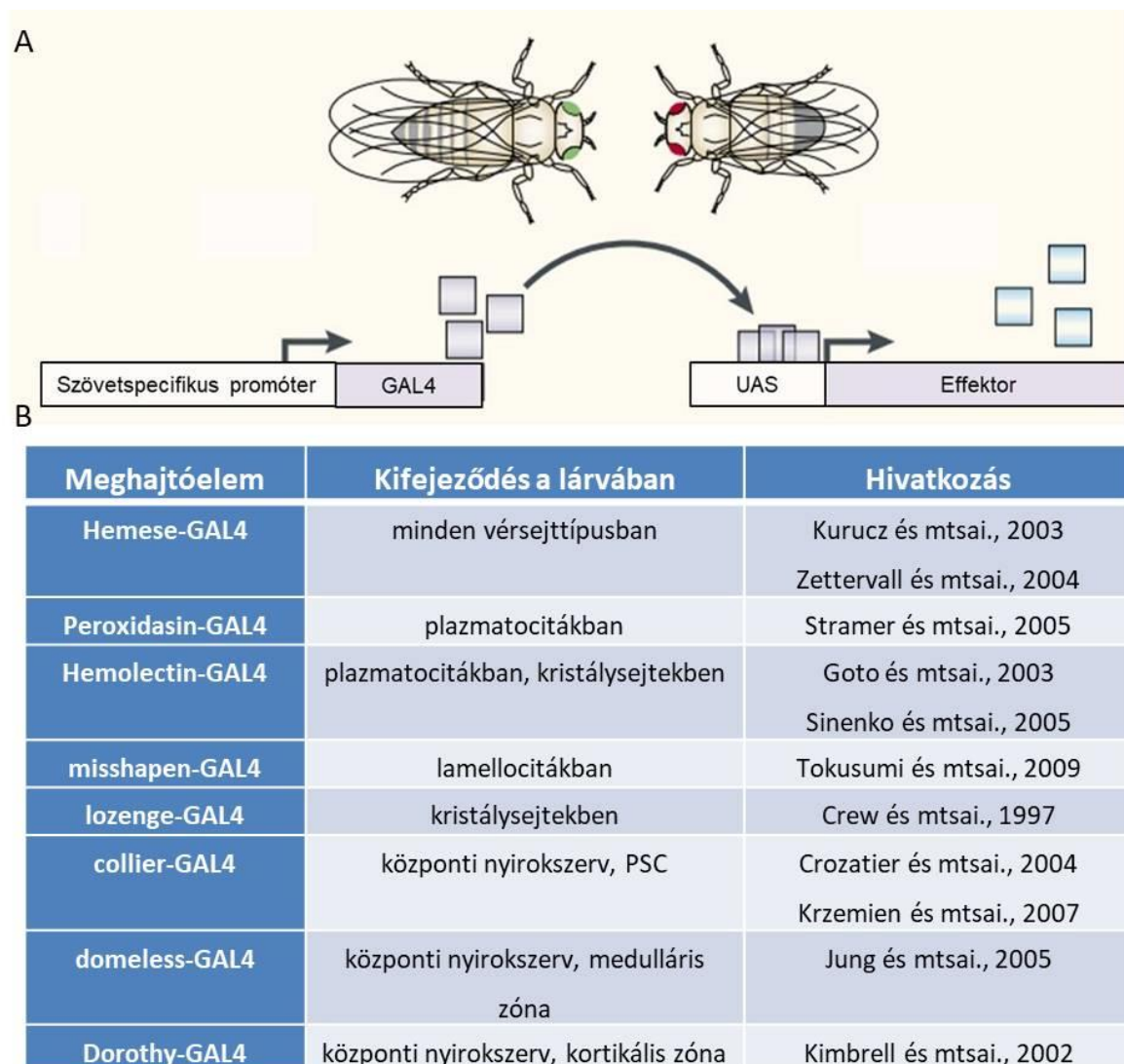


11. ábra A *Drosophila melanogaster* vérsejt-alpopulációi immunológiai markerek alapján. NimC1: plazmatocita-specifikus, L1: lamellocita-specifikus, C4: kristálysejt-specifikus markerek.

[Kurucz és mtsai., 2007. alapján]

1.3.2. Vérsejt-specifikusan kifejeződő *in vivo* riportererek alkalmazása

Az ecetmuslica hemocita-specifikus markereinek fehérje, illetve génszintű azonosítása lehetőséget adott olyan transzgenikus vonalak létrehozására, amelyek vérsejt-specifikusan *in vivo* (pl.: GFP) riportert fejeznek ki. Ezek segítségével vizsgálhatóvá váltak a különböző sejtípusok és vérsejtképző kompartmentumok az élő állatokban is. A transzgének lehetnek a promóter által közvetlenül meghajtott riporter konstrukciók, de az ecetmuslica esetében a leggyakrabban használt transzgenikus vizsgálati módszerek a GAL4/UAS rendszerre épülnek (12. ábra A). A módszer segítségével szövet- és sejt-specifikusan túltermeltethetők, illetve csendesíthetők olyan faktorok, melyeknek feltételezhetően szerepük van az immunválaszban [Kakidani és Ptashne, 1988; Webster és mtsai., 1988; Brand és Perrimon, 1993] (12. ábra B).

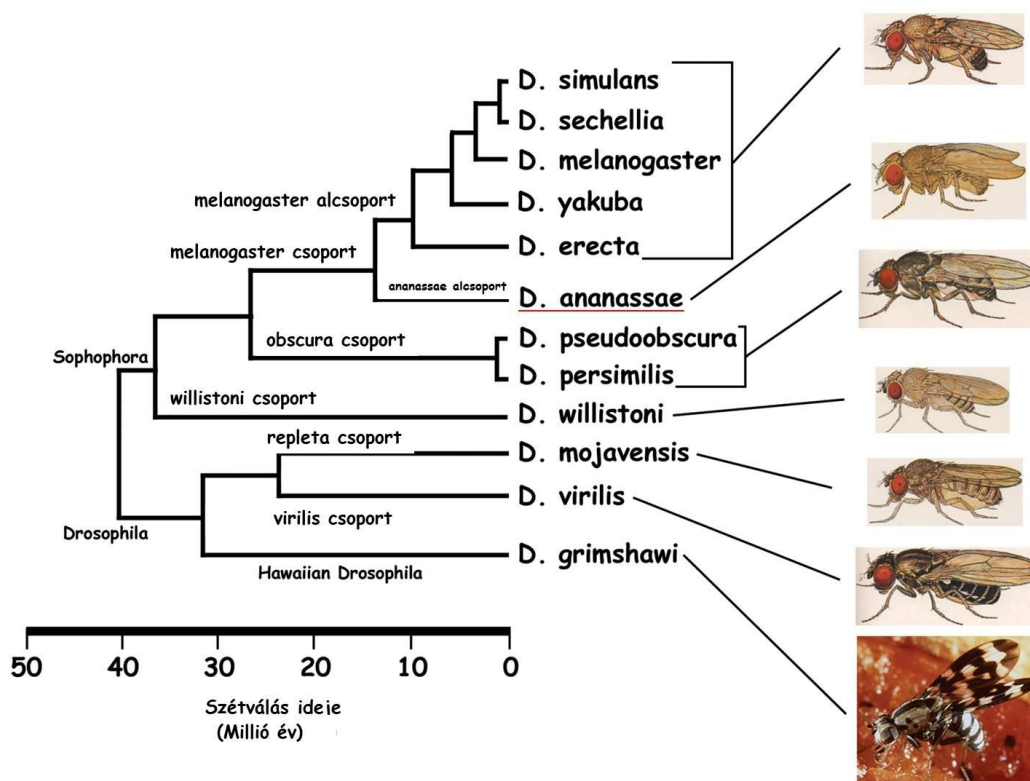


12. ábra A Gal4-UAS rendszer működése (A) és néhány vérsejt-specifikus, illetve vérsejtképző kompartmentum specifikus meghajtóelem (B). [A: Wimmer, 2003. alapján; B: az ábra jobb oldali oszlopában felsorolva]

1.4. A *Drosophila ananassae*, mint modellszervezet

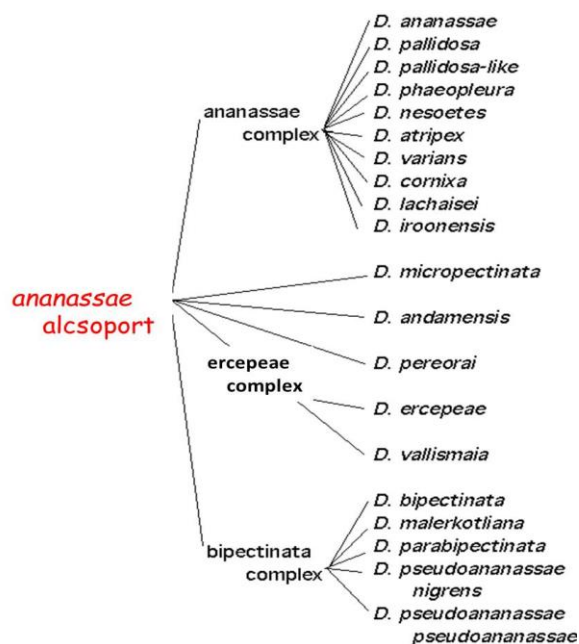
A *Drosophila* nemzetség, több mint 1500 fajt számláló [Singh, 2013] csoportjának legismertebb képviselője a *Drosophila melanogaster*. Számos genetikai, viselkedés- és evolúció biológiai, molekuláris biológiai, ökológiai és populációgenetikai vizsgálatban használják modellszervezetként [Singh és Yadav, 2015]. Azonban az 1930-as évektől kezdve a génusz további képviselői is a kutatók érdeklődésének középpontjába kerültek. Ezen fajok közül a *Drosophila ananassae*, néhány különleges tulajdonsága miatt vált kiemelkedővé.

A faj a *melanogaster* csoport, *ananassae* alcsoportjának *ananassae* fajkomplexéhez tartozik. Különlegessége, hogy filogenetikailag egy különálló ágat képezi a *Drosophila* nemzetségnek [FlyBase; *Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007; Singh, 2000, 2010.] (13. ábra).



13. ábra A 12 ismert genomszekvenciával rendelkező *Drosophila* faj. [http://arthropods.eugenes.org]

Teljes genomszekvenciáját egy átfogó konzorcium keretein belül 2007-ben határozták meg (13. ábra). Az *ananassae* alcsoport 22 fajt számlál és ezek három komplexbe sorolhatóak: *ananassae*, *biplectinata*, *ercepeae* komplexekbe [Matsuda és mtsai., 2009] (14. ábra). A leginkább tanulmányozott faj, a csoport névadó faja, a *Drosophila ananassae*, amit elsőként Doleschall írt le 1858-ban az indonéziai Ambom szigeten. A faj Indiából származik, de mára kozmopolita elterjedésűvé vált.



14. ábra Az *ananassae* alcsoport képviselői [FlyBase.org alapján]

izolált populációi, emiatt a populációgenetikai és molekuláris variabilitási kutatások kedvelt modellszervezete. Laboratóriumi fiziológiás és tartási igényei nagyon hasonlítanak a *D. melanogaster*éhez. Az első “curved wing” mutációt 1921-ben Sturtevant azonosította egyes egyedekben, majd 1938-ig két japán kutató, Moriwaki és Kikkawa több, mint 100 mutációt írt le a fajban [Kikkawa 1938; Tobari 1993]. Ők egymástól függetlenül azonosították a faj néhány egyéb, különleges tulajdonságát: spontán rekombináció a hím egyedekben, magas mutációs ráta és gyakori kromoszóma inverziók.

Szintén egyedülálló az ún. *Om-tom* (‘Ophic Morphology’ hypermutability system) rendszer, ami nevét a szinte kivétel nélkül a szem morfológiáját érintő mutációkról kapta (*Om* mutations), amelyeket a *tom* retrotranszpozon okoz [Tanda és mtsai., 1993; Juni és mtsai., 1996].

Futch a Csendes óceán déli részén élő izolált populációkon végzett fajkeletkezési vizsgálatokat, ekkor figyelte meg, és írta le a szűznemzés (parthenogenezis) jelenségét (1972.) *D. ananassa*énál. Az utóbbi években genomszekvenálási [Clark és mtsai., 2007; Signor és mtsai. 2013] és komparatív elemzések során számoltak be a fajról, többek között politén kromoszóma térképezési [Schaeffer és mtsai., 2008.] populációgenetikai [Schug és mtsai. 2007, 2008] és evolúciós vizsgálatokban.

Mindezek alapján elmondható, hogy a *D. ananassae* számos egyedi tulajdonsága miatt kedvelt modellorganizmusa a genetikai, viselkedési, evolúciós fajkeletkezési és ökológiai vizsgálatoknak. Genomszekvenciájának meghatározása tovább bővítette a lehetséges kutatási irányokat és ma már leginkább a *Drosophila melanogaster*rel és a többi *Drosophila* fajjal összehasonlító vizsgálatokban használják. Ezt a megközelítést követve érdekes lehet a *D. ananassae* invazív terjeszkedésének és a parazitoidokkal szembeni ellenállóképességének hátterében álló esetleges alternatív vérsejtdifferenciálódási és tokképzési mechanizmusok felderítése. Ezen folyamatok megértéséhez nagyban hozzájárulhat a *D. ananassae* immunválaszának részletes vizsgálata, melyre mindeddig nem került sor.

2. Célkitűzések

Kísérleteink során célunk volt:

1. Különböző *Drosophila* fajok immunválaszának vizsgálata parazitoid darazsfertőzést követően. A lárvális vérsejtek jellemzése, különösképpen az *ananassae* alcsoportba tartozó *Drosophila ananassae* és *Drosophila bibectinata* fajokban.
2. A *D. ananassae* vérsejt-alpopulációk azonosítása és további részletes vizsgálata érdekében vérsejt-specifikus monoklonális ellenanyagok előállítása.
3. *In vivo* genetikai rendszer létrehozása, transzgenikus *Drosophila ananassae* vonalak előállításával.
4. A vérsejtek sejt-közvetítette immunválaszban betöltött szerepének azonosítása, differenciálódásuk nyomonkövetése a különböző vérsejtképző kompartmentumokban.
5. A parazitoid darazsakkal szembeni immunválasz hátterében álló mechanizmusok felderítése.
6. A vérsejtek szerkezeti jellemzése elektronmikroszkópia segítségével.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Anyagok

Drosophila Ringer oldat: 7,5g NaCl, 0,35g KCl, 0,21g CaCl₂, 1000ml dH₂O, pH 7,0

PBS: 0,13M NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM Na₂H₂PO₄, pH 7,2.

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

DAPI: 4'6'-diamidino-2-phenylindole (Sigma), 20 mg/ml 1:10000 0,1% PBS-BSA-ban

PTU: 1-phenyl-2-thiourea (Sigma)

BrdU: 5-bromo-2-deoxyuridine (Sigma-Aldrich)

L-NAME: N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (Sigma-Aldrich)

D-NAME: N_ω-Nitro-D-arginine methyl ester hydrochloride (Sigma-Aldrich)

L-Arginin: (S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid (Sigma-Aldrich)

D-Arginin: (R)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid (Sigma-Aldrich)

ECL Plusz Western blot detektáló reagens (GE Healthcare)

Előhívóoldat: 6 g Na₂CO₃, 40 µl 1% Na₂S₂O₃, 53 µl 35% formaldehid 100 ml desztillált vízben

FBS: fetal bovine serum (GIBCO)

HAT: 5 mM Hypoxanthine, 0,02 mM Aminopterin, 0,8 mM Thymidine (Sigma Aldrich)

PEG 1540: polyethylene glycol (Sigma Aldrich)

RPMI 1640: szövettenyésztő tápfolyadék (GIBCO)

KRPMI: RPMI 1640 szövettenyésztő tápfolyadék, 5% FBS, 2 mM glutamine, 100 µg penicilline, 100 µg streptomycin

Shneider's médium: szövettenyésztő tápfolyadék (Sigma Aldrich)

SDS mintapuffer: 15,6 mM Tris/HCl pH 6,8, 6,25% glycerol, 0,5% SDS, 0,003% bromophenol blue

TBS oldat: 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

Transzfer puffer: 25 mM Tris, 90 mM glycine, 20% methanol

Elektronmikroszkópos fixáló oldatok:

1. oldat: 6.4% formaldehyde (Polysciences), 1% glutaraldehyde (EM Grade, Polysciences), 4 mM CaCl₂ (Molar Chemicals), 2% saccharose (Molar Chemicals), 0.1 M Sodium-cacodylate (Sigma Aldrich)

2. oldat: 4% Tannic acid (Sigma Aldrich), 0.1 M Sodium-cacodylate pH 7.4).

DAF-FM DA: 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate (Sigma)

NI-DAB: 3,3' diaminibenzidine peroxidase substrate kit with Nickel, SK-4100 (Vector Laboratories)

3.2. Ellenanyagok:

4H1 [Márkus és mtsai. 2015.]

7C5 [Márkus és mtsai. 2015.]

L1 [Kurucz és mtsai. 2007.]

anti-Collier: egér monoklonális ellenanyag [Michele Crozatier]

phalloidin-Rhodamine (Invitrogen)

anti-tubulin (Invitrogen)

anti-BrdU-Alexa488 (anti-bromodeoxi-uridin egér monoklonális ellenanyag Alexa488-cal konjugálva) (Invitrogen)

anti-GFP (nyúl poliklonális ellenanyag) (Invitrogen)

anti-foszfohiszton H3 (nyúl poliklonális ellenanyag) (Sigma Aldrich)

anti-egér és anti-nyúl Alexa 488 (fluoreszcens festékekkel konjugált kecske Ig 1:1000) (Invitrogen)

anti-egér Alexa 568 (fluoreszcens festékekkel konjugált kecske Ig, 1:1000) (Invitrogen)

anti-egér CF568 (fluoreszcens festékekkel konjugált kecske Ig, 1:1000) (Invitrogen)

biotinilált kecske anti-egér IgG (DAKO, 1,46 mg/ml 1:500)

ABC (tormaperoxidázzal konjugált Avidine-Biotine Complex 1:500) (Vector Laboratories)

3.3. Felhasznált *Drosophila* törzsek

A kísérletekhez használt különböző *Drosophila* törzseket 25 C°-on, ecetmuslica táptalajon tenyésztettük. A kísérleteket 25 C°-on végeztük.

Felhasznált törzsek:

Drosophila melanogaster Oregon-R vad típusú törzs (Bloomington Drosophila Stock Center)

Drosophila ananassae k-aa131 white mutáns törzs (Kyorin-Fly SHIGEN)

Vad típusú *Drosophila ananassae*, *Drosophila bipectinata*, *Drosophila parabiopectinata*, *Drosophila malerkotliana*, *Drosophila pallidosa*, *Drosophila pseudoananassae* törzsek (UC San Diego Drosophila Stock Center)

Laboratóriumunkban létrehozott törzsek: *Hml*-GFP és *Pxn*-GFP transzgenikus *Drosophila ananassae* törzsek (Márkus és mtsai., 2015)

3.4. Felhasznált parazitoid darázsfajok

A felhasznált darazsakat *Drosophila melanogaster* Ore-R vad típusú legyek lárváin tartottuk fenn, a kikelést követően a darazsakat speciális tápon (100ml desztillált vízben oldott: 15g agar (Oxoid), 10g glükóz (Molar Chemicals) és 0,4 g metil-parahidroxibenzoát (Molar Chemicals)), 25 C°-on tartottuk. A darazsaknak kiegészítésként egy csepp mézet tettünk a fiolákba.

Kísérletekhez használt darázsfajok:

Leptopilina boulardi, törzs: G486 (Professor Yves Carton); *Leptopilina heterotoma*, törzs: Lh14 (Dr. Todd Schlenke); *Leptopilina victoriae*, törzs: LvUNK (Dr. Todd Schlenke).

3.5. *Drosophila ananassae* és *Drosophila bipectinata* vérsejt-specifikus monoklonális ellenanyagok előállítása

Nőstény, BALB/c egereket immunizáltunk három alkalommal, háromhetes intervallumban. Az immunizáció alkalmanként 10^6 vérsejttel történt, melyeket *Leptopilina boulardi* parasitoid darázzsal immunindukált *Drosophila ananassae* és *Drosophila bipectinata* lárvákból gyűjtöttünk, 72 órával a parazita fertőzést követően. Három nappal a harmadik immunizálást követően az egerek lépsejtjeit fúzionáltattuk Sp2/0 sejtekkel, polietilén glikol jelenlétében (PEG-1540). A hibridómákat HAT-ot tartalmazó médiumon növesztettük a Köhler és Milstein által kidolgozott módszer szerint [Köhler és Milstein, 1975]. A hibridóma klónok által termelt ellenanyagokat, acetonnal fixált *D. ananassae* és *D. bipectinata* lárvális vérsejt mintákon teszteltük, és ez alapján választottuk ki a különböző vérsejt-alpopulációkkal specifikusan reagálókat.

3.6. Transzgenikus vonalak előállítása *Drosophila ananassaeban*

Két PiggyBac alapú transzformációs vektort használtunk a klónozott promoter szakaszok expressziós mintázatának tesztelésére. A konstruktok előállításához a PB-iehr-

mCherry-EGFP plasmidot alkalmaztuk. *Hml* promóterként a *D. melanogaster Hml* gén start kódójától upstream elhelyezkedő 2952 bp szakaszt (3L:13836355–3L:13839307). használtuk. Ezt a PB-ihr-mCherry-EGFP plasmid *AscI-PmeI* (blunt) helyére, az EGFP gén elé klónoztuk. Az így létrehozott konstruktot *D. ananassae* transzgenikus vonalak létrehozására használtuk. A kísérleteinkben használt *Pxn* promoter a *D. ananassae Pxn* gén (GF10247) start kódójától upstream elhelyezkedő 1621 bp hosszúságú DNS szakasz (2R:9450688–2R:9452309) volt. Ezt szintén a PB-ihr-mCherry-EGFP plasmid *AscI-PmeI* (blunt) helyére klónoztuk. Mivel az első integrációt követően az *mCherry* és EGFP együttes detektálása nehézkesnek bizonyult, így a *Pxn*-promoter-EGFP-K10-polyA *AscI-FseI* szakaszt átklónoztuk a PiggyBac_PB vektor (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY515146>) *NheI* helyére. Ez a vektor *mini-white* marker gént tartalmaz az *mCherry* helyett. Az így kapott konstruktot használtuk *D. ananassae* transzgenikus vonalak létrehozására. Az előállított *Hml-GFP mCherry* és *Pxn-GFP mini-white* plazmidok térképe és szekvenciája megtalálható a Márkus és mtsai. 2015 kiegészítő (Supplementary) anyagában. A vektorokat a szükséges helper plazmidokkal együtt *D. ananassae* embriókba injektáltuk. Az injektált embriókból kikelő hím legyeket vad típusú illetve *white* mutáns *D. ananassae* szüzekhez kereszteztük. A beépüléseket az *mCherry* és a *mini-white* marker gének expressziója alapján detektáltuk. A homozigóta transzgenikus vonalakat úgy állítottuk elő, hogy a marker géneket erősen kifejező hím legyeket kereszteztük szűz nőstény legyekkel.

3.7. Indirekt immunfluoreszcencia

A lárvákat, PTU-t tartalmazó, komplett Schneider's médiumban bontottuk ki. A vérsejt preparátumokat acetonnal 6 percig vagy 2%-os paraformaldehiddel 12 percig fixáltuk és 0,1% BSA-t tartalmazó PBS-ben 20 percig telítettük. Kutikula preparátumok esetében 0.01% Triton-X100-zal egészítettük ki a telítő oldatot. A mintákat 60 percig, szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal. Ezt követően 3x5 percig mostuk 1xPBS-sel, majd a másodlagos ellenanyaggal 45 percig inkubáltuk. Ezt újabb 3x5 perc mosás követte, végül a mintákat Fluoromount G médiummal és fedőlemezekkel fedtük. A kísérleteket Zeiss Axioskope 2MOT epifluoreszcens mikroszkóppal és Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal értékeltük ki.

3.8. Western blot analízis

A mintákat 5-7,5%-os poliakrilamid-gélben futtattuk nem redukáló körülmények között. A fehérjéket polivinilidin fluorid (PVDF) membránra vittük át transzfer pufferben 30 V-on, 4°C-on, éjszakán át. A membránt 5% zsírmentes tejet tartalmazó TBS oldatban telítettük 60 percig, szobahőmérsékleten. Ezt követően a hibridóma felülűszókkal inkubáltuk rázatva 1,5 órán keresztül. Miután háromszor 10 percig mostuk TBS-sel, hozzáadtuk a HRPO konjugált anti-egér IgG másodlagos ellenanyagot. Három 10 perces TBS-es mosás után az előhívást ECL Plusz Western blot detektáló reagensekkel végeztük a gyártó utasításainak megfelelően, majd a reakciót röntgen filmen tettük láthatóvá.

3.9. A központi nyirokszerv vizsgálata

A központi nyirokszerv kibontásához a lárvák kutikuláját a hossz tengelyük mentén csipeszek segítségével felnyitottuk 5% FBS-t és PTU-t tartalmazó Schneider's médiumban, majd a zsírtestet eltávolítottuk. Ezután 2%-os paraformaldehiddel fixáltuk a mintákat 12 percig, majd 3x5 percig PBS-sel mostuk és 20 percig 0.01 % Triton-X100-at tartalmazó 0.1% BSA-PBS-sel telítettük. A mintákat a már leírt módon és ideig inkubáltuk az elsődleges és a másodlagos ellenanyagokkal és Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal értékeltük.

3.10. A vérsejtek kolhicinnel való kezelése, a sejtváz festése

Immunindukciót követően 96 órával a lárvákból nyert vérsejteket 12 lyukú lemezen (Hendley-Essex) 30 µl, 5% FBS-sel kiegészített, *Drosophila* Schneider's médiumban 10 percig tapasztottuk szobahőmérsékleten, ezután kolhicint tartalmazó (0.4 mg/ml) Schneider's médiumra cseréltük és így tapasztottuk további 45 percig. A mintákat 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 10 percig és 3x5 percig mostuk PBS-ben. Ezt követően 20 percig kezeltük metanollal a mintákat -20 C °-on, majd 1 órán keresztül telítettük 0.1% BSA-PBS-ben, szobahőmérsékleten. Az elsődleges ellenanyaggal (anti-tubulin) 1 órán át inkubált mintákat 3x5 percig mostuk PBS-ben, majd 45 percig inkubáltuk a másodlagos ellenanyaggal. A 3x5 perc mosást követően, a már leírt módon fedtük a lemezeket (SouthernBiotech).

