

A DROSOPHILA MELANOGASTER
LAMELLOCITÁIRA JELLEMZŐ MOLEKULÁK
FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA

Doktori értekezés tézisei

Laurinyecz Barbara

Témavezetők: Dr. Andó István tudományos tanácsadó
Dr. Kurucz Éva tudományos főmunkatárs

Biológiai Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Készült: a MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében

Szeged, 2009

Bevezetés

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) a veleszületett immunitás tanulmányozásának kiváló modellszervezetévé vált, amelyre egyrészt széleskörű genetikai eszköztára teszi alkalmassá, másrészt az a felismerés, hogy a rovarok és a gerincesek elsődleges immunválaszában szerepet játszó jelátviteli útvonalak számos eleme molekuláris analógiát mutat. Az ecetmuslica mikroorganizmusok és paraziták elleni védekezésében immunrendszerének különböző elemei vesznek részt: a humorális válaszban elsődleges szerepű *zsírtest*, amely antimikrobiális peptideket termel, illetve a sejt-közvetítette immunválasz effektor elemei, az immunsejtek, vagy *hemociták*, amelyek a keringésben vagy a szövetekhez kitapadva helyezkednek el. A hemociták morfológiájuk és funkciójuk alapján három altípusra csoportosíthatók: a kis kerek *plazmatocitákra*, amelyek a mikroorganizmusok fagocitózisában, antimikrobiális peptidek termelésében és a parazitoid darazsak elleni tokképzési reakcióban vesznek részt; a melanizációban szerepet játszó *kristálysejtekre*, amelyek citoplazmájukban profenoxidáz zárványokat tartalmaznak, valamint a nagyméretű, lapos *lamellocitákra*, amelyek a parazitoid darazsak körüli több sejtrétegű tok kialakításáért felelősek.

Laboratóriumunkban a *Drosophila melanogaster* véresejtjein kifejeződő fehérjék immunválaszban betöltött szerepét vizsgáljuk. Mivel a *Drosophila* tokképzési reakciója fenotípusos analógiát mutat a gerincesek granulomaképződésével, de a folyamatban résztvevő molekulák kevésbé ismertek, ezért célul tűztük ezek vizsgálatát. Mivel a tokképzésben a lamellocitáknak elsődleges szerepe van, munkánk során a lamellocitákon kifejeződő molekulákat vizsgáltuk molekuláris módszerekkel.

Alkalmazott módszerek

Drosophila törzsek fenntartása és klasszikus genetikai módszerek

Parazitoid darázsszal történő (*in vivo*) immunindukció

Egerek immunizálása

Kompetíciós epitóp analízis

Immun-hisztokémia és indirekt immuno-fluoreszcencia

Fluoreszcens, fénymikroszkópos és lézer konfokális mikroszkópos vizsgálatok

Hemocita lizátum készítése

Immunoprecipitáció

Western-blot analízis

Ezüstfestés

Molekuláris technikák (genomikus DNS tisztítás, teljes RNS tisztítás, polimeráz lánreakció, reverz transzkripcióval kapcsolt PCR)

Microarray analízis

in situ RNS hibridizáció

Számítógépes szekvencia analízis

Eredmények és következtetések

Munkánk elsődleges célja a *Drosophila melanogaster* tokképzési reakciójában szerepet játszó lamellociták felszínén kifejeződő L1 fehérje molekuláris analízise volt. A darázfertőzést követően differenciálódó nagyméretű lapos lamellocitákon és kis kerek véresejtek alpopulációján expresszálandó L1 molekulát három különböző epitóppal reagáló monoklonális ellenanyaggal azonosítottuk. Az immunoprecipitált L1 fehérje tömegspektrometriai analízisével kapott szekvenciákkal a *Drosophila melanogaster* adatbázisában azonosítottunk egy annotált gént, amelyet *atilla*-nak neveztünk el. Bizonyítottuk, hogy az L1 vagy Atilla fehérjét ez a gén kódolja. A három exonból álló *atilla* gén a 2. kromoszóma bal karján, citológiaiilag a 33D3-D3 régióban helyezkedik el.

Az *atilla* génnek a *Drosophila* sejt-közvetítette immunválaszában betöltött szerepének vizsgálatához P-elem remobilizációval létrehoztuk a gén funkcióvesztéses alléljeit. Megállapítottuk, hogy az *atilla* null alléleket hordozó egyedekben az Atilla fehérje nem fejeződik ki, az állatok homozigóta életképesek, fertilisek, morfológiai elváltozásokat nem mutatnak. A parazitoid darazsak által kiváltott immunindukció során az *atilla* null allélt hordozó egyedekben a lamellociták differenciálódása, és a tokképzési reakció nem sérült.

Az *atilla* null mutánsokat genetikai interakcióban is vizsgáltuk, olyan mutációkkal, amelyek megnövekedett lamellocita számot eredményeznek a keringésben. A melanotikus tumorképződéssel is járó tumor szuppresszor *l(3)mbn-1* mutációt, valamint az emlős Anaplasztikus Limfóma Kináz *Drosophila* homológjának, a DAlk fehérjének a hemocitákban kifejeztetett formáját vizsgáltuk *atilla* null mutáns háttéren. Megállapítottuk, hogy az *atilla* gén hiánya nem befolyásolta sem az

l(3)mbn-1, sem a hemocitákban kifejeztetett DAlk fenotípusát, azaz a vizsgált genetikai interakciókban az *atilla* gén nem játszik közvetlen szerepet a lamellociták differenciálódásában.