3.11. A *Drosophila ananassae* lárvális vérsejtek magjainak megjelölése BrdU-val és a vérsejtek fúziójának ex vivo vizsgálata

A Bromodeoxi-uridinből egy 93mM-os etanolos törzsoldatot készítettünk, amit -20 C°-on tároltunk. *D. ananassae* adult legyeket, 25 C°-on, sötétben, 24 órán keresztül petéztettünk normál *ecetmuslica* táptalajt (kontroll), és ahhoz hozzáadott 1mM BrdU-t tartalmazó fiolákra. A második stádiumú lárvákat *L. bouardi* G486 parazitoid darázssal fertőztük, éjszakán át. Az immunindukciót követően 48 órával vérsejteket izoláltunk a lárvákból. 30 µl Schneider's médiumban egy kezelt és egy kezeletlen lárva vérsejtjeit kevertük össze és hagytuk 45 percig tapadni együtt, majd 6 perc acetonos fixálás után 2M-os HCl oldattal kezeltük a mintákat 15 percig. Ezt követően PBS-ben mostuk 4x5 percig és 0.1% BSA-PBS-ben telítettük 20 percig. A mintákat egér anti-BrdU-Alexa488 ellenanyaggal inkubáltuk 1 órán keresztül, majd 3x5 percig mostuk. A reakció felerősítése érdekében anti-egér Alexa488-cal inkubáltuk a mintákat további 45 percig, a sejtmagokat DAPI-val jelöltük. Ezt követően a lemezeket mostuk és fedtük, a már leírt módon és a Zeiss Axioskope 2MOT epifluoreszcens mikroszkóppal elemeztük. A 4 órás BrdU kezelés esetén az immunindukált 72 órás lárvákat az 1mM BrdU-t tartalmazó tápra helyeztük és a 4 órás inkubációs időt követően kivéztettük.

3.12. In vivo fagocitózis kísérletek

Az immunindukált *D. ananassae* lárvákba FITC-cel jelölt *Escherichia coli* baktériumokat injektáltunk (5 µl FITC-cel jelölt baktérium pellet 1 ml PBS-ben), immunindukciót követően különböző időpontokban (24, 48, 72h). A lárvákból 40 perccel az injektálást követően kinyertük a vérsejteket. Tapasztást követően fixáltuk, telítettük, majd elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk együtt a mintákat, a már leírt módon. A mintákat az Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal értékeltük ki.

3.13. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

3.13.1. Általános eljárás

Elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a *L. bouardi* G486 parazitoid darázssal fertőzött lárvákat az immunindukciót követően 72 órával 5% FBS-t tartalmazó Schneider's médiumban kibontottuk és a kiáramló parazitoid darázspetéket fixálót tartalmazó

Eppendorf csőbe gyűjtöttük, illetve hemocita minták esetében 45 perc tapaszta után fixáltuk. A minták 48 órán keresztül voltak a speciális fixálóban, ami 2 oldat 1:1 arányú keveréke desztillált vízben. Ezután Na-kakodilát oldatban mostuk (pH 7.4), majd 2%-os uranil-acetáttal inkubáltuk (EM, Taab Laboratory and Microscopy). A beágyazás során különböző koncentrációjú etanollal dehidratáltuk a mintákat (50, 70, kétszer 96 és 100%), ezután propilén-oxiddal kezeltük őket (Sigma). Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz 90nm vastagságú metszeteket készítettünk Reichert Ultracut ultramicrotome-mal és Reynold's lead citráttal inkubáltuk a mintákat (Reynolds, 1963). A metszeteket egy JEM-1011 JEOL transzmissziós elektronmikroszkóppal és Morada; Olympus kamerával, valamint iTEM (Olympus) programmal értékeltük ki.

3.13.2. A Ni-DAB pre-embedding (beágyazás előtti) immunjelölés

A Ni-DAB pre-embedding immunjelölés esetén a parazitoid darázssal fertőzött *D. ananassae* lárvákból immunindukciót követően különböző időpontokban vérsejteket, illetve eltérő fejlődési stádiumú parazitoid darázs petéket és lárvákat gyűjtöttünk 0,5 % glutáraldehidet és 4% formaldehidet tartalmazó fixálóban, majd ebben egy órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően PBS-ben öblítettük, majd 30 percig TBS-ben mostuk a pellet és darázs pete mintákat. Ezután 30%-os szacharóz oldatban inkubáltuk a mintákat, előbb szobahőmérsékleten, majd 4°C-on, 1-1 órát. Folyékony nitrogen fölé tartva feltártuk a sejteket, ezt a lépést 3-szor ismételtük, majd 2x15 percig 1XTBS-ben mostuk, ezután 1%-os H₂O₂ oldatban 10 percig inkubáltuk és ismét 2x15 percig mostuk a mintákat. Ezután 50-50mM NH₄Cl-Glycin oldatban 30 percig, majd két mosást követően 10% FBS-t tartalmazó 1% BSA-TBS-ben 30 percig inkubáltunk. Ezután az elsődleges ellenanyaggal (7C5: *D. ananassae* óriássejt-specifikus monoklonális ea) overnight, 4°C-on inkubáltuk a mintákat. Ezt követően 4x10 perc 1% BSA-TBS mosás, és a másodlagos ellenanyaggal (biotinilált kecske anti-egér ea. 1:500, TBS-ben) éjszakán át történő inkubálás következett. Majd a mintákat 4x15 percig 1% BSA-TBS-ben mostuk és tormaperoxidázzal konjugált ABC-vel (Avidine-Biotine Complex 1:500, 1% BSA-TBS-ben) szobahőmérsékleten, 5 órát inkubáltuk. 4x10 percig TBS-ben mostuk, majd a végleges előhívás előtt, 30 percig, sötétben, előinkubáltuk a sejteket a NI-DAB kittel (DAB peroxidase substrate kit SK-4100, Vector Laboratories), de még H₂O₂ hozzáadása nélkül. Majd az előhívás során, a kit minden komponensét használva, sötét színreakcióig (5-10 perc) inkubáltuk a sejteket, illetve a darázs pete mintákat. Végül 4x10 percig mostuk a mintákat és az agarozásig 4 °C-on TBS-ben tároltuk őket. Az agarozást követően a

3.13.1. részben leírtaknak megfelelően jártunk el, a mintákat Na-kakodilátos oldatba helyeztük 1 órára, majd osmium-tetroxiddal, ezt követően 2% uranil-acetáttal kezeltük, a víztelenítési lépések után propilén oxiddal, majd propilén-oxid és araldit különböző arányú elegyeivel inkubáltuk, végül tiszta aralditba ágyasztuk. A metszeteket egy JEM-1011 JEOL transzmissziós elektronmikroszkóppal, Morada; Olympus kamerával, valamint iTEM (Olympus) programmal értékeltük ki.

3.14. A sebzés helyén végbemenő melanizációs folyamatok vizsgálata

A kutikula megsebzéséhez a harmadik stádiumú lárvákat mostuk Ringer oldatban és tárgylemezen megszáritottuk őket. A lárvák poszterior végét minucia tűvel (0.15 mm átmérőjű, Austerlitz Insect Pins) megszártuk és nedves kamrába, filter papírra helyeztük 90 percre. A kutikula megsebzése következtében keletkezett melanizált foltokat Leica MZ FL III UV sztereomikroszkóppal detektáltuk.

3.15. A NO szerepének vizsgálata a *D. ananassae* immunválaszában

D. ananassae adult legyeket petéztettünk normál ecetmuslica táptalajt (kontroll) és 20mM, illetve 50mM L-arginint (NO szintézis kiindulási aminosav), D-arginint (L-arginin inaktív izoformája), L-NAME-t (a NOS gátlószere) vagy D-NAME-t (az L-NAME inaktív izoformája) tartalmazó fiolákra 24 órán át, 25 °C-on. A második stádiumú lárvákat 3 különböző parazitoid darázzsal fertőztük (*L. boulardi* G486, *L. heterotoma* Lh14 és *L. victoriae* LvUNK) 6 órán keresztül, majd 72 órával immunindukciót követően a lárvákat egyesével 30µl 5% FBS-t tartalmazó, PTU-val kiegészített Schneider's médiumban kibontottuk és megszámoltuk az élő, illetve elpusztult parazitoid darázspetéket/lárvákat. A későbbi statisztikai elemzés során az adatsorban csak azokat az eseteket vettük figyelembe, ahol egyetlen darázs pete/lárva volt a mintában, tehát a többszörös parazitáltság esete nem állt fenn. Ezt követően a már leírt módon [3.7. Indirekt immunfluoreszcencia] kezeltük a mintákat, elsődleges ellenanyagként a sokmagvú óriássejt specifikus 7C5 ellenanyagot használtuk.

A különböző vegyületek óriássejt differenciálódásra gyakorolt hatását az egyes mintákban tapasztalt sejdifferenciálódás mértéke alapján határoztuk meg. Ezek alapján 3 kategóriát jegyeztünk fel.

- 1. kategória: nem tapasztaltunk 7C5 pozitív sejtdifferenciálódást, a mintában kizárólag plazmatociták voltak.
- 2. kategória: kis egymagvú nyúlványos, 7C5 pozitív sejtek differenciálódtak, de sokmagvú struktúra nem.
- 3. kategória: normál 7C5 pozitív sokmagvú óriássejtek differenciálódtak.

A statisztikai elemzést és a grafikonokat 3 független kísérlet eredményeiből készítettük. A különböző koncentrációjú vegyületek hatását egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze.

3.16. A NO szintézis intenzitás mérése

A NO szintézis mértékének mérésére a DAF-FM DA reagenst alkalmaztuk. 5mM-os törzsoldatot készítettünk a reagensből DMSO-ban, amit -20 °C-on tároltunk. Az 50 mM L-argininnal és L-NAME-mel az előzőekben már leírt módon kezelt, [3.15 A NO szerepének vizsgálata a *D. ananassae* immunválaszában] és nem kezelt kontroll lárvákat Schneider's médiumban, poolban kibontottuk. A vérsejtszuspenzióhoz 50 μ M végkoncentrációban hozzáadtuk a DAF-FM reagenst, majd 5 perc együtt inkubálás után 30 μ l-enként 12 lyukú tárgylemezre pipettáztuk a mintát és egy órán keresztül hagytuk tapadni a reagenssel kezelt sejteket. Az inkubációs idő elteltével a letapadt sejtekről a folyadék nagyrésztét eltávolítottuk és fedőlemezzel fedtük a mintákat. Ezután a kísérletet Zeiss Axioskope 2MOT epifluoreszcens mikroszkóppal értékeltük, ügyelve arra, hogy azonos expozíciós idővel fotózzuk a különböző módon kezelt mintákat. A sejtek fluoreszcencia intenzitását ImageJ programmal mértük meg. Ezután az intenzitás értékeket egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze. Az eltérő kezelési csoportok közötti szignifikanciát ($p \leq 0,05$) Tukey tesztel állapítottuk meg.

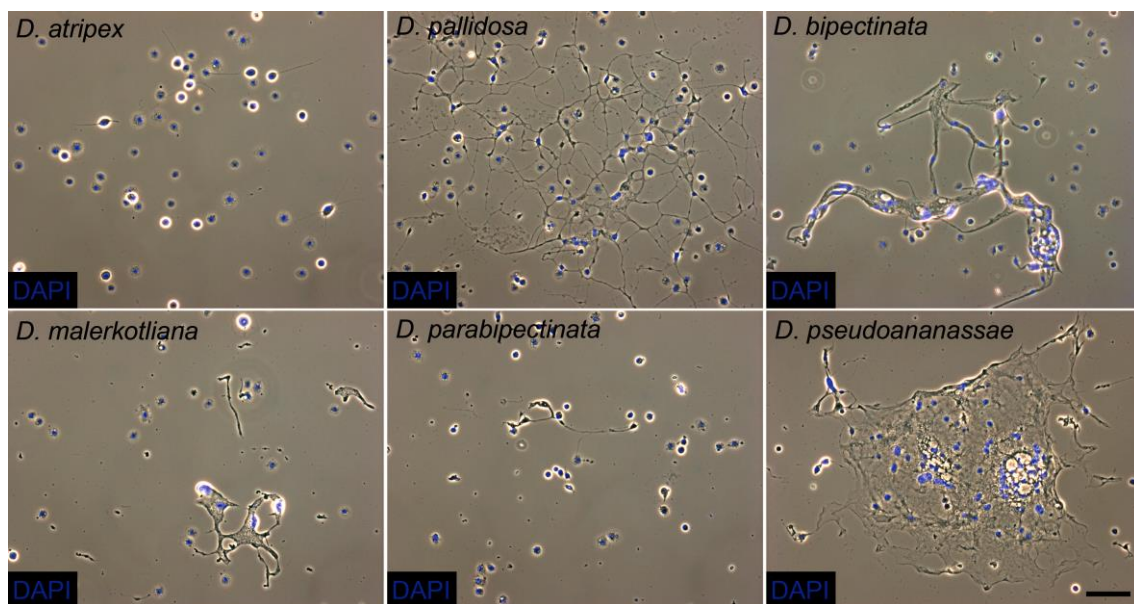
3.17. A sokmagvú óriássejtek kialakulásának vizsgálata videómikroszkópia segítségével

Immunindukciót követően 72 órával a lárvákból 200 μ l Schneider's médiumban vérsejteket izoláltunk, egy DakoPen segítségével körülhatárolt, téglalap alakú folyadék cseppben, tárgylemezen. A sejteket Alpha XDS-1T inverz mikroszkópra szerelt, Sony DX high-definition kamerával filmeztük, 45 percen keresztül.

4. Eredmények

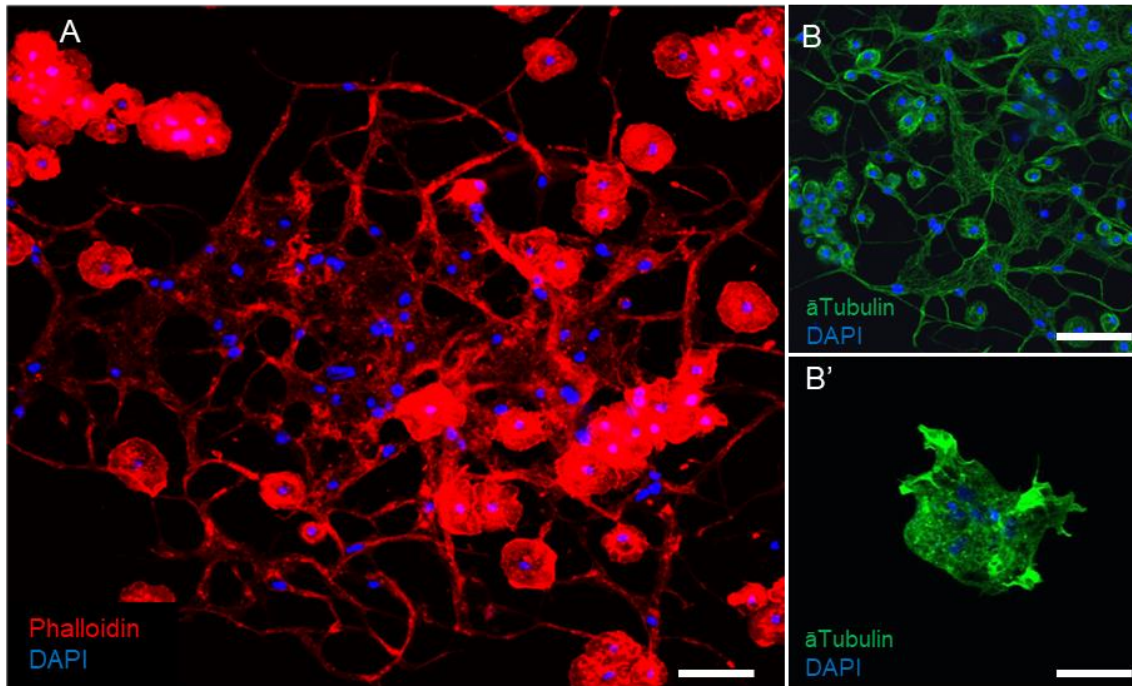
4. 1. A sokmagvú óriássejtek azonosítása és szerkezeti jellemzése

Különböző, az *ananassae* alcsoportba tartozó *Drosophila* faj (*ananassae* komplex: *D. ananassae*, *D. pallidosa*, *D. atripex*; *bipectinata* komplex: *D. pseudoananassae*, *D. bipectinata*, *D. malerkotliana*, *D. parabiepectinata*) lárvális vérsejtjeit vizsgálva megállapítottuk, hogy a keringésben legnagyobb számban (95-98%) kerek morfológiájú plazmatociták és kis mennyiségben (1-2%) fénytörő kristálysejtek vannak jelen. A *bipectinata* komplexbe tartozó fajokban, kis egymagvú, nyúlványokkal rendelkező sejteket is megfigyeltünk (2-3%). Darázsfertőzést követően az alcsoport összes fájában, a már említett sejtípusok mellett, azonosítottunk egy eddig ismeretlen morfológiájú, sokmagvú, nyúlványos vérsejttípust. (15. ábra). Ezek mérete gyakran meghaladta a száz μm -t és sejtplazmájukban akár 20-30 db sejtmagot is megfigyelhettünk. (15. ábra). Az új sejtípust sokmagvú óriássejtnak neveztük el (MGH: Multinucleated Giant Hemocytes) [Márkus és mtsai., 2015].



15. ábra A sokmagvú óriássejtek jelenléte, különböző az *ananassae* alcsoportba tartozó faj lárvájának keringésében, immunindukciót követően. A DAPI a sejtmagokat jelöli. Lépték: 50 μm [Márkus és mtsai. 2015 .online suppl. fig. S1]

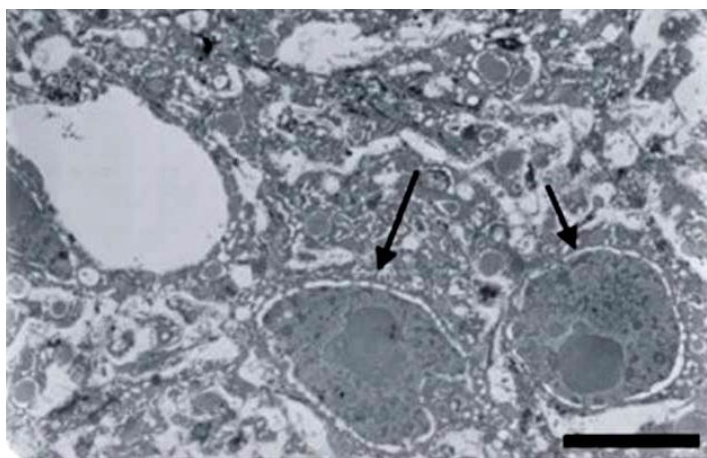
Ex vivo videó mikroszkópos vizsgálataink alapján látszott, hogy a sokmagvú óriássejtek aktívan mozgó és terjeszkedő, az üveg és a parazita pete felületére kitapadni képes sejtek [Márkus és mtsai. 2015. online supplementary material VideoS1,S2].



16. ábra *A D. ananassae* sokmagvú óriássejtjeinek sejtíváz festése. TRITC-Phalloidin festéssel az aktin sejtíváz (A) és anti-tubulin festéssel a mikrotubuláris hálózát a normál sejtben (B) és kolhicin kezelést követően (B'). Lépték: 50µm (A), 25µm (B,B')

A TRITC-phalloidin és anti-tubulin sejtíváz festések alapján megállapítottuk, hogy a véletlenszerűen elhelyezkedő sejtívázok között, sűrű, folytonos aktin és mikrotubulus hálózát figyelhető meg (16. ábra A,B). A kolhicin kezelés hatására ezek a sejtek nem képesek kitekeredni, kompakt szerkezetűek maradnak, ami arra utal, hogy a mikrotubulus polimerizációnak fontos szerepe van a folyamatban (16. ábra B').

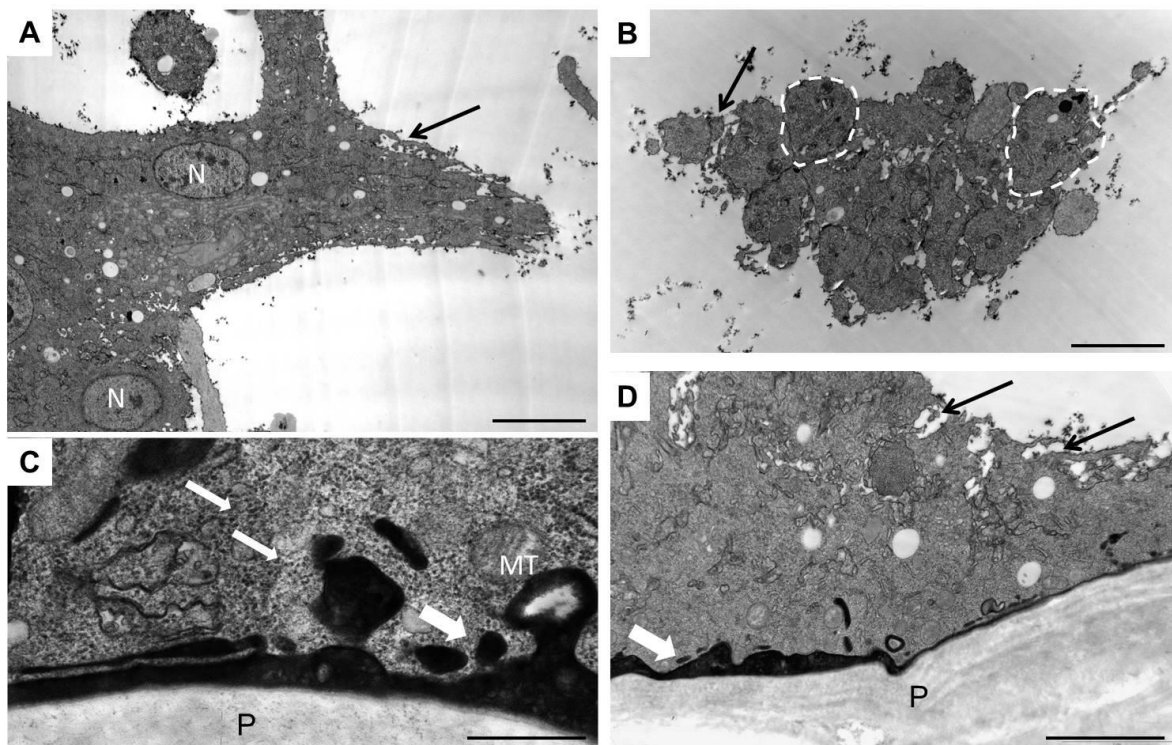
A transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek szerint az óriássejtek sejtmembránnal határolt sejtek, citoplazmájukban a sejtívázok között nincsenek



17. ábra *A D. ananassae* sokmagvú óriássejt transzmissziós elektronmikroszkópos szerkezeti képe. A nyilak a sejtívázokat jelölik. Lépték: 5µm

membránhatárok, valódi többmagvú struktúrát alkotnak (17. ábra). A metszeteken azt is megfigyeltük, hogy a sejtívázban egyedi membránhálózát helyezkedik el. Annak érdekében, hogy a kettős plazmamembránok és az egyrétegű, a sejtorganelleket borító membránok elkülöníthetők legyenek,

speciális csersavas fixálási módszert használtunk. Az így kapott metszeteken jól láthatóvá vált a sötétebben festődő kettős sejtmembrán szerkezet, ami egyedi módon betűrődések révén hálózatot alkot a citoplazmában. Ezt a rendszert extracelluláris perifériás labirintusként írtuk le. A labirintus, a sejt perifériájától befelé haladva, egyre szűkülő járatrendszert alkot, ami helyenként össze is tapad. Fala igen tagolt, hatalmas sejtmembránfelületet képez, járataiban nagyszámú citoplazma nyúlvány, mikrovillus található (18. ábra). Az óriássejt nagy tömegű citoplazmát tartalmazó központi részében több sejtmag látható, belőle vaskos nyúlványok indulnak ki (18. ábra A). A vékonyabb nyúlványok keresztmetszeti képén tisztán kirajzolódik, hogy sok kis nyúlvány köteg alkotja, bennük a perifériás labirintus hálózat felismerhető (18. ábra B).



18. ábra A *D. ananassae* sokmagvú óriássejtek transzmissziós elektronmikroszkópos szerkezeti képe. A vastag nyúlványokkal rendelkező többmagvú struktúra (A). Vékony nyúlvány köteg (B). Az óriássejtek jellegzetes asszimmetrikus szerkezete a parazitoid pete felszínén (C, D). A fekete nyilak az extracelluláris perifériás labirintus rendszer bevezetéseit jelzik. Vékony fehér nyilak: szabad riboszómák a citoplazmában. Vastag fehér nyíl: denz réteg a pete felszínén. Fehér szaggatott vonal: az egyes kötegek határát jelzi. N:sejtmag, MT:mitokondrium. Lépték: 5 μ m (A), 20 μ m (B), 0,5 μ m (C), 2 μ m (D).

A parazitoid darázs petéjének felszínére szorosan kitapadó sokmagvú óriássejtek jellegzetesen asszimmetrikus szerkezetet mutatnak (18. ábra C, D). Az extracelluláris perifériás labirintus rendszer a sejt apikális felszínén tág járatokkal rendelkezik, a járatok befelé folyamatosan szűkülnek, majd teljesen eltűnnek. A bazális, parazitoid felé eső felszínen sötét, denz réteg látható (18. ábra C, D). Az óriássejtek citoplazmájában számos

mitokondrium és durva felszínű endoplazmatikus retikulum található, membránkött riboszómákkal, ezek mellett nagyszámú szabad riboszóma is megfigyelhető (18. ábra C).

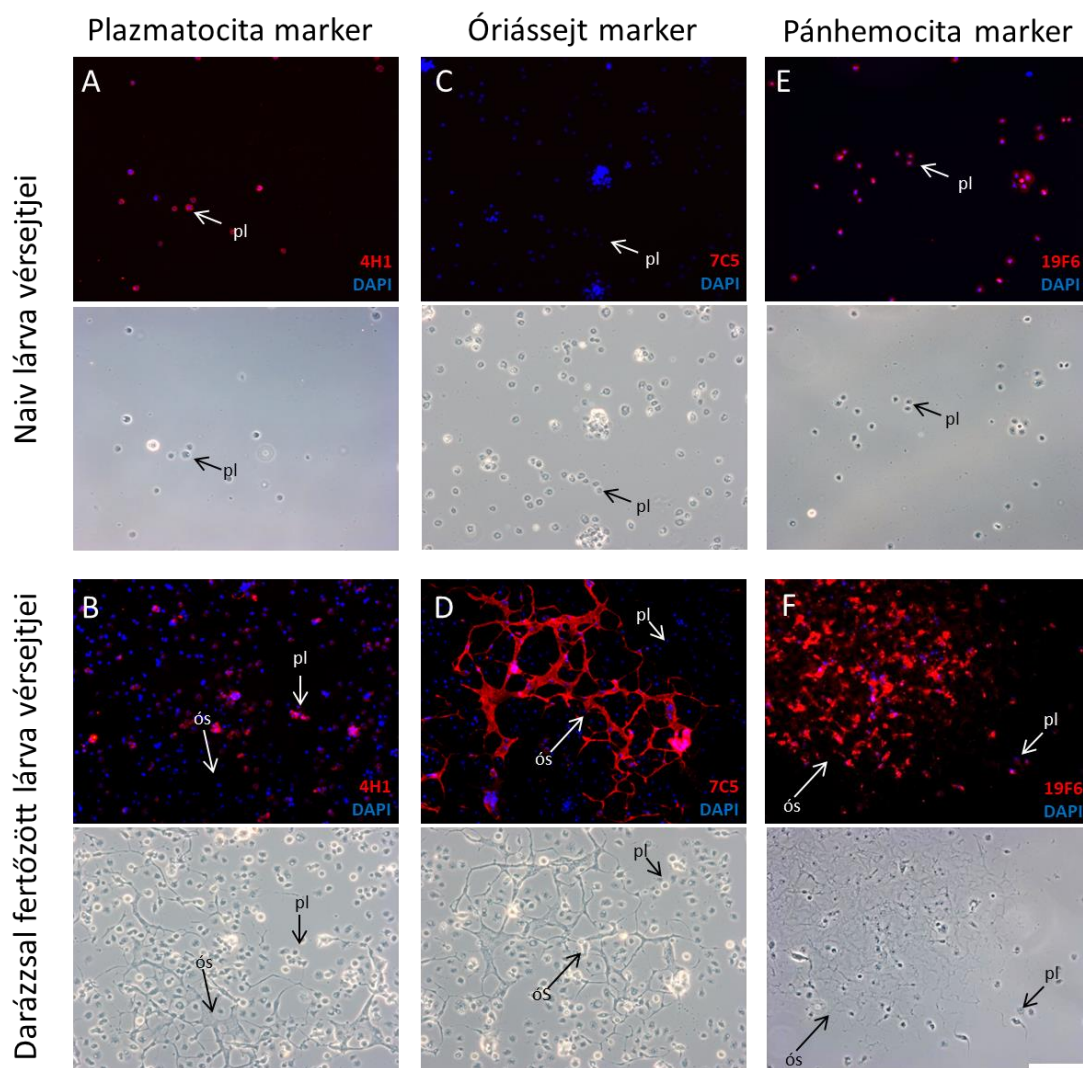
4.2. A *Drosophila ananassae* és *Drosophila bipectinata* vérsejt alpopulációk azonosítása immunológiai markerek alapján

A vérsejttípusok azonosítása és további vizsgálata érdekében, *D. ananassae* és *D. bipectinata* vérsejt-specifikus monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő. Segítségükkel azonosítottunk plazmatocita-specifikus (16F11, 19C11, 4H1, 15B7, 15B8, 14F11), sokmagvú óriássejt-specifikus (7C5, 10C6, 14E11, 19E1) és pánhemocita markereket (19F6) *D. ananassaeban*, valamint plazmatocita- (Bp4) és óriássejt-specifikus (Bp7) markereket *D. bipectinata*ban. A fehérjék többségének meghatároztuk a molekulatömegét (1. táblázat). A 12F6, korábban már leírt, kristálysejt-specifikus (proPO2) ellenanyag, mindkét faj fénytörő kristálysejtjeivel reagált [Willott és mtsai., 1994].

1. táblázat *D. ananassae* és *D. bipectinata* vérsejt-specifikus immunológiai markerek

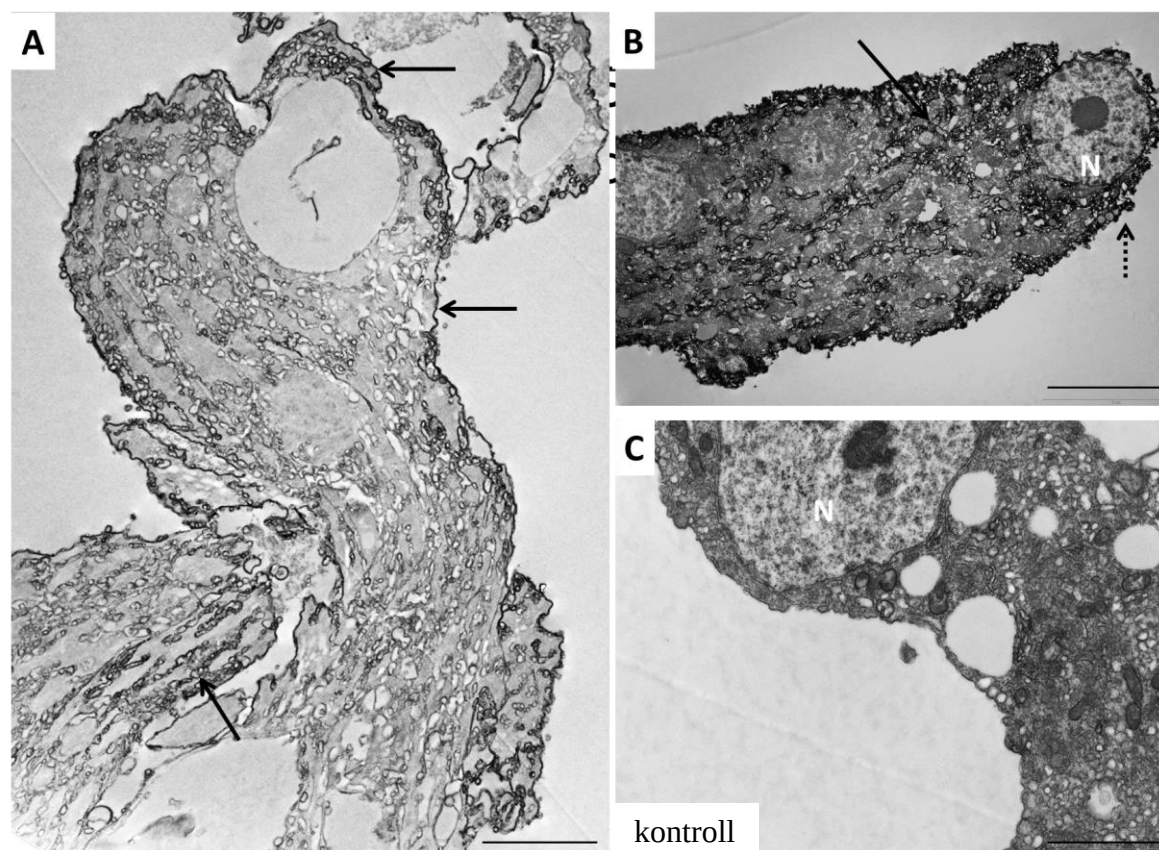
klón	<i>Drosophila ananassae</i>	Molekulatömeg (kDa)
19F6	összes vérsejt	100-250
7C5	óriássejt	50
10C6	óriássejt	50
14E11	óriássejt	50
19E1	óriássejt	50
16F11	plazmatocita, granulumok	23, 50
19C11	plazmatocita, granulumok	37
15B7	plazmatocita	160-280
15B8	plazmatocita	80, 110-180
14F11	plazmatocita	37
4H1	plazmatocita	
klón	<i>Drosophila bipectinata</i>	Molekulatömeg (kDa)
Bp7	óriássejt	20-23
Bp4	plazmatocita	250

A lárva keringő vérsejtjeinek legnagyobb hányadát az 5-10 μm átmérőjű plazmatociták teszik ki. Az általunk azonosított, *D. ananassae* plazmatocita-specifikus ellenanyagok (1. táblázat) mind a naiv, mind az immunindukált lárvákban kijelölik ezt a sejtpopulációt (19. ábra A,B). Az óriássejt-specifikus ellenanyagok a sokmagvú óriássejtekkel és előalakjaikkal, a kis bipoláris sejtekkel reagálnak immunindukciót követően (19. ábra D). Az immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a 7C5 ellenanyag által felismert fehérje a sejtmembránban lokalizálódik és a festődés megfigyelhető az extracelluláris labirintus rendszer, valamint a sejtről lefüződő kis vakuólumok membránjában is (20. ábra A, B). A 19F6 pánhemocita marker-specifikus ellenanyag az összes keringő vérsejten festődést mutat (19. ábra E,F). A 16F11 (és 19C11) ellenanyag, a plazmatociták citoplazmájában található granulumokra specifikus (22. ábra D).



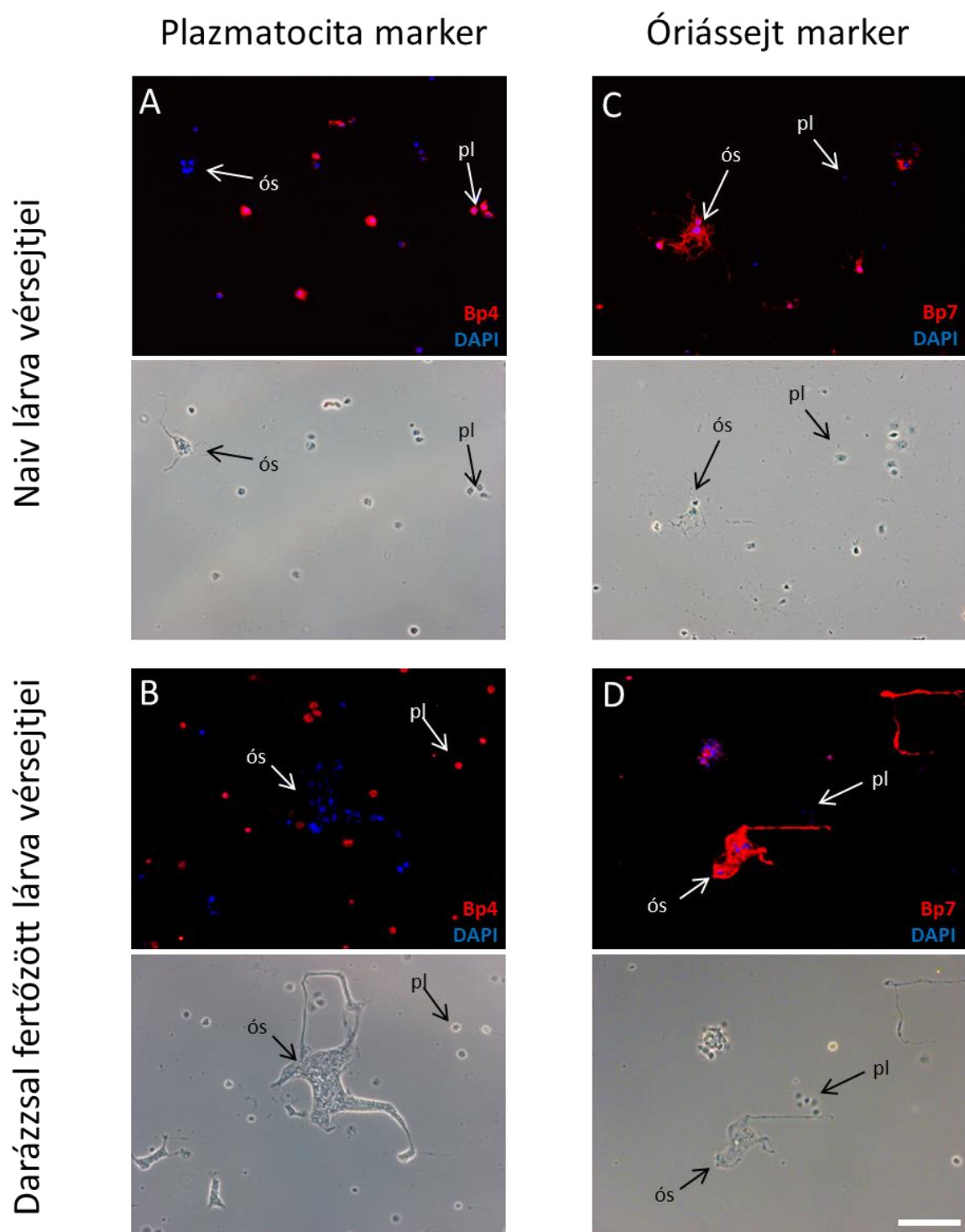
19. ábra *D. ananasse* vérsejt-specifikus markerek kifejeződése a naiv és a parazitoid darázssal fertőzött lárva vérsejtjein. 4H1: plazmatocita-specifikus marker (A, B), 7C5: sokmagvú óriássejt-specifikus marker

(C, D), 19F6: pánhemocita marker (E, F), DAPI: sejtmag, pl: plazmatocita, ós: sokmagvú óriássejt. Lépték: 100 μ m



20. ábra A 7C5 *D. ananassae* vérsejt-specifikus marker kifejeződése a sokmagvú óriássejtek membránjában. Ni-DAB beágyazás előtti (pre-embedding) immunjelölés. Elsődleges ea: 7C5 vérsejt-specifikus ea (A, B), negatív kontroll (T2/48) (C). Jelölődés a plazmamembránban, az extracelluláris labirintus rendszerben (fekete nyilak: A, B) és a lefűződő vakuólumokban (szaggatott nyíl: B). Lépték: 2 μ m (A, C), 5 μ m (B).

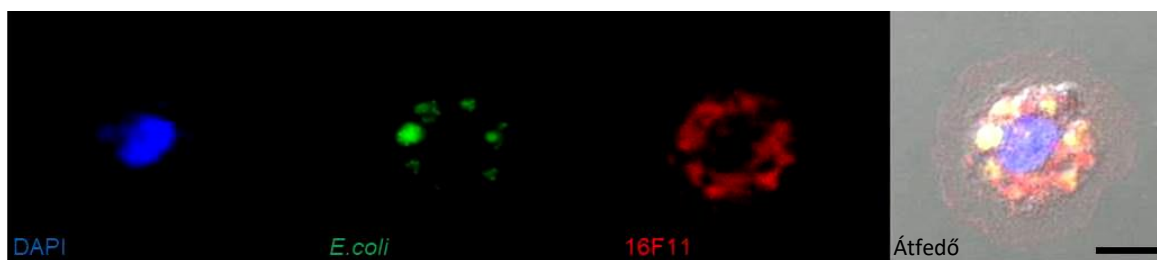
A *D. bipectinata*ban azonosított Bp4 ellenanyag, mind a naiv, mind a darázssal fertőzött lárvák plazmatocitáit kijelöli, míg a Bp7 a nyúlványos sejtekre specifikus (21. ábra). A létrehozott molekuláris markerrendszer lehetőséget biztosított a sokmagvú óriássejtek elsődleges immunválaszban betöltött szerepének részletes vizsgálatára. Modellorganizmusként a további kísérletekben, az *ananassae* alcsoport névadó faját, a *D. ananassaet* választottuk.



21. ábra *D. bipectinata* véresejt-specifikus markerek kifejeződése a naiv és a parazitoid darázzsal fertőzött lárva véresejtjein. Bp4: plazmatocita-specifikus marker (A, B), Bp7: sokmagvú óriássejt-specifikus marker (C, D), DAPI: sejtmag, pl: plazmatocita, ós: sokmagvú óriássejt. Lépték: 100µm

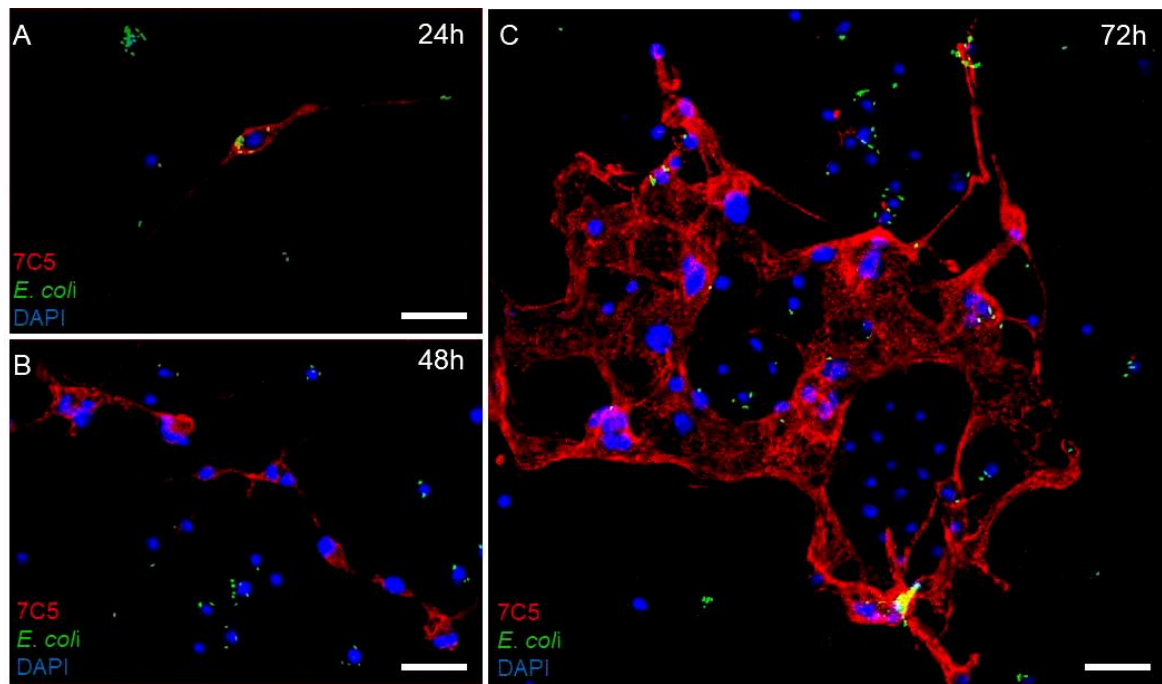
4.3. A plazmatociták és a sokmagvú óriássejtek szerepe a sejt-közvetítette immunválaszban

A plazmatociták és a sokmagvú óriássejtek szerepét vizsgáltuk a sejt-közvetítette immunválasz két legfontosabb folyamata, a fagocitózis és a tokképzés során. FITC-cel jelölt *E.coli* baktériumot injektáltunk *D. ananassae* lárvákba 72 órával immunindukciót követően, majd vizsgáltuk a vérsejtek fagocitáló képességét, a morfológia és immunológiai markerexpresszió függvényében. Megállapítottuk, hogy a plazmatociták képesek voltak bekebelezni a baktériumot. A 16F11 plazmatocita specifikus ellenanyag a fagocitáló sejtek citoplazmájában granulumokat festett, amelyekben nagy mennyiségű *E. coli* baktérium halmozódott fel a kísérlet során. Ez alapján feltehetően fagoszóma-specifikus antigént ismer fel az ellenanyag (22. ábra).



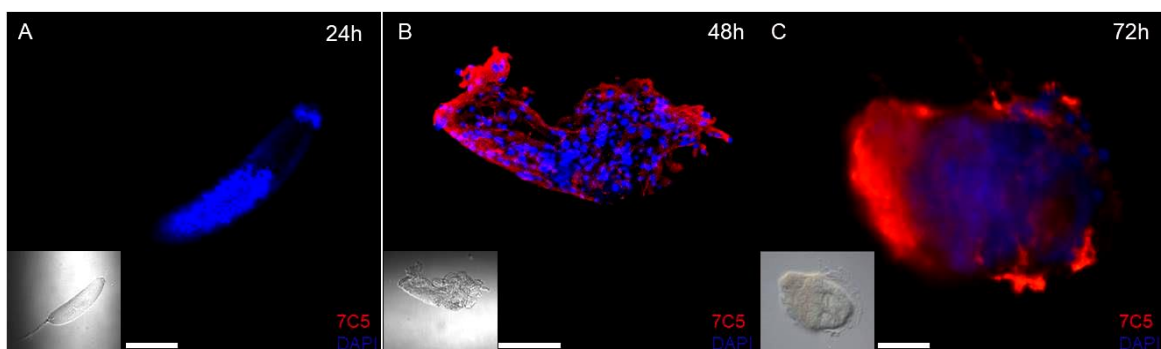
22. ábra A plazmatociták fagocitáló aktivitással rendelkező sejtek. 16F11: plazmatocita-specifikus marker, *E.coli*: FITC-cel jelölt *Escherichia coli* baktérium, DAPI: sejtmagok Lépték: 5µm.

Míg a naiv lárvában nincsenek jelen 7C5 pozitív sejtek, immunindukciót követően azonban már korai időpontban (24 h) megjelennek a keringésben egymagvú, de már nyúlványokkal rendelkező (bipoláris), 7C5 pozitív sejtek (23. ábra A). A későbbi időpontokban (48, 72h) kialakul a sokmagvú óriássejt struktúra (23. ábra B, C). A differenciálódás során történt morfológiai átalakulás mellett funkcionális változást is megfigyeltünk. A kis, egymagvú, bipoláris sejtek a plazmatocitákhoz hasonlóan képesek voltak fagocitálni a baktériumokat, míg a későbbi differenciálódási stádiumú sokmagvú óriássejtek nem (23. ábra A, B, C). Eredményeink arra utaltak, hogy a sokmagvú óriássejtek a keringésben feltehetően plazmatocitákból differenciálódnak immunindukciót követően és kezdetben fagocitáló sejtek, majd később elveszítik ezt a képességüket és a terminálisan differenciálódott óriássejtek a parazitoid elleni tokképzésben játszanak fontos szerepet.



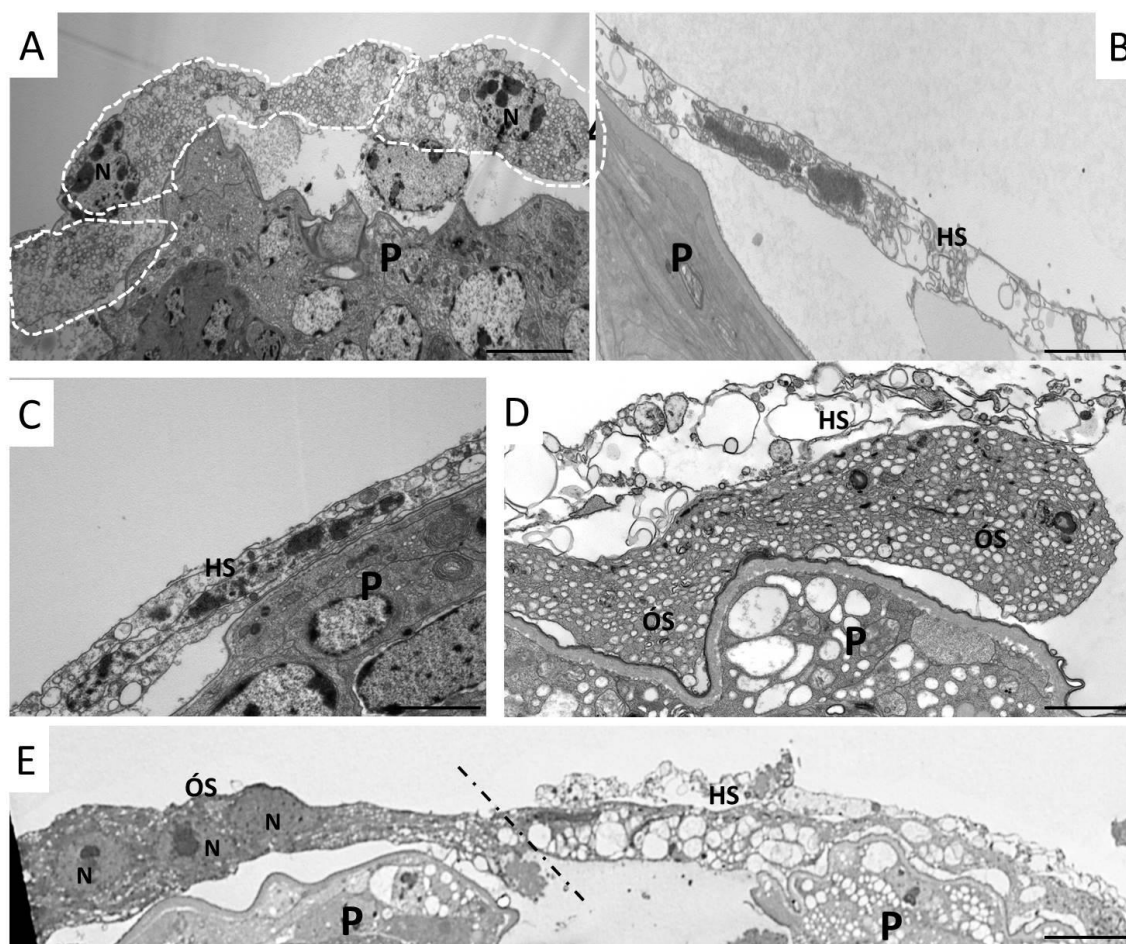
23. ábra A sokmagvú óriássejtek morfológiai és funkcionális változása a lárva keringésében a differenciálódás során, immunindukciót követően 24 (A), 48 (B), 72 (C) órával. 7C5: sokmagvú óriássejt-specifikus marker, *E.coli*: FITC-cel jelölt *Escherichia coli* baktérium, DAPI: sejtmagok. Lépték: 30µm (A,B), 50µm (C).

L. boulandi G486 parazitoid darázsfertőzést követően különböző időpontokban vizsgáltuk a sokmagvú óriássejtek tokképzésben betöltött funkcióját. Immunindukciót követően 24 órával még nem voltak 7C5 pozitív sejtek a pete felszínén (24. ábra A), de 48 és 72 órával a fertőzést követően beborították a parazitoid lárvát a sokmagvú óriássejtek. A fénymikroszkópos képek alapján azt láthattuk, hogy a tokképzés folyamata nem járt melanizációval (24. ábra B, C).



24. ábra A sokmagvú óriássejtek a parazitoid darázs petéjének felszínén immunindukciót követően 24 (A), 48 (B) és 72 (C) órával. Lépték: 20µm (A), 10µm (B, C).

A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok alátámasztották, hogy immunindukciót követően 24 órával a parazitoid pete felszínén egymagvú sejtek találhatók (25. ábra A). Későbbi időpontokban (24-48h) megfigyeltünk egy összefüggő, ismeretlen eredetű hólyagos sejtréteget a fejlődő parazitoid körül (25. ábra B, C). Immunindukciót követően 48-72 órával a sokmagvú óriássejtek vékony nyúlványai a hólyagos sejtréteget felszakítva érték el a parazitoid felszínét (25. ábra D, E).

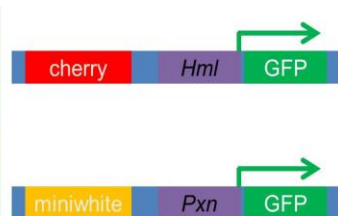


25. ábra A sokmagvú óriássejtek jelenléte a parazitoid darázs petéjén immunindukciót követően különböző időpontokban. Egymagvú sejtek a pete felszínén immunindukciót követően 24 órával (A) Összefüggő hólyagos sejtréteg a parazitoid körül (B, C). Sokmagvú óriássejtek a pete felszínén (D, E). Fehér szaggatott vonal: az egymagvú sejtek határa, fekete szaggatott vonal: a hólyagos sejtréteg és a sokmagvú óriássejt határa. P: parazitoid, HS: hólyagos sejtréteg, OS: sokmagvú óriássejt, N: sejtmag. Lépték: 5 μ m (A, E), 2 μ m (B, C, D).

4.4. Transzgenikus *D. ananassae* vonalak létrehozása és az *in vivo* meghajtóelemek kifejeződése a vérsejtképző kompartmentumokban

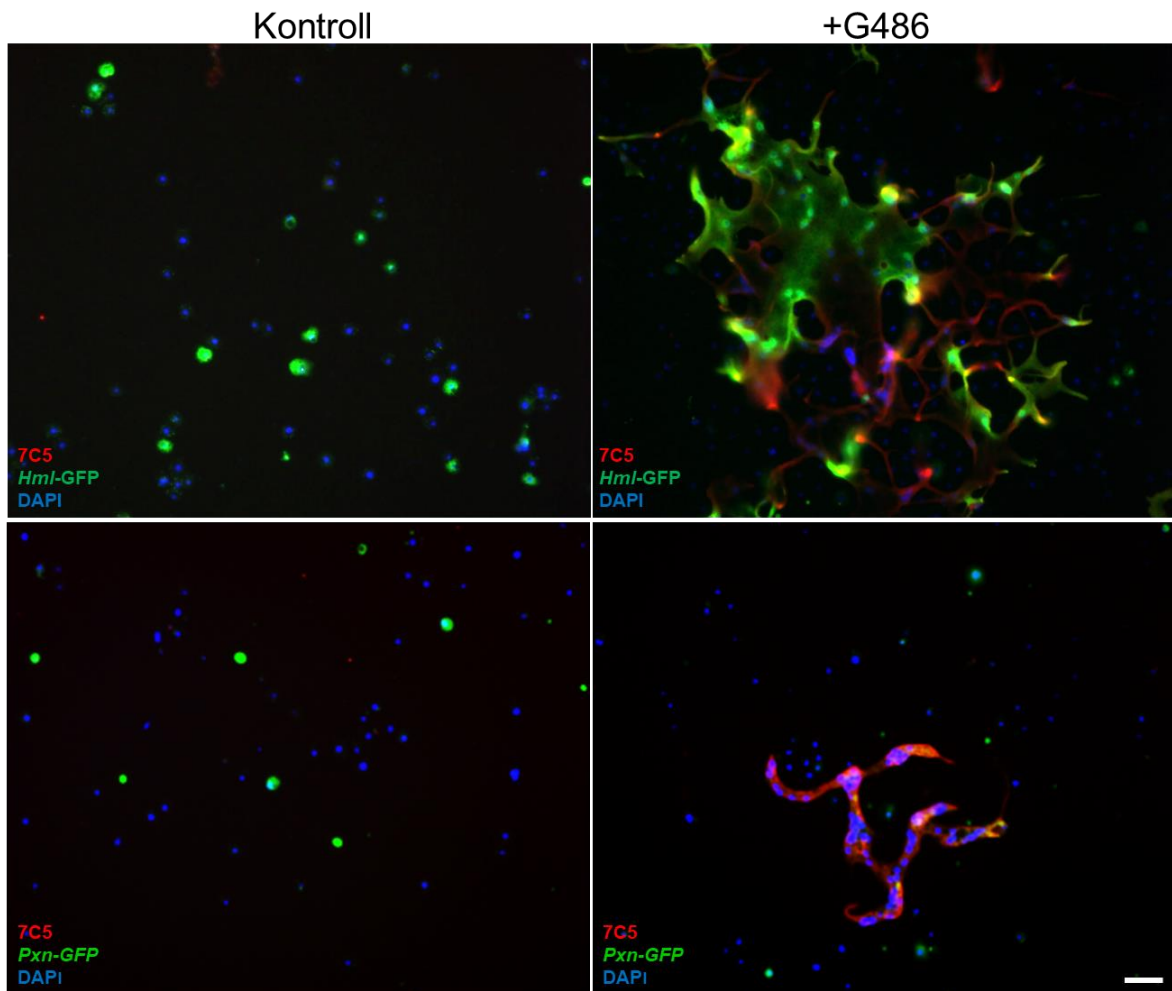
A meglévő immunológiai markerrendszer mellett célunk volt *in vivo* transzgenikus rendszert létrehozása *D. ananassaeban*, amely a vérsejtek és vérsejtképző kompartmentumok további, részletes vizsgálatát tette volna lehetővé. A *D. melanogaster* modellorganizmus esetében gyakran használt PiggyBac transzpozon alapú riporter konstrukció sikeresen beépült a *D. ananassae* genomba, a GFP kifejeződése az adult potrohának abdominális részén és a szájszervek környékén volt detektálható (26. ábra). A további transzgenikus vonalak esetében, a vérsejt-specifikus promóter által közvetlenül meghajtott, riporter konstrukciókat használtunk. A promóter régiókat a *D. melanogasterben* leírt és használt vérsejt- és/vagy kompartmentum-specifikus meghajtóelemek közül választottuk ki (26. ábra).

A *Hml*-GFP konstrukt esetében a *D. melanogaster* *Hemolectin* gén szabályozó régióját használtuk promóterként az EGFP riporterrel fuzionáltatva, a beépülés nyomkövetését a *Cherry* marker biztosította. A *Peroxidasin* (*Pxn*) promótert szekvencia homológia alapján azonosítottuk, és *D. ananassae* genomi régiót használtunk a konstruktban, a beépülés a *mini-white* markergén segítségével volt detektálható.



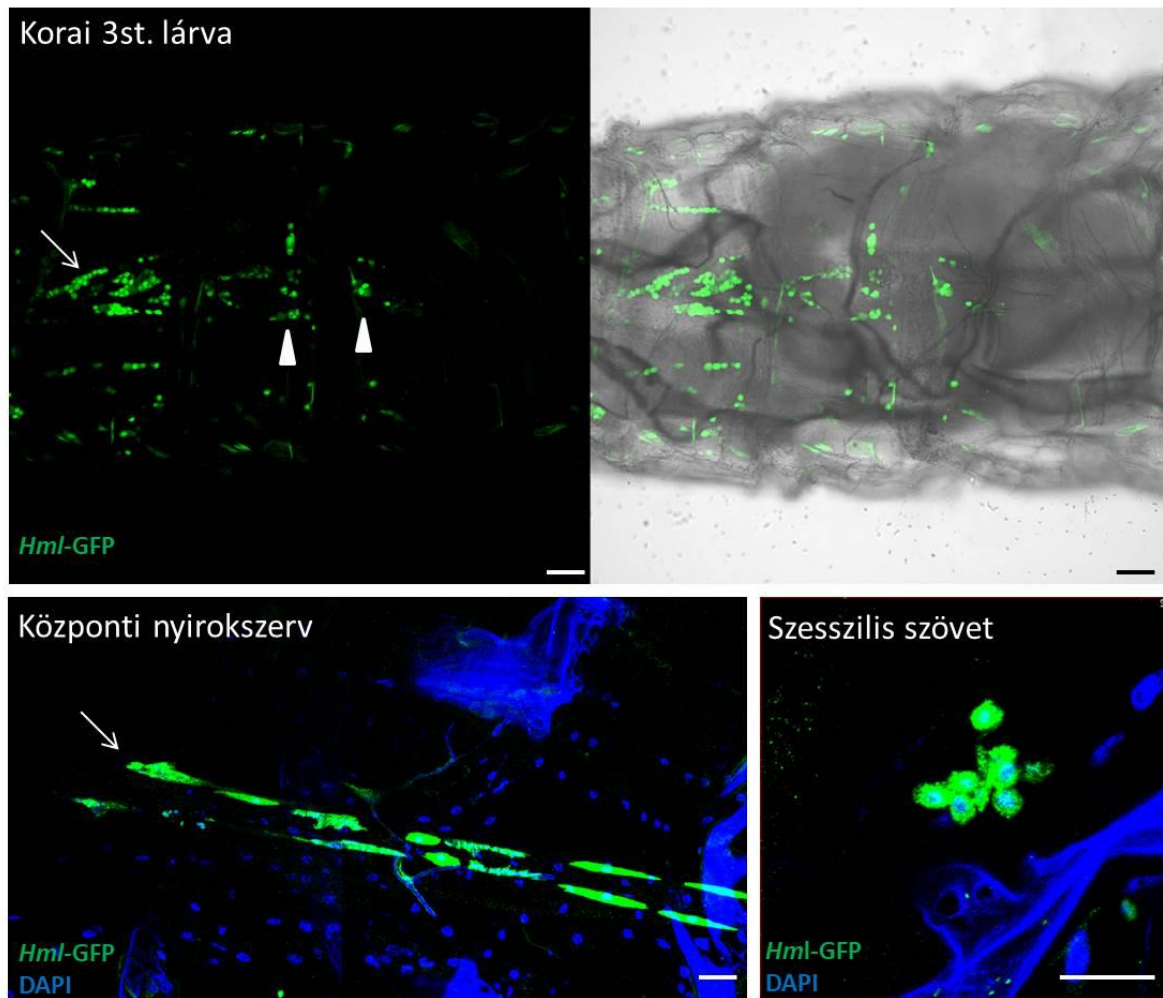
26. ábra A PiggyBac transzpozon alapú riporter konstrukciók *D. ananassaeban*. Bal oldalon a sikeresen beépült transzgén kifejeződése adultban, jobb oldalon a *Hml*-GFP és *Pxn*-GFP konstrukciók felépítése. Cherry és miniwhite: markergének, *Hemolectin* (*Hml*) és *Peroxidasin* (*Pxn*) vérsejt-specifikus promóterek, GFP:riportergén

Az *in vivo* GFP riportert kifejező vonalak létrejöttével lehetőségünk nyílt a *D. ananassae* vérsejtjeinek és vérsejtképző kompartmentumainak részletes vizsgálatára, akár az élő állatban is. A *Hml*-GFP a naiv lárva keringő vérsejtjeinek, a plazmatocitáknak, nagyjából 25-30 %-ban fejeződött ki (27. ábra). Immunindukciót követően a sokmagvú óriássejtekben egyedi expressziós mintázatot figyeltünk meg. Az óriássejtek többségében, foltosan *Hml* pozitív és negatív régiókat detektáltunk (27. ábra). A *Pxn*-GFP transzgén csupán a keringő hemociták 15%-ban fejeződött ki a darázsfertőzést megelőzően, immunindukciót követően a sokmagvú óriássejtekben gyengébb jelet kaptunk, mint a *Hml*-GFP esetében (27. ábra).



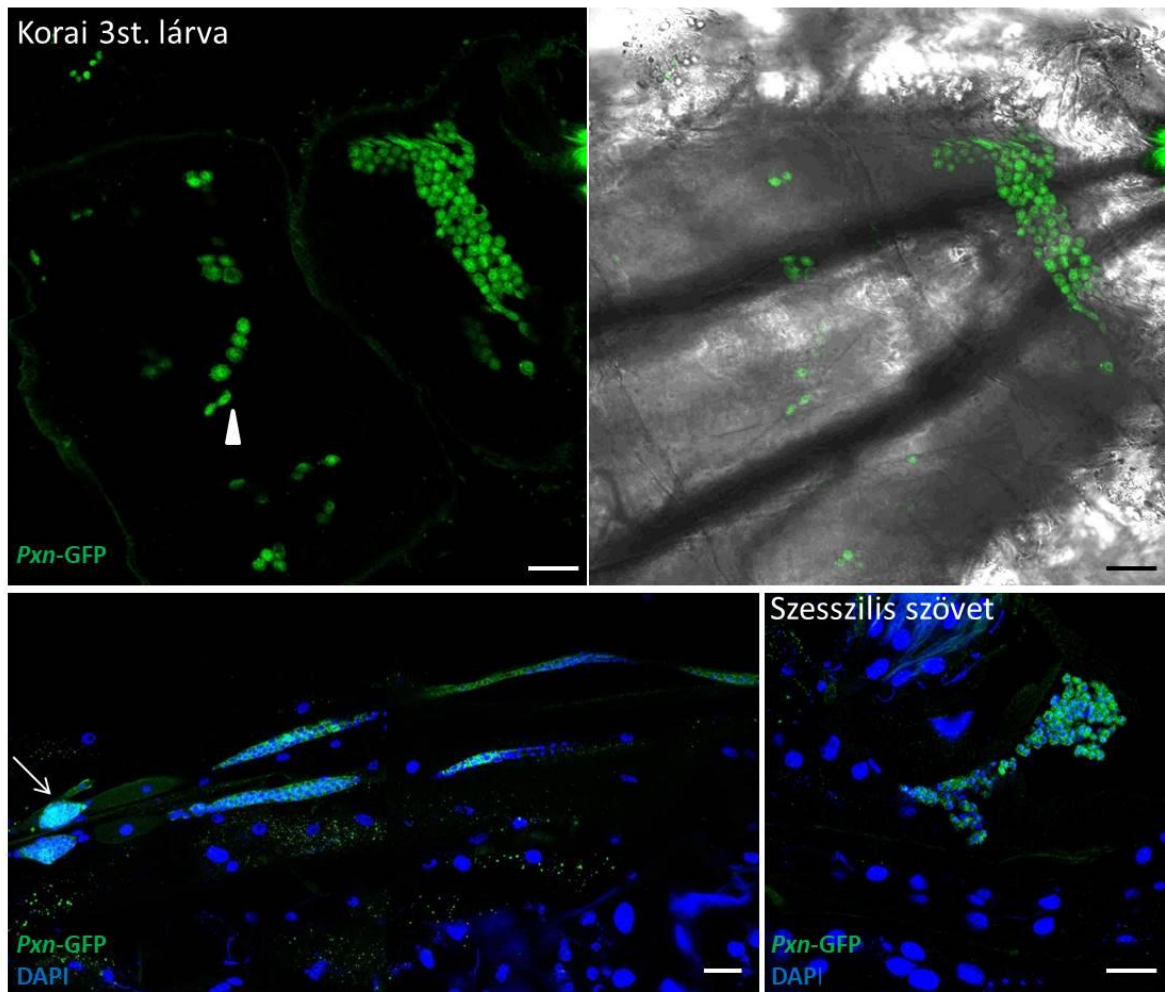
27. ábra A *Hml*-GFP és a *Pxn*-GFP kifejeződése a *D. ananassae* lárva keringésében a plazmatocitákban (kontroll) és a sokmagvú óriássejtekben (+G486). 7C5: sokmagvú óriássejt-specifikus marker, DAPI: sejtmagokat jelöli. Lépték: 30 μ m

Az élő lárvában a *Hml*-GFP kifejeződése a szesszilis szövetben, a szegmenseknek megfelelő sávos mintázatot mutatott, a lárva anterior részén kirajzolódott a központi nyirokszerv (28. ábra). A központi nyirokszerv immunfestése során az elsődleges és másodlagos lebenyek összes sejtje, valamint a perikardiális sejtek és a szívcső, a test egész hosszában festődtek (28. ábra).



28. ábra A *Hml-GFP* kifejeződése *D. ananassae* lárva szesszilis szövetében és a központi nyirokszervben. Fent az élő lárva szesszilis vérsejtjei (fehér nyílhegyek) és a központi nyirokszerv elsődleges lebenye (fehér nyíl). Lent a kiboncolt központi nyirokszerv (fehér nyíl) és a szesszilis szövet néhány sejtje láthatóak. A DAPI a sejtmagokat jelöli. Lépték: 50μm

A *Pxn-GFP* lárvákat vizsgálva, a szesszilis szövet sávos mintázata nehezebben volt detektálható a jóval alacsonyabb expressziós szint miatt, leginkább a lárva poszterior végén található szesszilis sejtesomók rajzolódtak ki (29. ábra). A központi nyirokszerv elsődleges és másodlagos lebenyeinek vérsejtjei kifejezték a GFP-t, a perikardiális sejtekben nagyon gyenge jel volt tapasztalható (29. ábra). A kutikulához kitapadó szesszilis hemociták is *Pxn-GFP* pozitívak voltak (29. ábra).

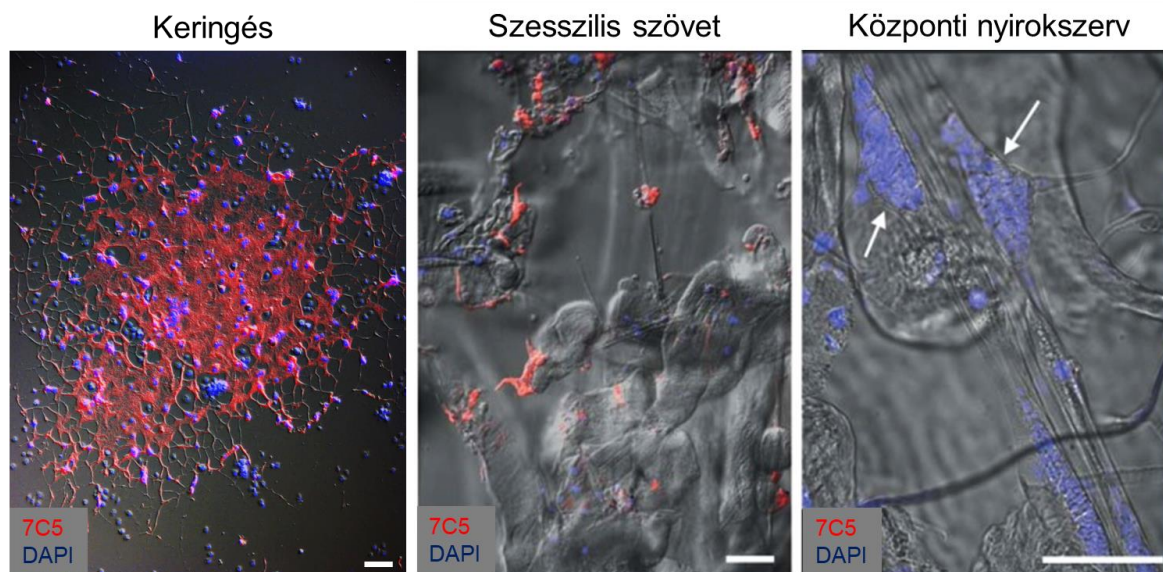


29. ábra A *Pxn-GFP* kifejeződése *D. ananassae* lárva szesszilis szövetében és a központi nyirokszervben. Fent az élő lárva szesszilis sejtjei (fehér nyílhegy), lent a kiboncolt központi nyirokszerv (fehér nyíl) és a szesszilis szövet néhány sejtje láthatóak. A DAPI a sejtmagokat jelöli. Lépték: 50µm.

4.5. A sokmagvú óriássejtek differenciálódása a vérsejtképző kompartmentumokban

D. melanogaster esetében ismert, hogy mindhárom vérsejtképző kompartmentum hozzájárul a parazitoid darázssal szembeni védekezésben szerepet játszó vérsejtek differenciálódásához [Carton és Nappi, 1997; Lanot és mtsai., 2001; Márkus és mtsai., 2009; Honti és mtsai., 2010, 2014]. Immunindukciót követően különböző időpontokban megvizsgáltuk a központi nyirokszervben, a szesszilis vérképző szövetben és a keringésben jelen lévő vérsejteket *D. ananassae* lárvákban. Megfigyeltük, hogy 7C5 pozitív kis kerek, illetve egymagvú bipoláris sejtek, az immunindukciót követően korai időpontban (24h) megjelentek a keringésben (23. ábra A). Immunindukciót követően 48 órával már a szesszilis szövetben is differenciálódtak kis nyúlványos sejtek, amelyek a

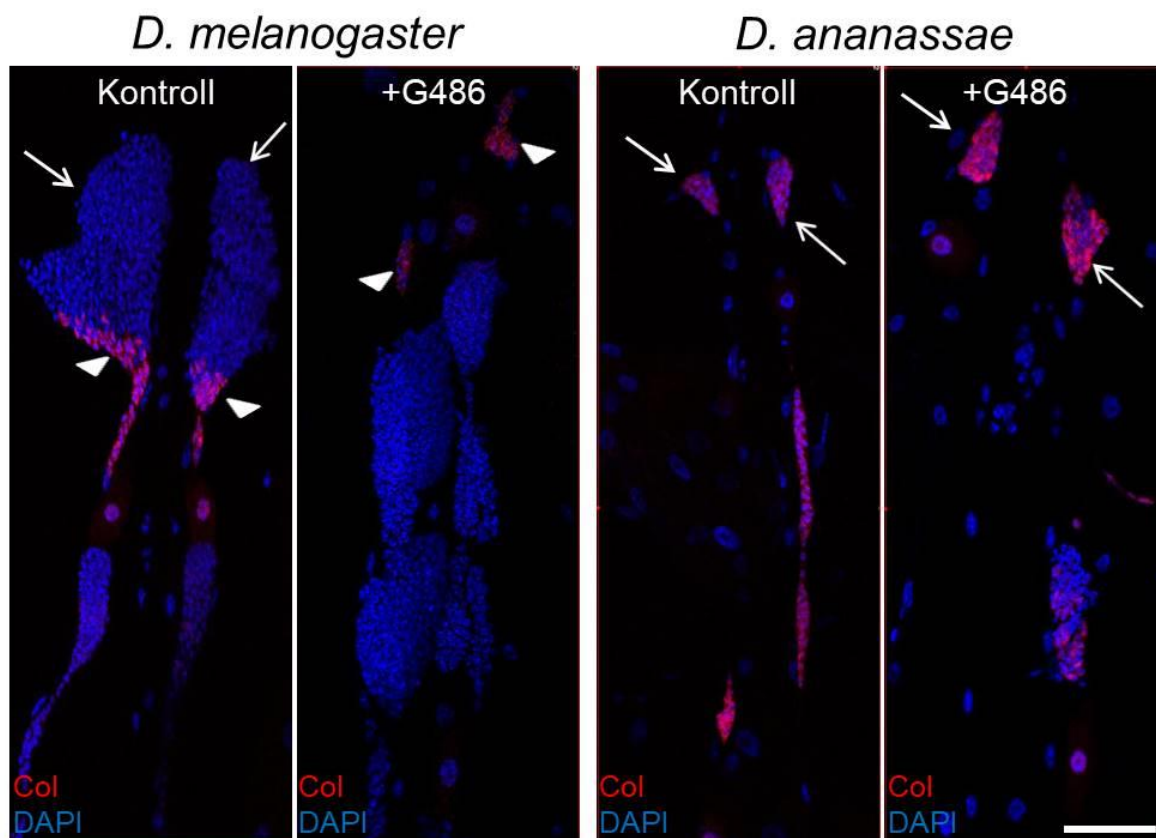
keringésben ebben az időpontban már többmagvúak voltak. Immunindukciót követően 72 órával kialakult a sokmagvú (esetenként 30-40 mag) nyúlványos óriássejt struktúra és mind a keringésben, mind a szesszilis szövetben ekkor voltak legnagyobb számban jelen ezek a sejtek (30. ábra). A központi nyirokszerv azonban immunindukciót követően is intakt maradt, elsődleges lebenye nem bomlott fel, nem differenciálódtak 7C5 markert hordozó óriássejtek (30. ábra). Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a *D. melanogaster*nél megismert folyamatoktól eltérően, *D. ananassae* esetében a központi nyirokszerve nem vesz részt az immunválaszban szerepet játszó vérsejtek differenciálódásában.



30. ábra A sokmagvú óriássejtek differenciálódása a keringésben, a szesszilis szövetben és a központi nyirokszervben immunindukciót követően 72 órával. 7C5: sokmagvú óriássejt specifikus marker, DAPI: sejtmagokat jelöli, nyilak: a központi nyirokszerv elsődleges lebenyei. Lépték: 50µm.

Annak érdekében, hogy kiderítsük, vajon milyen folyamatok állhatnak az intakt szerkezet fennmaradásának hátterében megvizsgáltuk a központi nyirokszerv sejtjei által termelt Collier transzkripciós faktor kifejeződését a naiv és immunindukált lárvában. A Collier-t, mint a központi nyirokszervben történő vérsejtképzés egyik kulcsfaktorát azonosították *D. melanogaster*ben. Expressziós mintázata a korai lárvastádiumokban a központi nyirokszerv elsődleges és másodlagos lebenyeire is kiterjed, de a harmadik stádiumú lárvában már csak az elsődleges lebeny néhány poszterior sejtjére (PSC) redukálódik (31. ábra). A Collier felelős a központi nyirokszerv integritásának fenntartásáért, és a kísérletek alapján megfigyelhető volt, hogy *D. melanogaster*ben immunindukciót követően az elsődleges lebenyek felbomlanak, csak a PSC marad intakt. Ezzel szemben *D. ananassae*ban azt tapasztaltuk, hogy a naiv lárvában a kifejeződési

mintázat az elsődleges és másodlagos lebenyek szinte minden sejtjére kiterjedt és ez az expresszió immunindukciót követően is fennmaradt (31. ábra). Ezek alapján a Collier transzkripciós faktor konstans kifejeződése okozhatja, hogy a központi nyirokszerv intakt állapota immunindukció után is fennmarad.

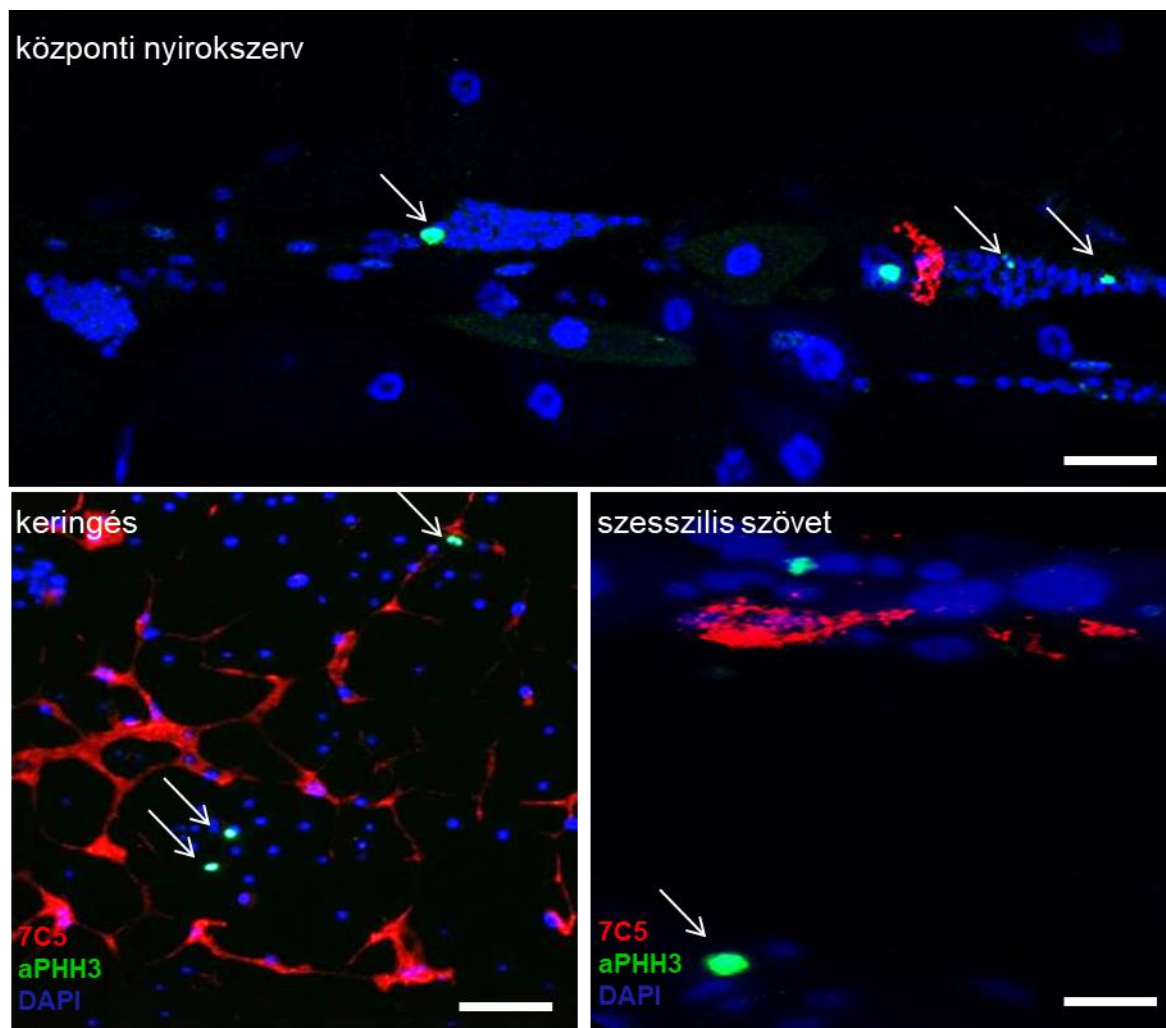


31. ábra A Collier kifejeződése a központi nyirokszerv lebenyeiben *D. melanogaster* és *D. ananassae* lárvákban. Col: Collier transzkripciós faktor, DAPI: sejtmagokat jelöli. A fehér nyilak a központi nyirokszerv elsődleges lebenyeire mutatnak, a nyílhegyek a PSC-t jelzik. Lépték: 50µm.

A központi nyirokszervben, az anti-foszfohiszton H3 (antiPHH3) festődés alapján tapasztalt nagyon alacsony mértékű (<1%) sejtosztódás is (32. ábra) arra utal, hogy ez az immunszerv nem járul hozzá az immunválaszban részt vevő vérsejtek képzéséhez. A *Hml*-GFP és *Pxn*-GFP kifejeződés (28. és 29. ábra), valamint a Collier expressziós mintázata alapján (31. ábra), a *D. ananassae* központi nyirokszervének lebenyeiben nem különíthetők el strukturálisan vagy funkcionálisan eltérő régiók.

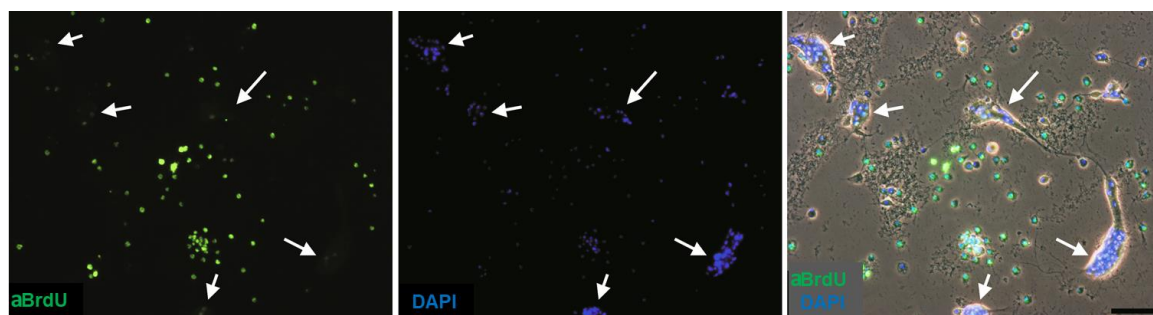
4.6. A sokmagvú óriássejtek kialakulása

A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a sokmagvú óriássejtek több sejtmagot tartalmaznak citoplazmájukban, és a magok között sejtmembrán nem azonosítható. Ez a szerkezet endomitózissal vagy sejtfúzióval létrejövő struktúrára utal. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a sejtosztódás szerepet játszik-e a sokmagvúság kialakításában, a foszfohiszton H3 osztódási markerre specifikus anti-foszfohiszton H3 ellenanyaggal festettük a vérsejteket immunindukciót követően 48 órával. Megfigyeltünk osztódó vérsejteket a keringésben, a szesszilis vérképző szövetben és a központi nyirokszervben is, azonban ezek mindhárom kompartmentumban 7C5 negatív plazmatociták voltak (32. ábra).



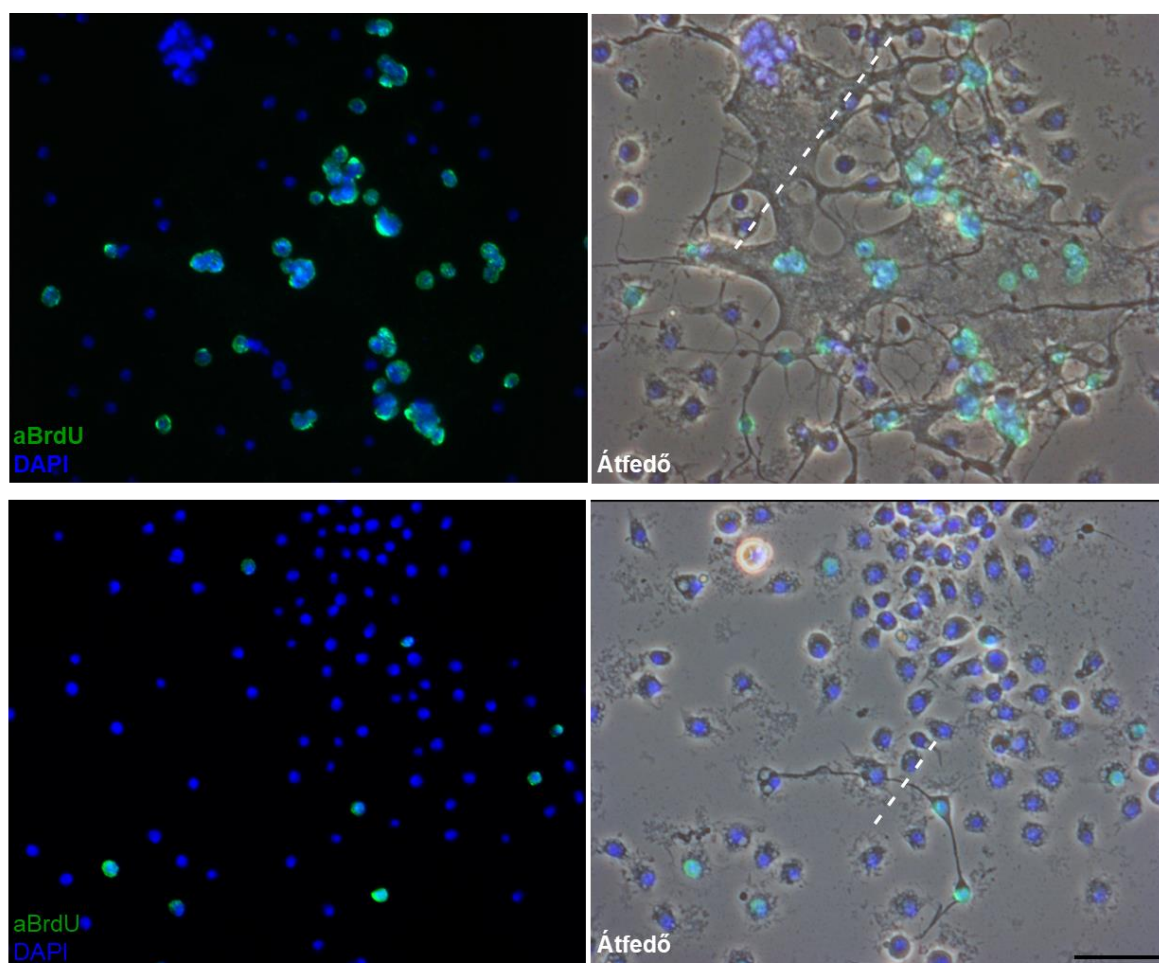
32. ábra Sejtosztódás a *D. ananassae* lárva vérsejtképző kompartmentumaiban immunindukciót követően 48 órával. Az osztódó sejteket fehér nyilak jelzik. 7C5: sokmagvú óriássejt specifikus ellenanyag, DAPI: sejtmagokat jelöli. Lépték: 50μm

Az anti-foszfohiszton ellenanyag, a foszforilált Ser10-et ismeri fel így az osztódó sejtek egy részét jelöli csupán. Annak érdekében, hogy az esetleges további osztódásokat is detektáljuk, egy másik sejtosztódási markert alkalmaztunk. A bromo-deoxy-uridin (BrdU) egy timidin analóg, ami képes az osztódás S fázisában beépülni a szintetizálódó DNS-be majd a további osztódások során átjut az utódsejtekbe is. Négy órás BrdU kezelést követően a kibontott lárvák vérsejtjeit anti-BrdU ellenanyaggal festettük. A plazmatociták 70%-a jelölődött, míg az óriássejtek magjaiban nem figyeltünk meg BrdU beépülést, ami arra utalt, hogy a sokmagvú óriássejtek magjai nem osztódtak (33. ábra).



33. ábra A BrdU beépülése a *D. ananassae* lárvá vérsejtjeibe 4 órás kezelést követően. A fehér nyilak a sokmagvú óriássejteket jelölik, ahol BrdU beépülés nem tapasztalható a sejtmagvakban. Lépték 50µm

Mindezen eredmények arra utaltak, hogy a sokmagvú struktúra kialakulásában az endomitózis nem játszik szerepet. Annak érdekében, hogy igazoljuk, a sejtek valóban fúzióval keletkezhetnek, kialakítottunk egy egyedi vizsgálati rendszert. Hosszabb BrdU etetési periódust követően a kibontott lárvák vérsejtjeinek magja 100%-ban anti-BrdU jelölődést mutatott. Ezt kihasználva BrdU-val jelölt immunindukált lárvák vérsejtjeit fuzionáltattuk BrdU-val nem jelölt immunindukált lárvák vérsejtjeivel *ex vivo*. Anti-BrdU festést követően a mikroszkópos elemzések során megfigyeltünk olyan sokmagvú óriássejteket, amelyek citoplazmájukban jelölt és nem jelölt magokat egyaránt tartalmaztak. Ez arra utalt, hogy az együtt történő inkubálás során ezek a sejtek egymással fuzionáltak (34. ábra).

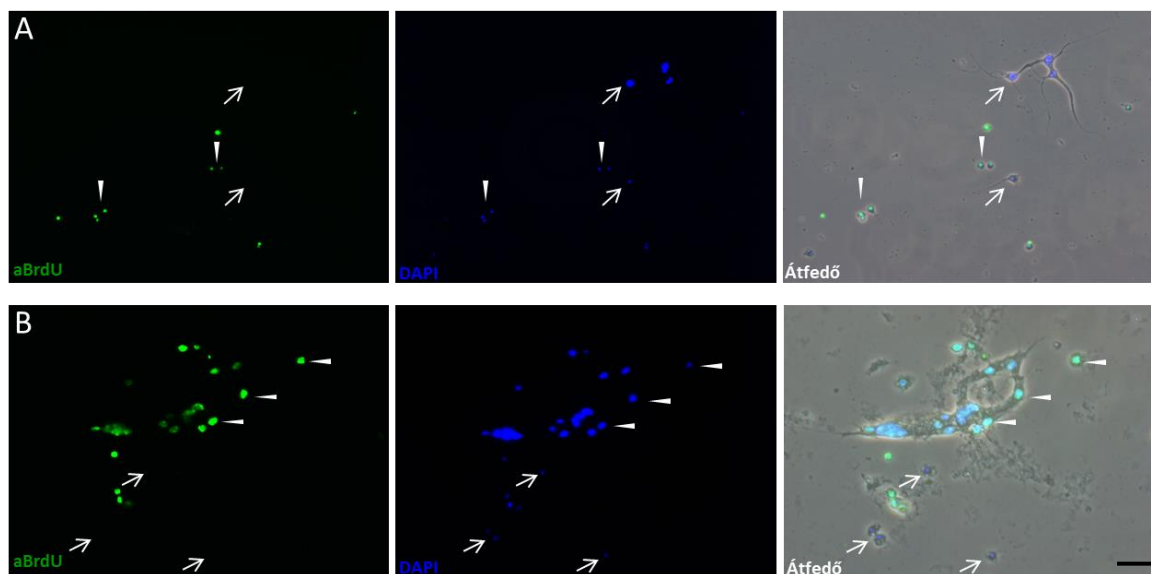


34. ábra A sokmagvú óriássejtek ex vivo kialakulása *D. ananassaeban*. aBrdU-val jelölt (zöld) és jelöletlen sejtmagvú óriássejtek fúziójának határát a szaggatott fehér vonal jelzi. DAPI: a sejtmagokat jelöli. Lépték: 50µm.

A sokmagvú óriássejtek fúzióját megfigyeltük az *ex vivo* videómikroszkópos vizsgálatok során is, ahol az immunindukált lárvából származó sejtek néhány ponton összetapadtak, majd fuzionáltak a tárgylemezen, 45 perc alatt (Márkus és mtsai., 2015. online suppl. video S3).

Megvizsgáltuk, hogy a fúzió kialakulásának feltétele-e az előzőleg parazitoid darázzsal fertőzött “aktivált” vérsejtek jelenléte. BrdU-val jelölt naiv lárvák és BrdU-val nem jelölt immunindukált lárvák vérsejtjeit fuzionáltattuk *ex vivo* (35. ábra A), illetve fordított kísérleti elrendezésben is elvégeztük a vizsgálatot, ahol BrdU-val nem jelölt naiv és BrdU-val kezelt immunindukált lárvák vérsejtjeit használtuk (35. ábra B). Mindkét esetben azt tapasztaltuk, hogy a kialakult sokmagvú óriássejtek kizárólag egyféle, az immunindukált lárvából származó, anti-BrdU negatív vagy pozitív magokat tartalmaztak citoplazmájukban, a kísérleti elrendezéstől függően. A naiv lárvából származó sejtek nem fuzionáltak az immunindukált egyedből származó sejtekkel. Ez arra utalt, hogy a

sokmagvú óriássejtek kizárólag “aktivált” vérsejtek fúziójával keletkeznek, a nem aktivált plazmatociták nem járulnak hozzá ehhez a folyamathoz (35. ábra).



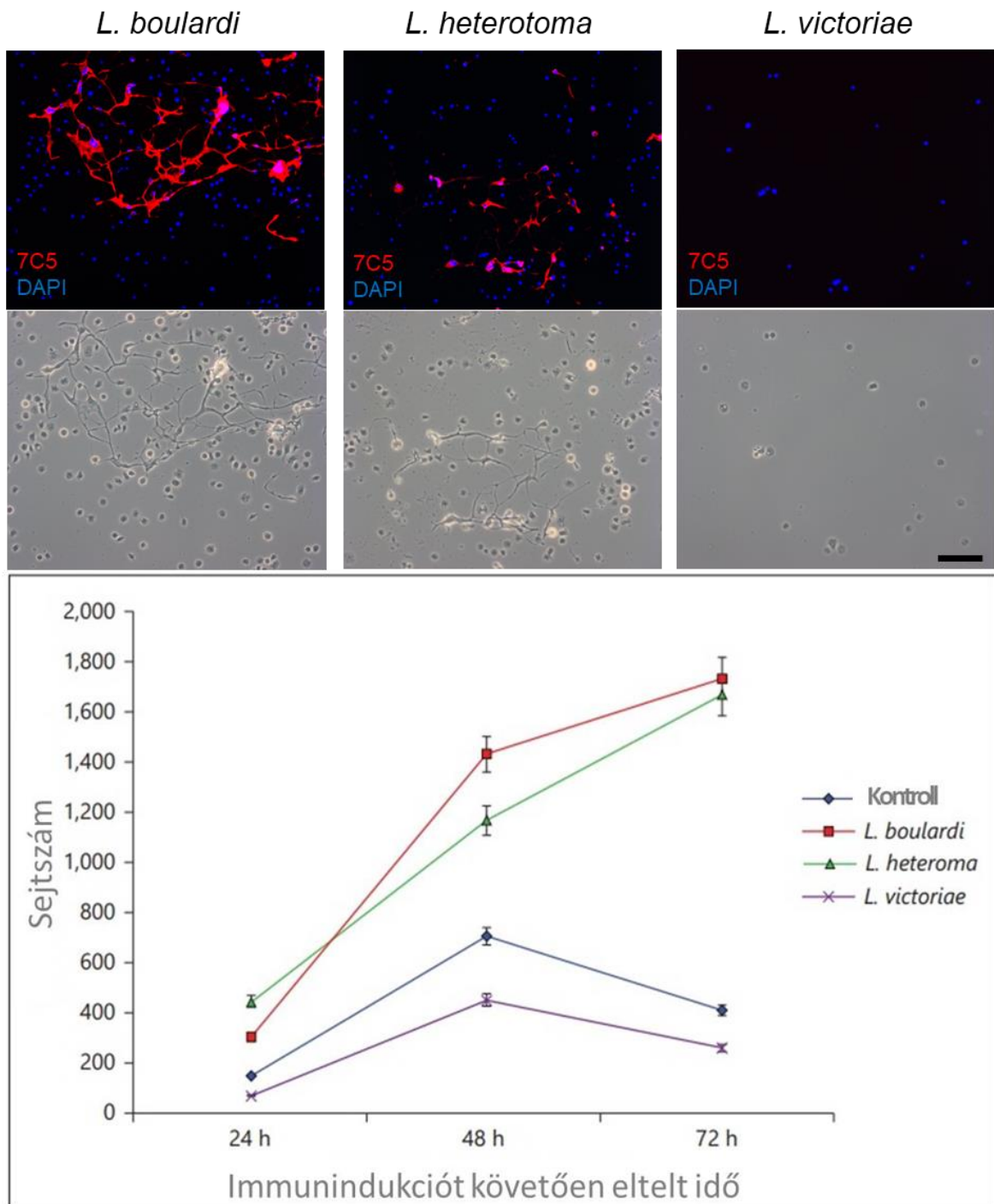
35. ábra Immunindukált és naiv lárvák vérsejtjeinek ex vivo fúziója. BrdU-val kezelt naiv lárvák és BrdU-val nem kezelt immunindukált lárvák vérsejtjei (A). BrdU-val nem kezelt naiv lárvák és BrdU-val kezelt, immunindukált lárvák vérsejtjei (B). A fehér nyilak a BrdU-val nem jelölt lárvákból származó sejteket jelölik, a fehér nyílhegyek a BrdU-val kezelt lárvákból származókat. DAPI: a sejtmagokat jelöli. Lépték: 50µm.

4.7. A sokmagvú óriássejtek differenciálódása különböző parazitoid darázsajok által történő immunindukciót követően

A *D. melanogaster* gazda-parazitoid kölcsönhatás vizsgálatok alapján ismert, hogy a gazda és a parazita számos különböző stratégiát alkalmaz annak érdekében, hogy a párharcból sikeresen kerüljön ki. [Prévost és mtsai., 2009; Small és mtsai., 2012]. A parazita részéről ennek egyik ismert folyamata a tokképzésben szerepet játszó immunsejtek differenciálódásának gátlása, és ezáltal a gazda sikeres immunválaszának megakadályozása. *D. ananassa*-nál a kezdeti kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy *L. boucardi* darázsajjjal szemben hatékony immunválasz alakult ki, a darázs nem volt képes kikelni a gazda bábból egyetlen esetben sem. A továbbiakban különböző gazda-specifitású *Leptopilina* fajokkal fertőztük a *D. ananassae* lárvákat és vizsgáltuk, hogy milyen hatékonysággal kelnek ki a darázsok. Azt tapasztaltuk, hogy a generalista *L. heterotoma* darázs nagyon kevés esetben (<2%) képes volt kikelni a bábból, míg a *L. victoriae* széles gazda-specifitású parazitoid, melynek egyik fő célpontját képezik az

ananassae alcsoport fajai, 20%-ban sikeres volt ebben a gazda-parazita viszonyban. Kíváncsiak voltunk arra, hogy ezen fajok sikerének hátterében milyen folyamatok állhatnak, ezért második stádiumú *D. ananassae* lárvákat fertőztünk a már említett darazsakkal és immunindukciót követően 72 órával vizsgáltuk a differenciálódott vérsejtek számát és morfológiáját.

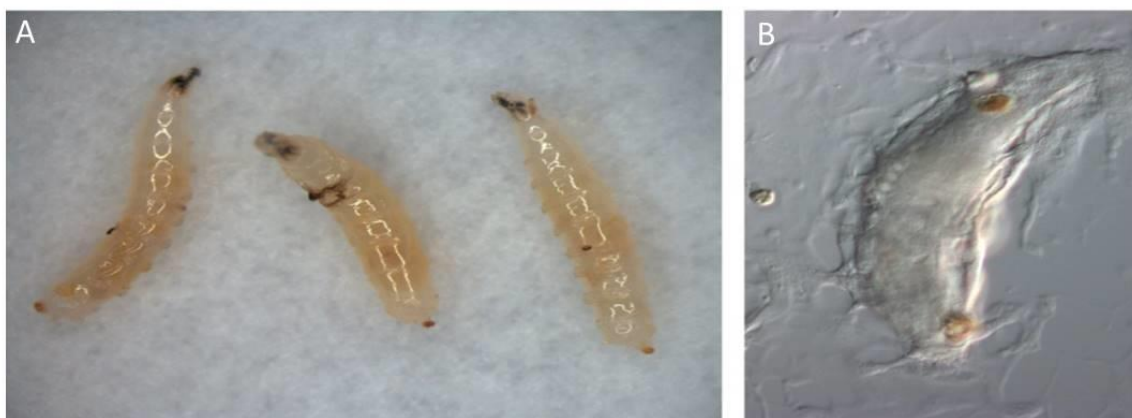
L. bouardi (a *melanogaster* alcsoport specialistája) fertőzést követően a kontrollhoz képest jelentősen megnövekedett vérsejtszámot és terminálisan differenciálódott óriássejteket figyeltünk meg (36. ábra). A generalista *L. heterotoma* fertőzés magas vérsejtszámot, de kevesebb differenciálódott óriássejtet eredményezett. *L. victoriae* fertőzést követően a vérsejtszám jelentősen lecsökkent, még a kontrollhoz képest is és nem differenciálódtak óriássejtek, csak nagyon kevés esetben figyeltünk meg 7C5 pozitív kis kerek, esetleg bipoláris sejteket (36. ábra). Ezek az eredmények igazolták, hogy a *L. heterotoma* és *L. victoriae* széles gazda-specifitású darazsak aktívan szupresszálják a gazda immunválaszát a sejtosztódás és óriássejt differenciálódás gátlásán keresztül.



36. ábra Különböző parazitoid darazsak vérsejtdifferenciálódásra gyakorolt hatása *D. ananassa*ban.
 Fent: a sokmagvú óriássejtek számában és morfológiájában tapasztalt különbségek *L. boulandi*, *L. heterotoma* és *L. victoriae* fertőzést követően 72 órával. Lent: a vérsejtszám alakulása immunindukciót követően 24, 48 és 72 órával a 3 darazsfajjal történt fertőzést követően, illetve a nem indukált (kontroll) lárvákban. Lépték: 50µm

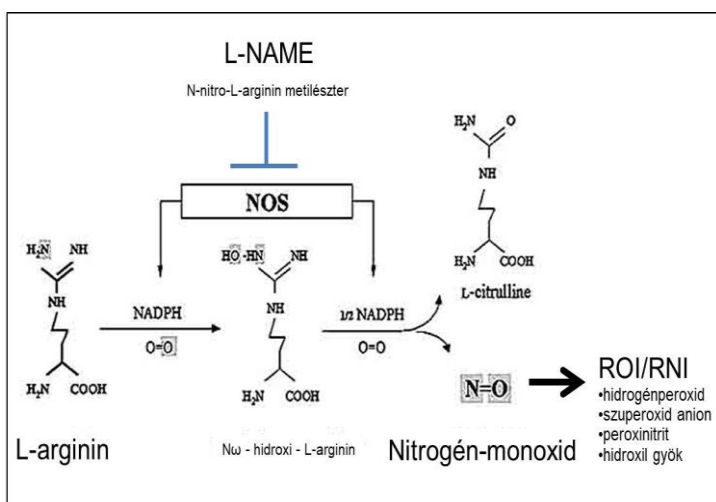
4.8. A *D. ananassae* hatékony immunválaszának háttérében álló mechanizmusok vizsgálata

A melanizációnak alapvető szerepe van az elsődleges immunválasz két folyamatában, a kutikulán keletkezett seb gyógyulásában és a tokképzés során. A reakció közben felszabaduló toxikus vegyületek hozzájárulnak a hatékony immunválasz kialakításához. Az *ananassae* alcsoportba tartozó fajok egyedeit vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a lárva kutikuláján keletkező mechanikai sérülés, például egy tűszúrás vagy parazitoid darázsszúrás helyén, megfigyelhető volt melanizáció (37. ábra A). Parazitoid darázsfertőzést követően a véresejtek többrétegű tokot képeztek a darázs petéje körül, azonban nem tapasztaltunk erős melanizációs reakciót (37. ábra B).



37. ábra Melanizáció a *D. ananassae* lárva kutikuláján, a sérülés helyén (A) és a tokképzés során (B).

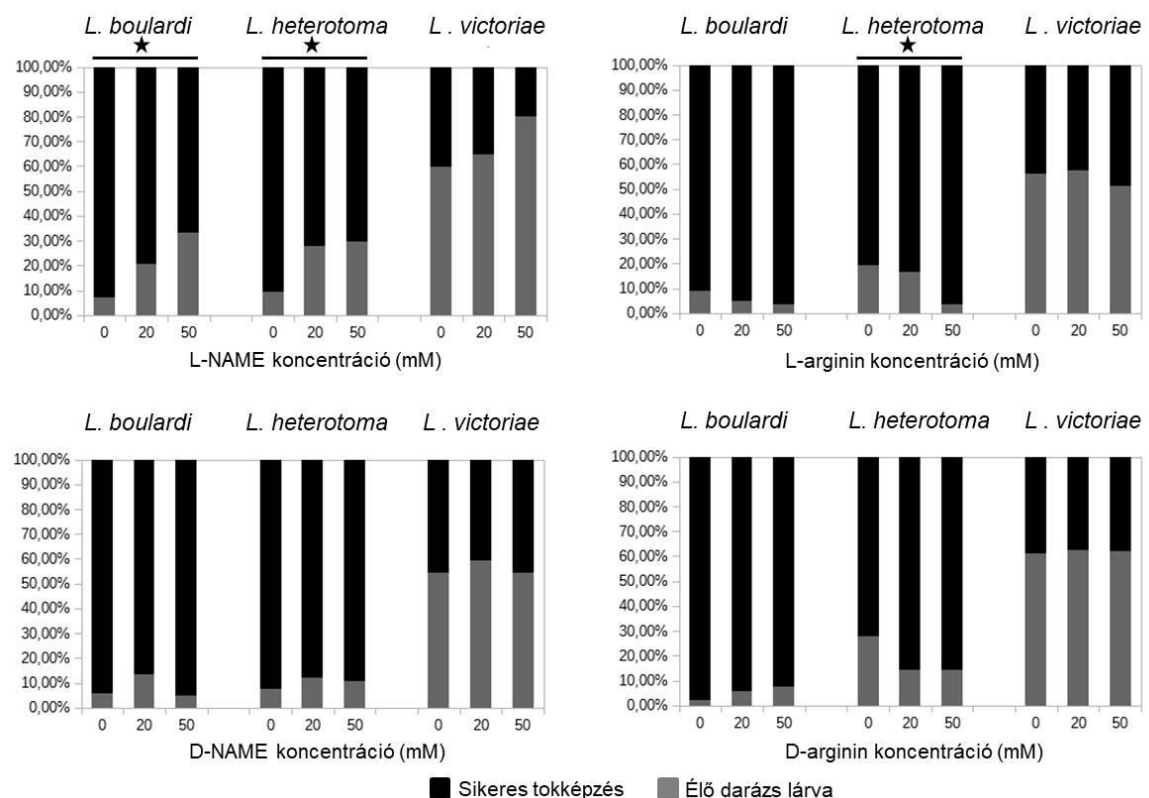
A toxikus melanin mellett egyéb mechanizmusok és mérgező vegyületek vehetnek részt a parazita pete hatékony elpusztításában. Ismert, hogy a különböző reaktív oxigén- és nitrogén formáknak (ROI és RNI) szerepe van a sikeres immunválasz kialakításában [Yang és mtsai., 2013; Eleftherianos és mtsai., 2014]. A NO (nitrogén-monoxid) kis molekulatömegű vegyület elsősorban szignálmolekulaként ismert, valamint részt vesz különböző erősen toxikus reaktív oxigén- és nitrogén vegyületek kialakításában. Annak



38. ábra A nitrogén-monoxid szintézis útvonala

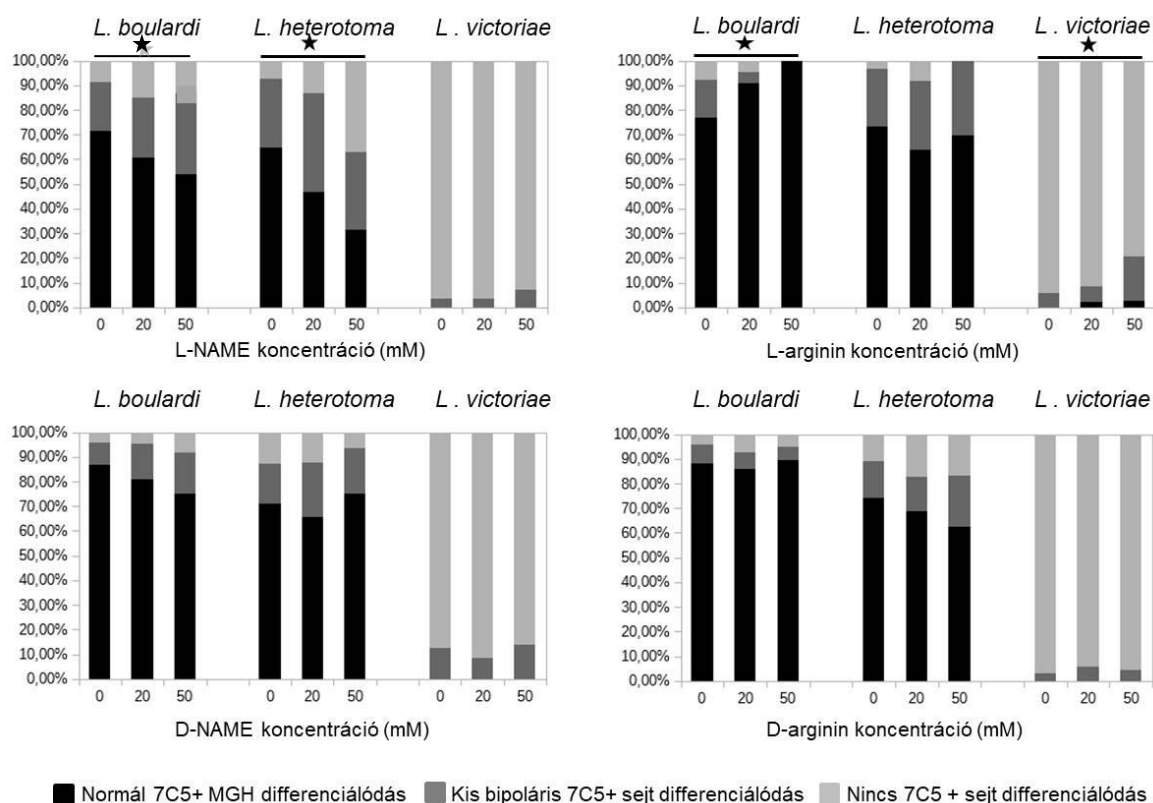
érdekében, hogy megvizsgáljuk a NO szerepét, mint a parazitoid darazsakkal szembeni hatékony immunválasz kialakításában lehetséges vegyületet, a *D. ananassae* lárvák táptalajába kevertük a NO szintézis útvonala

kiindulási anyagát, az L-arginin aminosavat és a NO szintézis kulcsenzimének, a NOS-nak (Nitrogén-monoxid szintáz) gátlószerét, az L-NAME-et (38. ábra), illetve mindkét vegyület inaktív izoformáját (D-arginin és D-NAME) is használtuk kontrollként. Kísérleteink során először a tokképzésre gyakorolt hatásukat vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a különböző parazitoid darázssal történt fertőzést követően 72 órával az L-NAME gátlószerrel kezelt lárvákban megnőtt az élő darázs lárv aránya az elpusztított, tokkal körülvett parazitoid peték/lárvák számával szemben. Az 50mM-os kezelés a kontrollhoz képest (0mM) szignifikáns eltrérést eredményezett a *L. boulandi* és a *L. heterotoma* darázsfertőzést követően (39. ábra). Az L-arginin kezelés éppen ellenkező hatással volt az élő és elpusztult darázslárvák arányára (39. ábra). A kontrollként használt D-arginin, ami a NO szintézisben nem játszik szerepet, kizárólag tápanyag és energia forrásként hasznosul a gazda számára, nem eredményezett változást a tokképzés tekintetében, egyik parazitoiddal szemben sem. Hasonlóan a D-NAME kontrollnál sem tapasztaltunk eltérést a kezelt és kezeletlen lárvák esetében (39. ábra).



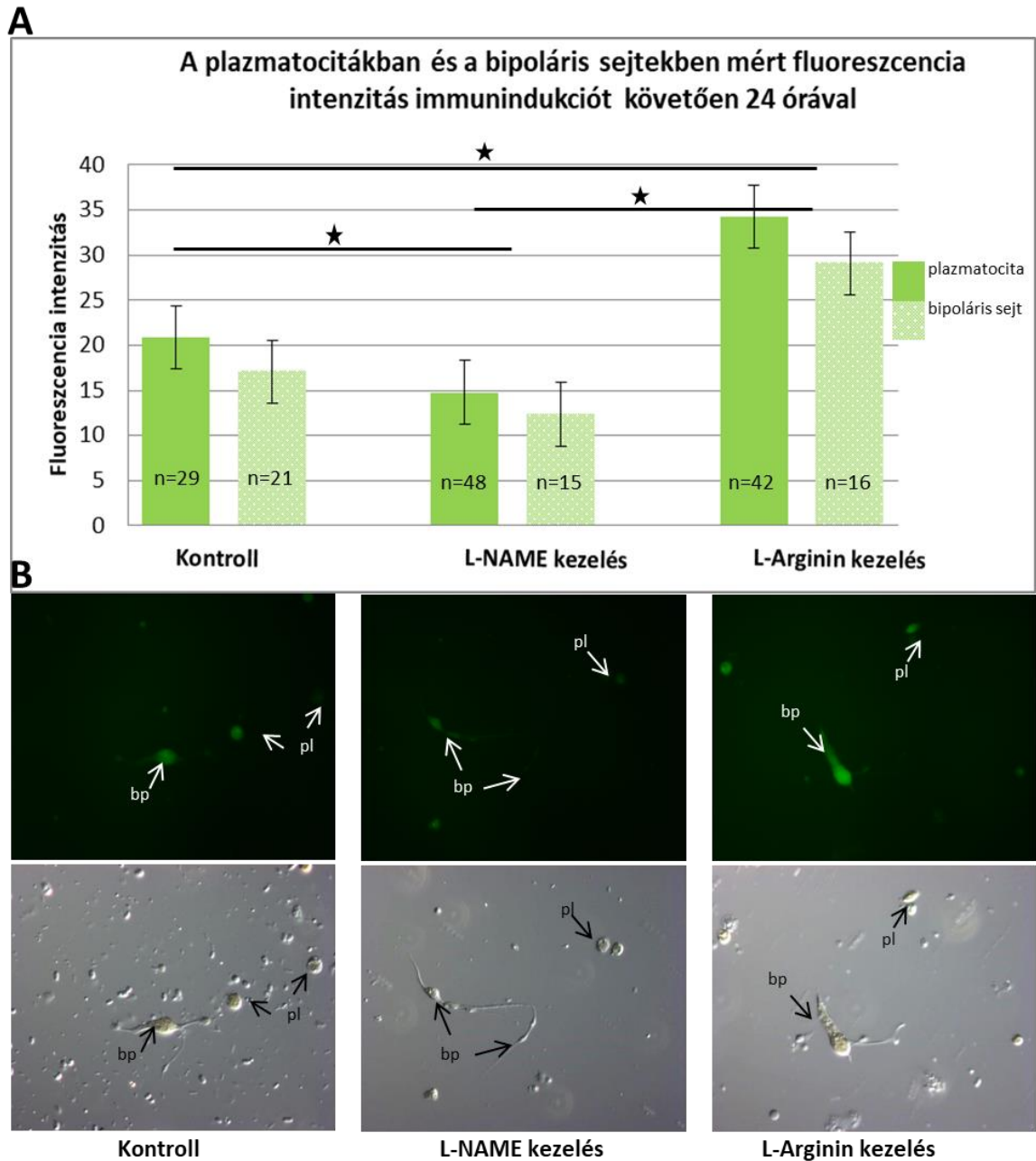
39. ábra Az L-NAME gátlószer és az L-arginin aminosav, valamint inaktív izomerjeik hatása a *D. ananassae* tokképzésére különböző parazitoid darázsfertőzés esetén. A csillagok a szignifikáns eltérést jelzik, $p < 0,05$.

A reaktív oxigén- és nitrogén vegyületek ismert funkció között szerepel a különböző szignalizációs útvonalak beindítása, az apoptózis indukálása, illetve hatással vannak a sejtsztódásra és differenciálódásra. Megvizsgáltuk, hogy *D. ananassae* esetében az immunindukciót követően beinduló sokmagvú óriássejt differenciálódásra hatással van-e az L-NAME és L-arginin kezelés. A differenciálódó sejteket 3 kategóriába soroltuk. Feljegyeztük azokat az eseteket, ahol nem láttunk 7C5 pozitív sejteket, tehát nem keletkeztek sokmagvú óriássejtek, illetve ahol kis, egymagvú bipoláris, 7C5 pozitív sejtek már voltak a keringésben, valamint azokat az eseteket, ahol normális, 7C5 pozitív sokmagvú óriássejt struktúrát azonosítottunk. Az L-NAME koncentráció növelésével lecsökkent azoknak az egyedeknek a száma, amelyekben normális sokmagvú óriássejt differenciálódást történt, míg az L-arginin kezelés óriássejt differenciálódást indított be, a *L. victoriae* darázsfertőzést követően is megjelentek a sokmagvú óriássejtek (40. ábra). A kontrollként használt D-NAME és D-arginin nem voltak hatással a vérsejt differenciálódásra.



40. ábra Az L-NAME gátlószer és az L-arginin aminosav, valamint inaktív izomerjeik hatása a *D. ananassae* sokmagvú óriássejtjeinek differenciálódására különböző parazitoid darázsfertőzés esetén. A csillagok a szignifikáns eltérést jelzik, $p < 0,05$.

Mindezen eredmények arra utaltak, hogy a NO szintézis következményeként keletkező reaktív oxigén- és nitrogén intermedierek hatással lehetnek a sokmagvú óriássejtek differenciálódására és a tokképzés sikerére. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk van-e valamelyik sejttípusnak kitüntetett szerepe a megnövekedett NO szintézisben, megmértük a vérsejtek intracelluláris NO szintjének változását a különböző kezelések hatására. Erre a DAF-FM Diacetát reagenst használtuk, ami inaktív formájában a sejtmembránon keresztül képes bejutni a vérsejtekbe, majd az intracelluláris NO-dal kölcsönhatásba lépve fluoreszcens benzotriazollá alakul. A fluoreszcencia intenzitás mértéke az intracelluláris NO szinttel korrelál, és a jel detektálható epifluoreszcens mikroszkóppal. Azt tapasztaltuk, hogy immunindukciót követően 24 órával a fluoreszcencia intenzitás a kontroll mintákhoz képest megnövekedett az L-arginin, és csökkent az L-NAME kezelés hatására a vérsejtekben, de a plazmatocitákban és a nyúlványos sejtekben mért jelintenzitás között nem volt szignifikáns különbség (41. ábra).



41. ábra A plazmatociták és a nyúlványos bipoláris sejtek NO szintézisének intenzitása immunindukciót követően 24 órával L-NAME és L-arginin kezelést követően. Az intenzitás a DAF-FM DA reagens és az intracelluláris NO kölcsönhatásának következményeként felszabaduló benzotriazol fluoreszcencia intenzitása alapján mértük Image J programmal. Az intenzitás értékeit egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze. Az eltérő kezelési csoportok közötti szignifikanciát ($p \leq 0,05$) Tukey tesztel állapítottuk meg.

5. Az eredmények megvitatása

A veleszületett immunitás sejt-közvetítette folyamatának vizsgálatára kitűnő modellorganizmus az ecetmuslica, melynek effektor vérsejtjei, vérsejtképző kompartmentumai és a sejtek differenciálódásának folyamata részletesen jellemzett. Kezdetben a vérsejtek morfológiai elkülönítése, majd később az immunválaszban betöltött funkciójuk vált a kutatások fő tárgyává [Rizki, 1957; Rizki és Rizki, 1990; Carton és Nappi, 1997]. A fagocitózis speciális effektor hemocitái a plazmatociták minden eddig vizsgált *Drosophila* fajban általánosan jellemző vérsejtek. A tokképzés effektor sejtjei a lamellociták ugyan a *melanogaster* alcsoport minden fájára jellemzőek, de közel sem nevezhetőek általános tokképző sejtnak a *Drosophila* génuszban. Az *obscura* csoport fajainak nagy részéből teljesen hiányoznak a lamellociták, míg néhány fajban leírtak egy ún. pszeudopodocita sejtet, ami morfológiailag a plazmatocitákra hasonlít, de a lamellociták tokképző funkcióját látja el [Havard és mtsai., 2012]. A *repleta* és *virilis* csoport fajaiban, valamint a *Zaprionus indianus* fajban a lamellociták mellett nematocitákat, egymagvú nyúlványos sejteket azonosítottak, melyeknek szintén a tokképzésben írták le szerepét [Kacsoh és mtsai., 2014; Bozler és mtsai., 2017].

A *melanogaster* csoport, *ananassae* alcsoportjának fajait vizsgálva, azonosítottunk egy eddig ismeretlen vérsejt típust, amit sokmagvú óriássejtnak neveztünk el. A dolgozatomban bemutatott kísérleteink során célul tűztük ki az újonnan azonosított vérsejttípus szerkezeti vizsgálatát, valamint elsődleges immunválaszban betöltött funkciójának és differenciálódásának részletes jellemzését az alcsoport névadó fájában a *Drosophila ananassaeban*.

Az elektronmikroszkópos szerkezeti vizsgálatok bizonyították, hogy a sokmagvú óriássejtek valódi sokmagvú struktúrák, hiszen a magvak között sejtmembránt nem azonosítottunk, szerkezetük az emlős sokmagvú sejtekkel (MGC: Multinucleated Giant Cells) mutat hasonlóságot [Milde és mtsai., 2015]. Az azonosított extracelluláris lakunáris labirintus rendszer a plazmamembrán betűrődései és a mikrovillusok révén óriási sejtfelszínt hoz létre, amelynek az intenzív metabolikus folyamatok mellett szerepe lehet az óriássejtek kitekeredésében és aktív mozgásában, amit az *ex vivo* videomikroszkópos vizsgálataink is alátámasztanak. A citoplazmában található nagyszámú szabad riboszóma arra utal, hogy a sejt saját maga számára nagy mennyiségben termel fehérjéket, (pl. glükózsintézishez elengedhetetlen enzimeket) amelyeket a mozgáshoz és nyúlvány növesztéshez használhat fel. A parazitoid petén a sokmagvú óriássejt és a pete

találkozásánál megfigyelhető sötét réteg az emlős MGC-k denz amyloid rétegével mutat hasonlóságot [Milde és mtsai., 2015]. A *Heliothis virescens* (Lepidoptera) faj esetében leírták, hogy a vérsejtek által termelt amyloid vékony rétegben körülveszi a testidegen részecskék felszínét és elősegíti a lokális melanin szintézist, illetve a vérsejtek kitapadását a tokképző reakció során [Falabella és mtsai., 2012; Grimaldi és mtsai., 2012]. A *D. ananassae* tokképző reakciója során ugyan a parazitoid pete egészén szabad szemmel és fénymikroszkóppal nem látható melanizáció, az elektronmikroszkóppal detektálható denz réteg mégis bizonyos fokú melanizációs reakcióra utalhat, ami kizárólag a pete közvetlen felszínére korlátozódik.

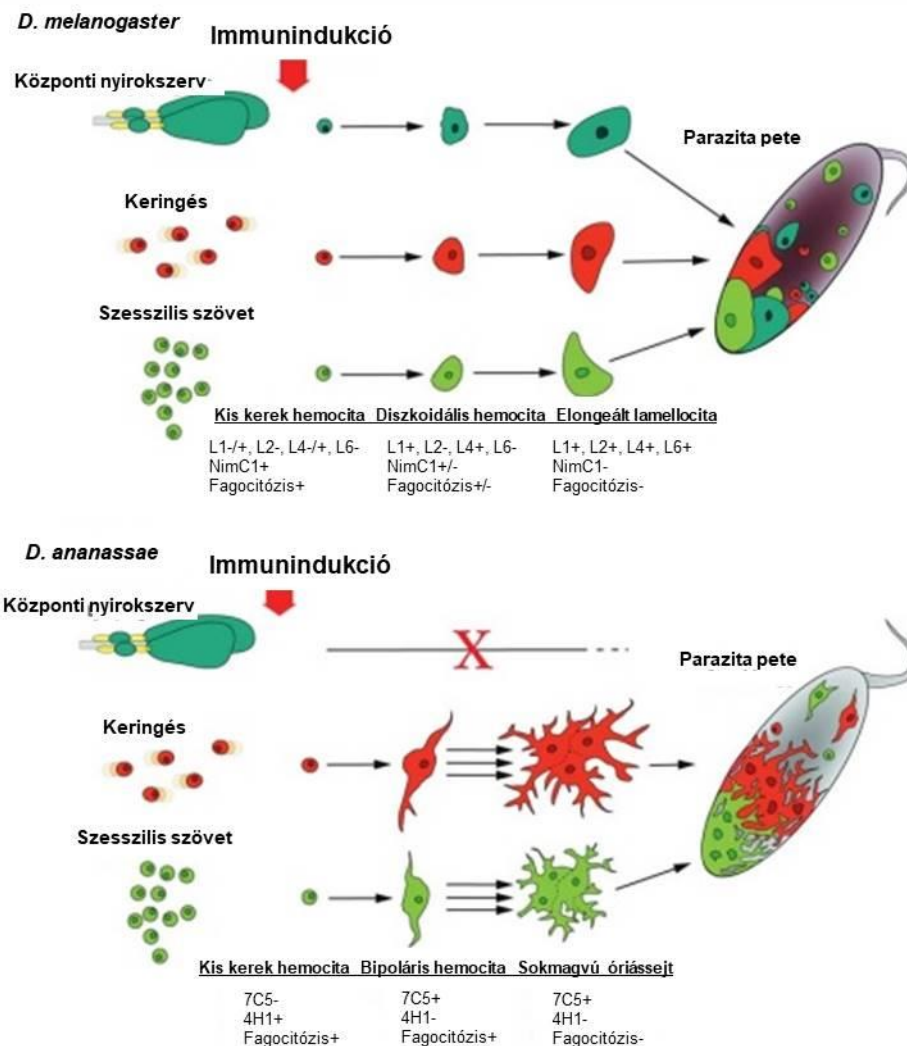
A csoportunk által korábban létrehozott immunológiai markerek segítségével az ecetmuslicában jól elkülöníthetővé váltak a különböző hemocita alpopulációk és vizsgálhattuk azok kompartmentális eredetét, illetve funkcióját [Kurucz és mtsai., 2003; 2007a,b; Zettervall és mtsai., 2004; Márkus és mtsai., 2009]. A vérsejt-specifikus markerek használata egyéb rovarok, mint pl: a mézelő méh esetében is hozzájárultak az elsődleges immunfolyamatok részletes megismeréséhez [Gábor és mtsai., 2017; 2020]. Ezt a vizsgálati megközelítést követve létrehoztunk egy *D. ananassae* vérsejt specifikus molekuláris markerrendszert, amelynek segítségével három vérsejttípust különítettünk el: a naiv lárvában plazmatocitákat és kristálysejteket, míg parazitoid darázsfertőzést követően, az előbbi kettőn kívül, a sokmagvú óriássejteket. Megállapítottuk, hogy a plazmatociták aktívan részt vesznek a baktériumok fagocitózisában, míg a terminálisan differenciálódott sokmagvú óriássejtek nem képesek bekebelezni a baktériumokat.

A *D. melanogaster* faj esetében ismert, hogy immunindukciót követően a plazmatocitákból differenciálódó átmeneti sejtek még fagocitáló sejtek, majd a terminálisan differenciálódott lamellociták elveszítik ezen funkciójukat [Honti és mtsai., 2010, 2014]. A differenciálódás során végbemenő morfológiai és funkcionális változásokat megvizsgálva *D. ananassae* esetében is azt tapasztaltuk, hogy immunindukciót követően korai időpontban, a már óriássejt markert kifejező, de még egymagvú sejtek képesek a fagocitózisra, a későbbi időpontokban kialakuló sokmagvú sejtek azonban már nem rendelkeznek ezzel a funkcióval (42. ábra). A sokmagvú óriássejtek a parazitoid petéje körüli tok kialakításában vesznek részt, tehát funkcionálisan az eddig vizsgált *Drosophila* fajok tokképző sejtjeinek felelnek meg [Rizki és Rizki, 1992; Havard és mtsai., 2012; Bozler és mtsai., 2017].

Annak érdekében, hogy a sokmagvú óriássejtek kialakulását és kompartmentális eredetét még részletesebben, akár az élő lárvában is vizsgálni lehessen, létrehoztunk

transzgenikus *D. ananassae* vonalakat. A beépült konstruktok *Hml* és *Pxn* vérsejt-specifikus promóter régiók által közvetlenül meghajtott *in vivo* riportert (GFP) tartalmaztak. A *Hml*-GFP esetében a promóter régió *D. melanogaster* eredetű volt, míg a *Pxn* esetében *D. ananassae* genomszekvenciából származott. A *Hml*-GFP a naiv lárva keringő vérsejtjeinek 25%-ban fejeződött ki, immunindukciót követően a sokmagvú óriássejtekben pedig egyedi mintázatot figyelhettünk meg. A sejtek tartalmaztak GFP pozitív és negatív régiókat egyaránt. A *D. melanogaster* esetében a terminálisan differenciálódott lamellocitákban a *Hml* promóter nem aktív. A központi nyirokszervben megfigyelt expressziós mintázat is jelentősen eltért a *D. melanogaster* esetében tapasztaltaktól. A *D. ananassae* központi nyirokszervében az elsődleges és másodlagos lebenyek minden sejtje jelölődött, valamint a perikardiális sejtek is. Az elsődleges lebenyben nem tudtunk elkülöníteni kortikális (érett hemocitákat tartalmazó) és medulláris (prohemocitákat tartalmazó) zónát, míg *D. melanogaster*-nél a *Hml*-GFP a kortikális zóna vérsejtjeire korlátozódik. A *Pxn*-GFP kifejeződés csak a keringésben jelen lévő sejtek 15%-ban volt észlelhető, a jel megmaradt a sokmagvú óriássejtekben is, a központi nyirokszervben egységes mintázatot mutatott az elsődleges és másodlagos lebenyben. Mindkét transzgén kijelölte a szesszilis szövet sejtjeit. Immunindukciót követően mind a *Hml*-GFP mind a *Pxn*-GFP jel fennmaradt a központi nyirokszervben, annak szerkezete nem változott meg, az elsődleges lebeny is ép maradt. 7C5 óriássejt-specifikus marker pozitív sejtek csak a keringésben és a szesszilis szövetben voltak detektálhatóak immunindukciót követően, a központi nyirokszervben nem differenciálódtak óriássejtek. Mindezen eredmények arra utaltak, hogy a *D. melanogaster*-től eltérően, ahol mindhárom vérsejtképző kompartmentum hozzájárul az immunindukciót követően képződő tokképző sejtek differenciálódásához [Honti és mtsai., 2010; Avet-Rochex és mtsai., 2010; Stofanko és mtsai., 2010], a *D. ananassae* faj esetében a központi nyirokszerv darázsfertőzést követően is ép marad, onnan tokképző sejtek nem származnak. A jelenség hátterében álló mechanizmus felderítésére megvizsgáltuk a Collier transzkripciós faktor kifejeződését a központi nyirokszerv lebenyeiben a naiv és immunindukált állatban. A Collier felelős az elsődleges lebeny intakt állapotának fenntartásáért, hiánya a vérsejtek korai differenciálódásához vezet [Crozier és mtsai., 2004; Krzemien, 2010]. Azt tapasztaltuk, hogy a naiv *D. ananassae* lárva központi nyirokszervében, az elsődleges és másodlagos lebenyek majdnem minden sejtje kifejezi a Collier-t és ez a mintázat immunindukciót követően is fennmarad. *D. melanogaster* lárvákban, korai stádiumban, a Collier mintázata az elsődleges lebeny minden zónájára kiterjed, majd a késői 3. stádiumú lárvában csak a

PSC-re korlátozódik. Immunindukciót követően pedig az elsődleges lebeny szétesik, a jel csak a PSC néhány megmaradt sejtjében detektálható. A *D. ananassae* központi nyirokszervében konstans módon fennálló Collier expressziós mintázat következményeként, ez a vérsejtképző kompartmentum nem vesz részt az immunválaszt kialakító sejtek differenciálódásában. Elsődleges lebenye nem különül kérgi és medulláris zónára, szerkezete immunindukciót követően is intakt marad (40. ábra). A legújabb kutatások kimutatták, hogy a Collier nem csupán a PSC-ben hanem a medulláris zóna ún. core progenitor sejtjeiben is kifejeződik [Oyallon és mtsai., 2016]. Mindezek alapján a *D. ananassae* központi nyirokszervének minden lebenye feltételezhetően éretlen, progenitor sejteket tartalmaz és szerepe a metamorfózishoz és adult stádiumhoz szükséges vérsejtek biztosítása lehet.



42. ábra A *D. melanogaster* és a *D. ananassae* effektor vérsejtjeinek kompartmentális eredete és funkciója. A modell az immunindukciót követően differenciálódó sejteket és azok morfológiai, funkcionális és marker expressziós változásait mutatja. [Márkus és mtsai., 2015. alapján]

A sokmagvú sejtstruktúra kialakulása fiziológiai körülmények között történhet sejtfúzióval, ekkor ún. valódi szincícium jön létre, vagy a sejtmagok osztódásával, amelyet nem követ sejtosztódás (cönociták). Sejtfúzióval keletkező sokmagvú óriássejtek például az emlősök granuloma sejtjei [Sibley, 1890; Lambert, 1912], melyek makrofágok fúziójával keletkeznek és kialakulhatnak valamilyen mikrobiális fertőzés következtében, mint pl.: a Langhans típusú óriássejtek (nekrotizáló granulómák) [Ulrich és Kauffmann, 2006] vagy krónikus gyulladás hatására. Másik típusuk valamilyen idegen test (pl. sebészeti fonál) körül formálódik (idegentest-típusú granulómák) [Davies, 1932]. Szintén sokmagvú sejtek az oszteoklasztok [Geddes, 1913; Hancox, 1946], illetve a növények tapétum sejtjei, amelyek azonban endoreduplikációval vagy endomitózissal jönnek létre [Polowick, 1993]. Cönocita típusú sokmagvú sejtek a gombákban jellemzőek. Vizsgálataink során kiderült, hogy az *ananassae* alcsoport összes fajára jellemzőek a sokmagvú óriássejtek, illetve csoportunk vizsgálatai alapján bebizonyosodott, hogy a korábban nematocitaként leírt sejtek [Kacsoh és mtsai., 2014] a *Z. indianus* fajban, szintén képesek sokmagvú óriássejt struktúrákat létrehozni [Cinege és mtsai., 2020]. A *D. ananassae* esetében az anti-foszfohiszton H3 osztódási markert expresszáló sokmagvú óriássejtek hiánya arra utalt, hogy a kialakulás hátterében a fúzió áll. Ennek vizsgálatára olyan rendszert hoztunk létre, ahol BrdU-val jelölt magvú és nem jelölt magvú egyedek véresejtjeit fuzionáltattuk *ex vivo*, tárgylemezen. Az inkubációs időt követően olyan sokmagvú óriássejteket figyeltünk meg, melyek citoplazmájukban BrdU pozitív és negatív sejtmagokat egyaránt tartalmaztak. Ezek az eredmények, illetve az *in vivo* videó mikroszkópos vizsgálatokon látott sejtfúziós folyamatok alapján, a sokmagvú óriássejtek egymagvú aktivált plazmatociták fúziójával keletkeznek, hasonlóan az emlősök sokmagvú óriássejtjeihez, amelyek szintén makrofágok fúziójának eredményeként jönnek létre fertőzést követően [Davies, 1932]. A csoportunk által, a *Z. indianus* fajban azonosított sokmagvú óriássejtek esetében szintén bebizonyosodott, hogy a sejtfúzió fontos szerepet játszik kialakulásukban [Cinege és mtsai., 2020].

A sokmagvú óriássejtek gazda-parazita kölcsönhatásait vizsgálva megállapítottuk, hogy a tokképzés effektor sejtjeinek differenciálódása a gazda sikeres immunválaszának fontos eleme. Azok a parazitoid darazsak, amelyek valamilyen aktív módon gátolták a sokmagvú óriássejtek differenciálódását (*L. heterotoma* és *L. victoriae*), vagy az összsejtszám drasztikus csökkenését idézték elő (*L. victoriae*) képesek voltak kikelni a *D. ananassae* bábból. A *L. heterotoma* generalista darázs *D. melanogaster* esetében a tokképző sejtek morfológiai változását, bipoláris lamellociták kialakulását idézi elő, ezáltal

a sejtek nem képesek kialakítani a többrétegű tokot [Ritzki és Ritzki, 1984; 1990a; 1990b; 1994]. Kísérleteink szerint *D. ananassaenál* az óriássejtek méretének és számának csökkenését eredményezte a *L. heterotoma* fertőzés. A *L. victoriae* széles gazdaspecifitású darázs *D. melanogaster* esetében olyan változást okoz a lamellociták membránjában, ami azok összetapadását eredményezi, és így a tokképzést megakadályozza [Mortimer és mtsai. 2012], valamint leírták, hogy a darázs által bejuttatott VLP-k (vírus-szerű részecskék) a központi nyirokszerv sejtjeiben és a keringő vérsejtekben is apoptózist indukálnak [Chiu és Govind, 2002]. Az általunk, *D. ananassae* esetében kapott eredmények szerint a plazmatociták egyáltalán nem képesek sokmagvú sejtekké fuzionálni és számuk is drasztikusan lecsökken, így a *L. victoriae* által termelt toxin valamilyen aktív módon a sejtek pusztulását vonja maga után.

Az többsejtű paraziták elleni immunvédekezés módja rovarokban a vérsejtek által kialakított, többrétegű tok képzése az idegen test körül. A rovarok nagy többségénél a reakció melanizáció kíséretében zajlik le (pl.: *Drosophila melanogaster* alcsoport), de ez nem univerzális jelenség a sejtes immunválasz során [Nappi és Vass, 1993]. Néhány *Drosophila* fajban a patogén sorsa független a melanizációtól (pl.: *D. paramelanica*) [Carton és mtsai., 2009]. Ezekben a fajokban kiemelt szerepe van a reaktív oxigén- és nitrogén intermediereknek [Whitten és mtsai., 2001]. A szuperoxid anion vagy a hidrogén-peroxid olyan reaktív vegyületek, melyek egymással és egyéb ionokkal kölcsönhatásba lépve (klorid ion, nitrogén-monoxid) erősen toxikus molekulákat hoznak létre (hidroxil-gyök, peroxinitrit, hipoklórossav), amelyek a szövetek károsodásához vezetnek, ezért fontos, hogy szorosan a kialakuló tok környezetében fejtsék ki hatásukat, elzárva a testüreg többi szövetétől. A *D. ananassae* melanizációs folyamatait megvizsgálva láttuk, hogy a kutikula sérülés helyén rendben végbemegy a reakció, de a parazitoid petéje körül kialakult tok látszólag nem melanizálódik. A folyamatban részt vevő proPO-k részletes vizsgálata rávilágított, és részben magyarázta is a jelenség hátterét, miszerint a proPO1 és proPO2 a kristálysejtekből felszabaduló profenoloxidázok minden *Drosophila* fajban jelen vannak, addig a lamellociták által termelt proPO3 csak a *melanogaster* alcsoport fajaiban jellemző. [Dudziec és mtsai., 2015]. A proPO1 a seb körüli melanizáció kialakításáért felelős, míg a proPO2,3 a tok melanizációjáért.

A *D. ananassae* sikeres immunválaszának hátterében álló mechanizmusok nem ismertek, ezért megvizsgáltuk, hogy a NO szerepet játszik-e a folyamatban. A NO kis méretű, nagyon reaktív molekula, így számos biológiai folyamatban szignálmolekulaként funkcionál [Bredt és Snyder, 1994]. Szintézisének kulcsenzime a nitrogén-monoxid-

szintáz, amit *Drosophilában* egyetlen gén, a dNOS kódol [Stasiv és mtsai., 2001]. Az irodalomban széleskörűen jellemzett a NO immunválaszban betöltött funkciója [Bogdan, 2001; Foley és O'Farrell, 2003]. Az L-arginint, mint a NO szintézis forrását írták le, és bizonyították szerepét az immunválasz hatékonyságának elősegítésében [Bruckdorfer, 2005; Luckhart és mtsai., 1998]. Mivel a NO és intermedierei könnyen reakcióba lépnek egymással és egyéb reaktív molekulákkal, hozzájárulhatnak olyan toxikus vegyületek képzéséhez, amelyeknek a melanizáció mellett szerepük lehet a patogénekkal szembeni immunválaszban [Nappi és Christensen, 2005; Lushchak, 2011]. Kísérleteinkben a *D. ananassae* lárvákat különböző koncentrációjú L-argininnal és a NOS gátlószerével L-NAME-mel etettük, majd a tokképzésre és a sejtdifferenciálódásra gyakorolt hatásukat vizsgáltuk három parazitoid darázfajjal szemben. Az L-arginin növelte, míg az L-NAME csökkentette a tokképzés arányát. Az enkapszuláció effektor sejtjeire, a sokmagvú óriássejtek differenciálódására is hatással voltak a kezelések. Az L-arginin fokozott sejtdifferenciálódást eredményezett, az L-NAME pedig éppen ellenkező hatással volt. Eredményeink nagymértékű hasonlóságot mutatnak e téren a *D. melanogaster* és az *Asobara tabida* parazitoid darázs kölcsönhatásánál tapasztaltakkal [Kraaijeveld és mtsai., 2011]. Abban a kísérletsorozatban azonban kimutatták, hogy az L-arginin hatására a lamellocitákban növekedett meg a NO szintézis és a plazmatocitákban a különböző kezelések hatására nem változott szignifikánsan. Kísérleteinkben mi is kimutattuk az L-arginin hatására megnövekedett NO szintet a sejtekben, de a plazmatociták és a sokmagvú sejtek esetében nem tapasztaltunk jelentős eltérést, tehát úgy gondoljuk a NO és toxikus intermedierei inkább a sejtdifferenciálódást beindító szignálként szolgálnak, mintsem a parazitoid elpusztításában közvetlenül szerepet játszó vegyületként.

6. Összefoglalás

A rovarok hatékony - humorális és sejközvetítette folyamatokból felépülő - veleszületett immunválasszal rendelkeznek, ami védelmet nyújt számukra a fertőzésekkel szemben. A *Drosophila* fajokban, speciális effektor sejtek, a hemociták vesznek részt a mikroorganizmusok és paraziták elpusztításában. A *melanogaster* alcsoport fajaiban, három funkcionálisan és morfológiailag eltérő vérsejt ismert. A plazmatociták fagocitáló sejtek, valamint antimikrobiális peptideket és extracelluláris mátrix fehérjéket termelnek, ezen kívül a tokképzés inicializálásában vesznek részt. A kristálysejtek citoplazmájukban profenoloxidáz kristályokat tartalmaznak és a sérülés helyén, valamint a parazitoid darázs petéje körüli tok melanizációjában vesznek részt. A lamellociták immunindukciót követően differenciálódó sejtek és a tokképzésben van szerepük. Az immunválasz során mindhárom vérsejtképző kompartmentum, a központi nyirokszerv, a szesszilis vérképző szövet és a keringés is részt vesz az effektor sejtek differenciálódásában. A *D. melanogaster* vérsejtképző kompartmentumai, effektor vérsejtjei és azok differenciálódása jól jellemzett, azonban egyéb *Drosophila* fajok veleszületett immunválaszáról és vérsejtképzéséről az irodalomban csak nagyon kevés adat ismert.

Kísérleteink során különböző, az *ananassae* alcsoportba tartozó faj vérsejtjeit vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy ezekben a fajokban a parazitoid darázssal történt immunindukciót követően egy eddig ismeretlen vérsejt típus differenciálódik, amit sokmagvú óriássejtnak (MGH: Multinucleated Giant Hemocyte) neveztünk el. Szintén megfigyeltük, hogy ezekben a fajokban a parazitoid darázs ellen rendkívül hatékony immunválasz alakul ki, azonban a tokképzés nem jár melanizációval. PhD munkám során célul tűztem ki az *ananassae* alcsoport reprezentatív faja, a *Drosophila ananassae* veleszületett immunválaszáinak részletes vizsgálatát.

Vérsejt-specifikus monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő és azonosítottunk pánhemocita (19F6), plazmatocita-specifikus (pl. 4H1) és óriássejt-specifikus (pl. 7C5) markereket. A korábban már leírt proPO2-t felismerő 12F6 ellenanyag ebben a fajban is a fénytörő kristálysejtekre volt specifikus. Ezek segítségével három effektor vérsejttípust különítettünk el a *D. ananassae* lárvában. A naiv lárv keringésében 4H1 pozitív plazmatociták és kis mennyiségben 12F6 pozitív kristálysejtek vannak jelen, míg immunindukciót követően, a már említett két vérsejttípus mellett 7C5 pozitív sokmagvú óriássejtek differenciálódnak. Ezen felül létrehoztunk egy PiggyBac transzpozon alapú, *in vivo* transzgenikus rendszert, amely lehetőséget adott a vérsejtek és vérsejtképző

kompartmentumok további tanulmányozására. A két vizsgálati rendszer segítségével megállapítottuk, hogy a sokmagvú óriássejtek immunindukciót követően plazmatocitákból differenciálódnak óriássejteké. A folyamat során morfológiájuk és funkciójuk is megváltozik. Parazitoid fertőzést követően 24 órával az egymagvú, 7C5 pozitív, kis nyúlványos sejtek még a plazmatocitákhoz hasonlóan fagocitáló sejtek, azonban későbbi időpontokban (48, 72h) a többmagvú, terminálisan differenciálódott óriássejtek már nem képesek a baktériumok bekebelezésére. Ezek a sejtek a parazitoid darázs petéje körüli tok képzésében vesznek részt. A plazmatociták ezen faj esetében is a tokképzés kezdeti lépéseiben játszanak szerepet. A sokmagvú óriássejt struktúra egymagvú sejtek összeolvadásával jön létre. A sokmagvú óriássejtek a keringésben és a szesszilis szövetben differenciálódnak, a központi nyirokszerv nem vesz részt kialakulásukban. A központi nyirokszerv elsődleges lebenyei immunindukció hatására nem bomlanak fel, ez a vérképző szerv feltételezhetően a metamorfózishoz biztosítja a sejteket.

Az elektronmikroszkópos szerkezeti vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a sokmagvú óriássejtek egyedi struktúrájú sejtek, extracelluláris lakunáris hálózattal, és a fokozott metabolikus aktivitásra utaló sejtorganellumokkal rendelkeznek. Valódi sokmagvú struktúrák, egyetlen óriássejt citoplazmáján belül számos sejtmag található, amelyek között nem húzódik plazmamembrán. *Ex vivo* videó mikroszkópos eredményeink is a rendkívüli mozgékonytságot és aktivitást támasztják alá, ugyanis a tárgylemezen 45 perc alatt végbemenő folyamatok során a sejtek kitekerednek, nyúlványokat növesztenek, fuzionálnak egymással és nyúlványaikat esetenként el is veszítik.

A gazda-parazita kölcsönhatás vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a *melanogaster* alcsoport fajaira specialista *L. boulandi* darázsfertőzést követően a keringő vérsejtek száma jelentősen megnőtt a lárvában és szinte minden esetben differenciálódtak sokmagvú óriássejtek. A gazda bábból egyetlen esetben sem kelt ki darázs. A generalista *L. heterotoma*-val szemben szintén jelentős vérsejtszám növekedést tapasztaltunk, de sokmagvú óriássejtek csak az esetek felében differenciálódtak. A szintén generalista *L. victoriae* fertőzést követően nagyon alacsony vérsejtszámot tapasztaltunk és nem differenciálódtak óriássejtek. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a két generalista parazitoid darázs faj, képes a sokmagvú óriássejtek differenciálódásának gátlására (*L. heterotoma*) vagy akár a vérsejtek elpusztítására (*L. victoriae*). A sokmagvú óriássejtek differenciálódásának gátlása tehát a parazitoid sikerének egyik fontos eleme.

A melanizációnak fontos szerepe van a kutikula sérülés helyén és a parazitoid darázs petéje körüli tokképzésben egyaránt. A *D. ananassae* lárvában a sérülés helyén

lezajló melanizációs folyamatok végbemennek, de a parazitoid körüli tok nem melanizálódik, ugyanakkor a tokképzés sikeres, a darázs elpusztul. Ismert, hogy a toxikus melaninon kívül egyéb reaktív oxigén- és nitrogén vegyületek is károsíthatják a betolakodót. Ennek tesztelésére megvizsgáltuk a NO szintézis útvonal szerepét az immunválaszban, különböző parazitoid darázsfertőzést követően. Olyan rendszert hoztunk létre, ahol a NO szintézis kiindulási aminosavját az L-arginint adtuk a lárvák táptalajához, illetve az útvonal kulcsenzimének, a nitrogén-monoxid szintáznak (NOS) a gátlószerét az L-NAME-t. Megállapítottuk, hogy az L-NAME csökkentette a sikeres tokképzés számát a parazitoid darazsakkal szemben, a kezelés hatására az óriássejtek differenciálódási aránya csökkent. Az L-arginin kezelés esetén hatékonyabb tokképzést és az óriássejtek differenciálódásának megnövekedett arányát tapasztaltuk. A sejtek NO szintézisének intenzitása az L-arginin kezelés hatására megnőtt, L-NAME kezelés következtében csökkent, de nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a plazmatocitákban és a nyúlványos sejtekben mért jelintenzitás között. Mindezek arra utalnak, hogy a NO és a keletkező szabadgyökök főként az óriássejt differenciálódást beindító szignálként szolgálhatnak és közvetett szerepük lehet a sikeres immunválasz kialakításában.

Eredményeink alapján, az újonnan azonosított sokmagvú óriássejtek a parazitoidok elleni immunvédekezés kulcsfontosságú effektorsejtjei és fontos szerepük lehet az invazívan terjedő fajok sikerének hátterében.

7. Summary

Insects have an effective innate immune response – consisting of cellular and humoral processes -, which serve as a defense to successfully combat infections. In various *Drosophila* species, special effector cells, the hemocytes take part in the elimination of microbes and parasites. In the species of the *melanogaster* subgroup, three functionally and morphologically different hemocyte subsets were identified. The plasmatocytes are phagocytic cells, which also produce antimicrobial peptides and extracellular matrix proteins, as well as take part in the initialization of the encapsulation. The crystal cells contain prophenoloxidase crystals in their cytoplasm, and have a role in the melanization at the site of the wound and at the capsule formed around the parasitic wasp egg. The lamellocytes differentiate upon immune induction and play role in the encapsulation. All three hematopoietic compartments, the lymph gland, the sessile tissue and the circulation are known to contribute to the differentiation of the effector cells upon immune induction. The hematopoietic compartments, the effector hemocytes and their differentiation are well characterized in *D. melanogaster*, however less information is available on the innate immune response and the hematopoiesis of other *Drosophila* species.

In our experiments, we investigated the hemocytes of different species in the *ananassae* subgroup. We observed that following infestation, in these species, a novel, so far unknown hemocyte type differentiates, which we named Multinucleated Giant Hemocyte (MGH). We also observed highly effective immune response against the parasitic wasp, however the encapsulation occurred without melanization. In my PhD work, our aim was to study the innate immune response of *Drosophila ananassae*, a representative for the *ananassae* subgroup, in details.

We developed hemocyte-specific monoclonal antibodies and identified hemocyte markers. Certain markers identify hemocytes in general (19F6), while others are specific to plasmatocytes (e.g.: 4H1) or MGHs (e.g.: 7C5). The 12F6 antibody, which recognizes proPO2 in *D. melanogaster* stains the crystal cells in *D. ananassae* as well. With the help of these markers, we defined three effector hemocyte types in *D. ananassae*. In the circulation of the naive larva, 4H1 positive plasmatocytes and a few 12F6 positive crystal cells are present, however, upon immune induction, a third cell type, the 7C5 positive

Multinucleated Giant Hemocyte appears. We developed an *in vivo* transgenic reporter system, based on the PiggyBac transposon, which allowed the further investigation of the hemocytes and the hematopoietic compartments. With the help of the two systems, we observed that the MGHs differentiate from plasmatocytes upon infestation. During this process, the cells change their morphology and function. Hemocytes expressing MGH markers appear at early time points (24h) following immune induction. These cells, which are bipolar and unicellular, are capable of phagocytosing bacteria, similarly to plasmatocytes. However, these cells transdifferentiate into multinucleated, terminally differentiated MGHs at later time points (48, 72h), which are not capable of engulfing bacteria. These cells are involved in the capsule formation around the parasitic wasp egg. Plasmatocytes, even in this species, play an important role in the initialization of the encapsulation. The structure of the multinucleated cell forms by the fusion of mononucleated cells. MGHs differentiate in the circulation and in the sessile hematopoietic tissue; the lymph gland is not involved in MGH formation. The first lobes of the lymph gland do not disintegrate upon immune induction. The most likely role of the lymph gland is to contribute to the hemocyte pool required for metamorphosis.

According to our transmission electronmicroscopic experiments, MGHs have a unique structure with extracellular lacunar system and cell organelles, which suggests strict metabolic activity. They are real multinucleated structures, which contain several nuclei within the continuous cytoplasm of the cell, without separating cell membranes. Our *ex vivo* videomicroscopic results confirm that MGHs are highly motile and are able to unfold, grow projections, fuse with each other, and in some cases lose their projections in only 45 minutes.

In our experiments investigating host-parasite interactions, we observed high numbers of circulating hemocytes and MGH differentiation in the larva after infestation with the parasitic wasp *L. boulardi*, a specialist for the *melanogaster* subgroup. The wasp never hatched from the pupa of the host, which suggests that the immune response was extremely effective. We also found high numbers of hemocytes differentiating against the generalist wasp *L. heterotoma*, but in this case MGHs formed only in the half of the cases. Upon infestation by the generalist *L. victoriae*, we observed very low hemocyte number and a lack of MGH differentiation. These results suggested that the two generalist wasp species can block the differentiation of MGHs (*L. heterotoma*), or even can lyse the

hemocytes (*L. victoriae*). The blocking of the MGH differentiation may be an important step of the success of the parasite.

Melanization has an important role both at the wound site on the cuticle and also in the capsule formation around the parasitic wasp egg. We found that melanization was active at the wound site in *D. ananassae* larvae. The capsule around the parasitic wasp did not melanize, however, the encapsulation was successful. It is known that besides the toxic melanin, other reactive oxygen and nitrogen species can combat the invaders. We tested the role of NO synthesis pathway in the immune response, upon different parasitic wasp infection. We developed a system, in which the source of the NO synthesis, the L-arginine was added to the fly food of the larvae. We also added L-NAME to the food, which is an agent that blocks the nitric oxide synthase (NOS), the key enzyme of the pathway. We found that L-NAME treatment resulted in a lower encapsulation rate against parasitoids and a lower MGH differentiation rate. In the case of L-arginine treatment, we found that the encapsulation was more effective and observed a high rate of MGH differentiation.

The intensity of the intracellular NO synthesis increased after L-arginine and decreased after L-NAME treatment, however we did not observe differences between plasmatocytes and bipolar cells. These together suggest that NO and the resulting free radicals may serve primarily as a signal to initiate giant cell differentiation and may play an indirect role in the development of a successful immune response.

Based on our results, the newly identified Multinucleated Giant Hemocytes are key effectors of the immune defense against parasitoids and may play an important role in the success of invasive species.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Professzor Dr. Andó Istvánnak, aki lehetőséget adott, hogy a csoportjában dolgozhassak, köszönöm szakmai iránymutatásait, tanácsait és a sokéves támogatását és türelmét.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Honti Viktornak szakmai irányításáért és azért a kritikus szemléletért, amivel az évek alatt formálta a tudományhoz való hozzáállásomat.

Szeretném megköszönni a segítségét Professzor Dr. Kurucz Évának, aki a sejtes– és molekuláris munka rejtelmeibe vezetett be.

Köszönetet mondok Dr. Cinege Gyöngyinek, akihez bármikor fordulhattam szakmai és nem szakmai segítségért egyaránt.

Köszönettel tartozom Dr. Gábor Erikának önzetlen segítségéért és barátságáért.

Szeretném megköszönni a hasznos tanácsokat minden munkatársamnak, akikkel az évek során egy csoportban dolgozhattam: Dr. Varga Gergely Istvánnak, Dr. Csordás Gábornak, Dr. Zsámboki Jánosnak, Dr. Márkus Róbertnek, Dr. Navodita Maurice Draskovitsnak, Dr. Kari Beátának. Köszönettel tartozom Kovalcsik Olgának, Balázs Anitának, Ilyés Mónikának, Képiró Anikónak és Tápai Szilviának technikai és emberi segítségnyújtásukért.

Köszönettel tartozom továbbá az SZBK Genetikai Intézet dolgozóinak, valamint a SZBK hatodik emeleti *Drosophila* közösségének.

Köszönöm Dr. Lukacsovich Tamásnak és Velkeyné Krausz Ildikónak a transzgenikus vonalak létrejöttéhez gyújtott nagy segítségüket.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokban nyújtott segítségükért köszönettel tartozom Dr. Juhász Gábornak, Pálfia Sárinak és kiemelten Dr. Kovács Attilának, aki ötleteivel és a téma iránt mutatott érdeklődésével segítette dolgozatom létrejöttét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Gácsér Attilának és Dr. Jankovics Ferencnek, amiért elvállalták PhD dolgozatom előzetes bírálatát.

Szeretném megköszönni jelenlegi munkahelyem, a Transzplantációs Immungenetikai Laboratórium munkatársainak támogatását.

Szeretnék köszönetet mondani egykori gimnáziumi biológia tanáromnak, Lennert Józsefnek, amiért egyedi stílusával, a tantárgyhoz való hozzáállásával és rendkívüli szakmai tudásával megkedveltette velem a biológiát.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy végig támogattak és mindenben számíthattam rájuk.

A dolgozat létrejöttéhez az alábbi pályázatok nyújtottak segítséget: OTKA NKFI K120142, GINOP- 2.3.2-15-2016-00001, GINOP-2.3.2-15-2016-00035.

9. Irodalomjegyzék

- Anderson KV, Nüsslein-Volhard C. 1984. Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*. 20-26;311(5983):223-7.
- Bidla G, Dushay MS, Theopold U. 2007. Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J. Cell Sci.* 120, 1209–1215.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* (10):907-16.
- Bosch PS, Makhijani K, Herboso L, Gold KL, Baginsky R, Woodcock KJ, Alexander B, Kukar K, Corcoran S, Jacobs T, Ouyang D, Wong C, Ramond EJV, Rhiner C, Moreno E, Lemaitre B, Geissmann F, Brückner K. 2019. Adult *Drosophila* lack hematopoiesis but rely on a blood cell reservoir at the respiratory epithelia to relay infection signals to surrounding tissues. *Dev. Cell.* 16;51(6):787-803.
- Boutros M, Agaisse H, Perrimon N. 2002. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 3(5):711-22.
- Bozler J, Kacsoh BZ, Bosco G. 2017. Nematocytes: Discovery and characterization of a novel anculeate hemocyte in *Drosophila falleni* and *Drosophila phalerata*. *Plos One* 15;12(11).
- Brand A.H, Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118 (2), 401–415.
- Bredt DS, Snyder SH. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 63:175-95.

- Bruckdorfer R. 2005. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med.* 26(1-2):3-31.
- Buchmann K. 2014. Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Front Immunol.* 5:459
- Burridge K, Wennerberg K. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 23;116(2):167-79.
- Carton Y, Nappi AJ. 1997. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol Today.* 13(6):218-27.
- Carton Y, Frey F, Nappi AJ. 2009. Parasite-induced changes in nitric oxide levels in *Drosophila paramelanica*. *J Parasitol.* 95(5):1134-41.
- Cerenius L, Lee BL, Soderhall K. 2008. The proPOsystem: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263–271.
- Cerenius L, Söderhäll K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev.* 198:116-26. Review
- Cherry S, Silverman N. 2006. Host-pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend. *Nat Immunol.* 7(9):911-7. Review.
- Chiu H, Govind S. 2002 . Natural infection of *D. melanogaster* by virulent parasitic wasps induces apoptotic depletion of hematopoietic precursors. *Cell Death Differ.* 9(12):1379-81.
- Cinege G, Lerner Z, Magyar LB, Soós B, Tóth R, Kristó I, Vilmos P, Juhász G, Kovács AL, Hegedűs Z, Sensen CW, Kurucz É, Andó I. 2020. Cellular immune response involving Multinucleated Giant Hemocytes with two-step genome amplification in the *Drosophilid Zaprionus indianus*. *J Innate Immun.* 12(3):257-272.

- Crew J.R, Batterham P, Pollock J.A. 1997. Developing compound eye in lozenge mutants of *Drosophila*: lozenge expression in the R7 equivalence group. *Dev Gene Evol.* 206, 481–493.
- Crozatier M, Ubeda JM, Vincent A, Meister M. 2004. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol.* 2(8), E196.
- Davies JH. 1932. Multiple Foreign-body Granuloma. *Proc R Soc Med.* 26(2):128-9.
- De Gregorio E, Han SJ, Lee WJ, Baek MJ, Osaki T, Kawabata S, Lee BL, Iwanaga S, Lemaitre B, Brey PT. 2002. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev Cell.* 3(4):581-92.
- Dudzic JP, Kondo S, Ueda R, Bergman CM, Lemaitre B. 2015. *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biol.* 13(1):81.
- Dushay MS, Asling B, Hultmark D. 1996. Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(19):10343-7.
- Eleftherianos I, Revenis C. 2011. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *J Innate Immun.* 3(1):28-33.
- Engstrom Y, Kadalayil L, Sun SC, Samakovlis C, Hultmark D, Faye I. 1993. κ B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 232:327–33.
- Falabella P, Riviello L, Pascale M, Lelio ID, Tettamanti G, Grimaldi A, Iannone C, Monti M, Pucci P, Tamburro AM, Deeguileor M, Gigliotti S, Pennacchio F. 2012. Functional amyloids in insect immune response. *Insect Biochem Mol Biol.* 42(3):203-11.

- Fauvarque MO, Williams MJ. *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *J. Cell. Sci.* 1; 124:1373-82.
- Foley E, O'Farrell PH. 2003. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1;17(1):115-25.
- Franc NC, Heitzler P, Ezekowitz RA, White K. 1999. Requirement for *croquemort* in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science*. 18;284(5422):1991-4.
- Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P. 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi* *Rhodnius prolixus* interactions. *J. Insect Physiol.* 53: 11-21.
- Gábor E, Cinege G, Csordás G, Török T, Folkl-Medzihradszky K, Darula Z, Andó I, Kurucz É. 2017. Hemolymph expression reveals functional heterogeneity in honey bee (*Apis mellifera*) hemocytes. *Dev Comp Immunol.* 76:403-411.
- Gábor E, Cinege G, Csordás G, Rusvai M, Honti V, Kolics B, Török T, Williams MJ, Kurucz É, Andó I. 2020. Identification of reference markers for characterizing honey bee (*Apis mellifera*) hemocyte classes. *Dev. Comp. Immunol.* 109:103701.
- Geddes AC. 1913. The origin of the osteoclast and of the osteoblast. *J Anat Physiol.* 47(2):159-76.
- Georgel P, Naitza S, Kappler C, Ferrandon D, Zachary D, Swimmer C, Kopczynski C, Duyk G, Reichhart JM, Hoffmann JA. 2001. *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev. Cell.* 1(4):503-14.
- Ghosh S, Singh A, Mandal S, Mandal L. 2015. Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. *Dev. Cell.* 26;33(4):478-88.

- Goto A, Kadowaki T, Kitagawa Y. 2003. *Drosophila* hemolymph gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev. Biol.* 264 (2), 582–591.
- Greaves MF. 1970. Biological effects of anti-immunoglobulins: evidence for immunoglobulin receptors on T and B lymphocytes. *Transplantation reviews* 5.
- Grimaldi A, Tettamanti G, Congiu T, Girardello R, Malagoli D, Falabella P, Valvassori R, Ottaviana E, de Eguileor M. 2012. The main actors involved in parasitization of *Heliothis virescens* larva. *Cell and Tissue Research.* 350,3,491–502.
- Hancox NM. 1946. On the occurrence in vitro of cells resembling osteoclasts. *J Physiol.* 15;105(1):66-71.
- Hashimoto Y, Tabuchi Y, Sakurai K, Kutsuna M, Kurokawa K, Awasaki T, Sekimizu K, Nakanishi Y, Shiratsuchi A. 2009. Identification of lipoteichoic acid as a ligand for *draper* in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* hemocytes. *J Immunol* 183, 7451–7460.
- Havard S, Doury G, Ravallec M, Brehélin M, Prévost G, Eslin P. 2012. Structural and functional characterization of pseudopodocyte, a shaggy immune cell produced by two *Drosophila* species of the obscura group. *Dev Comp Immunol.* 36(2):323-31.
- Helming L, Gordon S. 2009. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol.* 19(10):514-22.
- Hoffmann JA. 1995. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol.* 7(1):4-10.
- Holz A, Bossinger B, Strasser T, Janning W, Klapper R. 2003. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development.* 130(20):4955-62.

- Honti V, Csordás G, Márkus R, Kurucz É, Jankovics F, Andó I. 2010. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Immunol.* 47:(11–12).
- Honti V, Csordás G, Kurucz É, Márkus R, Andó I. 2014. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev Comp Immunol.* 42(1):47-56.
- Hultmark D. 1994. Insect immunology. Ancient relationships. *Nature.* 13;367:116-7.
- Ip YT, Reach M, Engstrom Y, Kadalayil L, Cai H, Gonzalez-Crespo S, Tatei K, Levine M. 1993. *Dif*, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell.* 19;75(4):753-63.
- Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, Hoffmann JA, Hetru C, Meister M. 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genomewide analysis. *Cell Microbiol.* 7, 335–350.
- Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology.* 211(4):213-36.
- Jung SH, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U. 2005. The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development.* 132 (11), 2521–2533.
- Juni N, Awasaki T, Yoshida K, Hori S.H. 1996. The Om(1e) Mutation in *Drosophila Ananassae* Causes Compound Eye Overgrowth Due to Tom Retrotransposon-Driven Overexpression of a Novel Gene. *Genetics.* 143(3): 1257–1270.
- Kacsoh BZ, Bozler J, Schlenke TA. 2014. A role for nematocytes in the cellular immune response of the drosophilid *Zaprionus indianus*. *Parasitology* 141(5):697-715.

- Kang D, Liu G, Lundström A, Gelius E, Steiner H. 1998. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18;95(17):10078-82.
- Kimbrell DA, Hice C, Bolduc C, Kleinhesselink K, Beckingham K. 2002. The Dorothy enhancer has Tinman binding sites and drives hopscotch-induced tumor formation. *Genesis* 34 (1–2), 23–28.
- Kimbrell DA, Beutler B. 2001. The evolution and genetics of innate immunity *Nat Rev Genet*. 4:256-67.
- Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, Strom C, Conto SL, Hetru C, Stuart LM, Stehle., Hoffmann JA, Reichhart JM, Ferrandon D, Rämet M, Ezekowitz RA. 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell*. 123(2):335-46.
- Kraaijeveld AR, Van Alphen JJ, Godfray HC. 1998. The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. *Parasitology*. 116:29-45.
- Kraaijeveld AR, Elrayes NP, Schuppe H, Newland PL. 2011. L-arginine enhances immunity to parasitoids in *Drosophila melanogaster* and increases NO production in lamellocytes. *Dev Comp Immunol*. 35(8):857-64.
- Kurata S. 2014. Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev. Comp. Immunol*. 42(1):36-41.
- Kurucz É, Váczi B, Márkus R, Laurinyecz B, Vilmos P, Zsámboki J, Csorba K, Gateff E, Hultmark D, Andó I. 2007a. Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta. Biol. Hung*. 58 Suppl:95-111.

- Kurucz É, Márkus R, Zsámboki J, Folkl-Medzihradsky K, Darula Z, Vilmos P, Udvardy A, Krausz I, Lukacsovich T, Gateff E, Andó I. 2007b. *Nimrod*, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr. Biol.* 17, 649–654.
- Kurucz É, Zettervall CJ, Sinka R, Vilmos P, Pivarsci A, Ekengren S, Hegedűs Z, Andó I, Hultmark D. 2003. *Hemese*, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 4;100(5):2622-7.
- Krzemien J, Dubois L, Makki R, Meister M, Vincent A, Crozatier M. 2007. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signaling centre. *Nature* 446 (7133), 325–328
- Krzemien J, Oyallon J, Crozatier M, Vincent A. 2010. Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Dev. Biol.* 346 (2), 310–319.
- Lambert RA. 1912. The production of foreign body giant cells in vitro. *J Exp Med.* 15(5):510-5.
- 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.* 7;288(5463):146-9.
- Lemaitre B, Hoffmann J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25:697-743. Review
- Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu JH, Caroff M, Lee WJ, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B. 2003. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol.* 4(5):478-84.

- Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, Jiang H, Hoffmann JA, Reichhart JM. 2002. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. EMBO J. 21(23):6330-7.
- Lindsay SA, Wassermann SA. 2014. Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. Dev. Comp. Immunol. 42(1):16-24.
- Lushchak OV, Rovenko BM, Gospodaryov DV, Lushchak VI. 2011. *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 160(1):27-34.
- Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, Rosenberg R. 1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. Proc Natl Acad Sci. 95(10):5700-5.
- 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(46):48466-76.
- Mandal L, Martinez-Agosto JA, Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U. 2007. A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. Nature 446 (7133), 320–324.
- 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 (24), 5379–5391.
- Márkus R, Laurinyecz B, Kurucz É, Honti V, Bajusz I, Sipos B, Somogyi K, Kronhamn J, Hultmark D, Andó I. 2009. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 4805–4809.

- Martinek N, Shahab J, Saathoff M, Ringuette M. 2008. Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J. Cell. Sci.* 121: 1671–1680.
- Milde R, Ritter J, Tennent GA, Loesch A, Martinez FO, Gordon S, Pepys MB, Verschoor A, Helming L. 2015. Multinucleated Giant Cells Are Specialized for Complement-Mediated Phagocytosis and Large Target Destruction. *Cell Rep.* 1;13(9):1937-48.
- Moreau SJ, Eslin P, Giordanengo P, Doury G. 2003. Comparative study of the strategies evolved by two parasitoids of the genus *Asobara* to avoid the immune response of the host, *Drosophila melanogaster*. *Dev. Comp. Immunol.* 27(4):273-82.
- Mortimer NT, Kacsoh BZ, Keebaugh ES, Schlenke TA. 2012. Mgat1-dependent N-glycosylation of membrane components prime *Drosophila melanogaster* blood cells for the cellular encapsulation response. *PLoS Pathog.* 8 1002819.
- Müller U, Vogel P, Alber G, Schaub GA. 2008. The innate immune system of mammals and insects. *Contrib. Microbiol.* 15:21-44.
- Myllymäki H, Valanne S, Rämet M. 2014. The *Drosophila* Imd signaling pathway. *J. Immunol.* 15;192(8):3455-62.
- Nam HJ, Jang IH, Asano T, Lee WJ. 2008. Involvement of pro-phenoloxidase 3 in lamellocyte-mediated spontaneous melanization in *Drosophila*. *Mol Cells.* 31;26(6):606-10.
- Nappi AJ. 1973. Hemocytic changes associated with the encapsulation and melanization of some insect parasites. *Parasitol.* 33(2):285-302.
- Nappi AJ, Christensen BM. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol.* 35(5):443-59.

- Nappi AJ, Vass E. 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res.* 6(3):117-26.
- Nappi AJ, Vass E, Malagoli D, Carton Y. 2004. The effects of parasite-derived immunosuppressive factors on the cellular innate immune and autoimmune responses of *Drosophila melanogaster*. *J. Parasitol.* 90(5):1139-49.
- Nappi AJ, Frey F, Carton Y. 2005. *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response. *J. Insect Physiol.* 51, 197–205.
- Nappi A, Poirié M, Carton Y. 2009. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Adv. Parasitol.* 70:99-121.
- Nehme NT, Liégeois S, Kele B, Giammarinaro P, Pradel E, Hoffmann JA, Ferrandon D. 2007. A Model of Bacterial Intestinal Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 3(11), e173.
- Neyen C, Poidevin M, Roussel A, Lemaitre B. 2012. Tissue- and ligand-specific sensing of Gram-negative infection in *Drosophila* by PGRP-LC isoforms and PGRP-LE. *J Immunol.* 189(4):1886-97.
- Pastor-Pareja JC, Wu M, Xu T. 2008. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis. Model Mech.* 1 (2–3), 144–154.
- Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N. 2005. *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science.* 19;309(5738):1251-3.
- Polowick PL, Sawhney VK. 1993. Differentiation of the Tapetum During microsporogenesis in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), with Special Reference to the Tapetal Cell Wall. *Annals of Botany.* 72(6):595-605.
- Prévost G, Doury G, Mabila-Moundoungou AD, Cherqui A, Eslin P. 2009. Strategies of avoidance of host immune defenses in *Asobara* species. *Adv Parasitol.* 70:235-55.

- Raftopoulou M, Hall A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 1;265(1):23-32.
- Ratcliffe NA, Gagen SJ. 1977. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell* 9: 73-85.
- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 17(1): 208–212.
- Rizki MT, Rizki RM. 1959. Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 235–240.
- Rizki TM, Rizki RM. 1980. Properties of larval hemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Experientia.* 36, 1223–1226.
- Rizki RM, Rizki TM. 1990a. Microtubule inhibitors block the morphological changes induced in *Drosophila* blood cells by a parasitoid wasp factor. *Experientia* 46, 311–315.
- Rizki RM, Rizki TM. 1990b. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 8388–8392.
- Rizki TM, Rizki RM. 1994. Parasitoid-induced cellular immune deficiency in *Drosophila*. *Annals of New York Academy of Sciences* 712, 178–194.
- Roelants G. 1972. Antigen recognition by B and T lymphocytes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 59, 135-165.
- Russo J, Dupas S, Frey F, Carton Y, Brehelin M. 1996. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* 112 (Pt 1), 135–142.
- Röhrborn G. 1961. *Drosophila* tumors and the structure of larval lymph glands. *Experientia.* 17, 507–509.
- Sander M, Squarr AJ, Risse B, Jiang X, Bogdan S. 2013. *Drosophila* pupal macrophages-a versatile tool for combined ex vivo and in vivo imaging of actin dynamics at high resolution *Eur. J. Cell. Biol.* 92(10-11):349-54.

- Satyavathi VV, Minz A, Nagaraju J. Nodulation. 2014. An unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell. Signal.* 26: 1753-1763.
- Sharma S, Sahoo N, Bhunia A. 2015. Antimicrobial Peptides and their Pore/Ion Channel Properties in Neutralization of Pathogenic Microbes. *Curr. Top. Med. Chem.* 16(1):46-53.
- Sibley WK. 1890. Nature of the Giant-Cells of Tubercle and the Elements associated therewith, as seen in Comparative Pathology. *J Anat Physiol.* 24(4):517-526.
- Sorrentino RP, Carton Y, Govind S. 2002. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev. Biol.* 243 (1), 65–80.
- Stasiv Y, Regulski M, Kuzin B, Tully T, Enikolopov GJ. 2001. The *Drosophila* nitric-oxide synthase gene (dNOS) encodes a family of proteins that can modulate NOS activity by acting as dominant negative regulators. *Biol Chem.* 276(45):42241-51.
- Stramer BM, Dionne MS. 2014. Unraveling tissue repair immune responses in flies. *Semin Immunol.* 26(4):310-4.
- Stramer B, Wood W, Galko MJ, Redd MJ, Jacinto A, Parkhurst SM, Martin P. 2005. Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during *in vivo* cell migration. *J. Cell Biol.* 168, 567–573.
- Tang H. 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly (Austin)*. 3(1):105-11.
- Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C. 2006. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. *The J. Biol. Chem.* 281 (38), 28097–28104.
- Tao Y, Schulz RA. 2007. Heart development in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 3–15.
- Tepass U, Fessler LI, Aziz A, Hartenstein V. 1994. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development.* 120(7):1829-37.

- Theopold U, Li D, Fabbri M, Scherfer C, Schmidt O. 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cell. Mol. Life Sci.* 59(2):363-72. Review
- Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS. 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.* 25, pp. 289–294.
- Theopold U, Krautz R, Dushay MS. 2014. The *Drosophila* clotting system and its messages for mammals. *Dev. Comp. Immunol.* 42(1):42-6.
- Tokusumi T, Shoue DA, Tokusumi Y, Stoller JR, Schulz RA. 2009. New hemocyte-specific enhancer-reporter transgenes for the analysis of hematopoiesis in *Drosophila*. *Genesis.* 47(11):771-4.
- Ulrich T, Kaufmann SH. 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol.* 208(2):261-9.
- Ulvila J, Vanha-Aho LM, Rämet M. 2011. *Drosophila* phagocytosis - still many unknowns under the surface. *APMIS.* 119(10):651-62.
- Wertheim B, Kraaijeveld AR, Schuster E, Blanc E, Hopkins M, Pletcher SD, Strand MR, Partridge L, Godfray HC. 2005. Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in *Drosophila*. *Genome Biol* 6, R94.
- Whitten MM, Mello CB, Gomes SA, Nigam Y, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. 2001. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. *Exp Parasitol.* 98(1):44-57.
- Williams MJ, Andó I, Hultmark D. 2005. *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes Cells* 10, 813– 823.
- Williams MJ, Wiklund ML, Wikman S, Hultmark D. 2006. Rac1 signalling in the *Drosophila* larval cellular immune response. *J Cell Sci* 119, 2015–2024.
- Williams MJ. 2007. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* 15;178(8):4711-6.

- Willott E, Trenczek T, Thrower LW, Kanost MR. 1994. Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *manduca sexta*. *Eur. J. Cell Biol.* 65, 417–423.
- Wood W, Jacinto A. 2007. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 542–551.
- Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M. 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 271(23):13854-60.
- Zettervall CJ, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, Kurucz É, Andó I, Hultmark D. 2004. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(39):14192-7.
- Zhang X, Mosser DM. 2008. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J. Pathol.* 214(2):161-78.
- 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.* 7, 633–645.

10. Közlemények listája

A dolgozat alapját képező közlemény:

Márkus R*, Lerner Z*, Honti V*, Csordás G, Zsámboki J, Cinege G, Párducz Á, Lukacsovich T, Kurucz É, Andó I. 2015. Multinucleated Giant Hemocytes Are Effector Cells in Cell-Mediated Immune Responses of *Drosophila*. *J. Innate. Immun.* 7(4):340-53.

IF: 4,273

MTMT: 2853634

*a szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a kézirat létrejöttéhez

Egyéb közlemény:

Cinege G*, Lerner Z*, Magyar LB, Soós B, Tóth R, Kristó I, Vilmos P, Juhász G, Kovács AL, Hegedűs Z, Sensen CW, Kurucz É, Andó I. 2020. Cellular Immune Response Involving Multinucleated Giant Hemocytes with Two-Step Genome Amplification in the *Drosophilid Zaprionus indianus*. *J. Innate. Immun.* 12(3):257-272.

IF: 4,085

MTMT: 30819399

*a szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a kézirat létrejöttéhez