Az *atilla* null mutáns és az *atilla* gént expresszáló kontroll darázsszal indukált lárváin genomszintű expressziós összehasonlító vizsgálatokat végeztünk, és az immunválasz három különböző időpontjában jelentős expressziós változást mutató géneket kerestünk. Összesen 14 jelöltet találtunk, amelyek közül négynek feltételezett vagy ismert szerepe van az immunvédekezésben. A jelöltek és az *atilla* gén kölcsönhatásának illetve az immunválaszban betöltött szerepüknek a részletesebb vizsgálata további kísérleteket igényel.

Az *atilla* gén expressziójának vizsgálatát kiterjesztettük a teljes egyedfejlődésre és megállapítottuk, hogy az Atilla fehérje megtalálható az embrió, lárva, báb és a kifejlett légy különböző szöveteiben (bél, trachea, nyálmirigy, szívcső, endotélium), a vérsejtek közül azonban csak a lamellocitákon jelenik meg.

Az *atilla* gén egy olyan transzmembrán fehérjét kódol, amely GPI-hasítási helyet tartalmaz, így lehetőség van arra, hogy egy poszttranszlációs módosulás révén a GPI (glikozil-foszfatidil-inozitol) molekulán keresztül kapcsolódjon a sejtmembrán külső felületéhez. A GPI-vel kapcsolt fehérjékre jellemző, hogy a sejtmembrán koleszterolban gazdag régióiban, az ún. lipid tutajokban dúsulnak fel, különösen amikor ligandkötést követően receptorkomplexek alakulnak ki, amelyek aktiválják a sejten belüli jelátviteli folyamatokat. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az Atilla fehérje kolokalizálódik a lamellociták lipid tutajjaival.

Az Atilla fehérje ciszteinben gazdag extracelluláris doménje alapján az urokináz-típusú plazminogén receptor/limfocita antigén 6 (u-PAR/Ly6) családba sorolható, amelynek tagjaira jellemző, hogy kisméretű,

GPI-kapcsolt fehérjék, amelyek között megtalálhatóak az immunválaszban (CD59, Ly-6) vagy a véralvadásban és tumoros folyamatokban (u-PAR) szerepet játszó fehérjék is.

A *Drosophilában* az általunk azonosított Atilla az első u-PAR/Ly6 családba sorolható fehérje. A *Drosophila melanogaster* fehérje adatbázisában további tíz olyan fehérjét találtunk, amelynek szerkezete, különösen a GPI-horgonyzóhely és a ciszteinek konzervált elhelyezkedése alapján, nagyfokú hasonlóságot mutat. Ezeket a homológ fehérjéket kódoló géneket *atilla*-szerű géneknek neveztük el, amelyek a genomban 2-5 tagból álló csoportokban helyezkednek el. Megvizsgáltuk, hogy az *atilla* és az *atilla* homológ gének együttes eltávolítása hogyan befolyásolja a lamellociták differenciálódását vagy a parazitoid darazsak elleni védekezés hatékonyságát, és megállapítottuk, hogy a homozigóta *atilla* null allélnak és hat *atilla*-szerű gént átfedő heterozigóta deléciónak a rekombinációja nem befolyásolta a lamellociták differenciálódását vagy funkcióját.

Az Atilla fehérje a lamellociták differenciálódásának vizsgálatában kiválóan használható marker. Megfigyeléseink szerint az Atilla fehérjét expresszáló lamellociták a darázssal történő immunindukciót követően 24 órával már megjelennek a keringésben, jóval korábban, mint az irodalomban a lamellociták származási helyének tekintett központi nyirokszervből származó lamellociták. Kísérleteink során darázsfertőzést követően az élő lárvákban egyrészt fizikai ligatúra alkalmazásával, másrészt molekuláris markerek segítségével különítettük el egymástól a *Drosophila* lárva két fő hematopietikus szövetét. A lárva anterior részében elhelyezkedő központi nyirokszerv nem fejezi ki a *Hemese*-GFP markert, míg a poszterior hematopietikus szövet kifejezi azt. Parazitoid darázsfertőzés és ligatúra alkalmazását követően vizsgáltuk a keringésben megjelenő hemociták és ezen belül az Atilla markert kifejező lamellociták

számát, valamint a darázspete körüli tok kialakulását. Megfigyeltük, hogy a lamellociták differenciálódása, valamint a darázslárvák körüli melanizálódó tok képzése csak a ligatúrához képest poszterior irányban történt meg, míg az anterior részben található központi nyirokszerv ép maradt, nem képződtek lamellociták és a darázspete körül nem alakul ki melanizált tok. Megállapítottuk, hogy parazitoid darázsszal történő fertőzést követően a keringésben megjelenő lamellociták elsősorban a lárva poszterior hematopietikus szövetéből vagy a hátulso részre kitapadt szeszilis sejtekből származnak.

Munkánk további célja volt egy szintén a lamellocitákban megnyilvánuló molekula, az L5 vagy Filamin szerepének a tisztázása a lamellociták képződésében illetve funkciójában. Kimutattuk, hogy a lamellocitákon a *cheerio* gén által kódolt Filaminnak a 240 kDa izoformája fejeződik ki. A *cheerio* gén funkcióvesztéses mutánsában a lamellociták immunindukció nélkül is megjelennek a lárva keringésében. Ezt a spontán lamellocita differenciálódási fenotípust a Filamint kódoló cDNS bevitelével menekíteni tudtuk. Megállapítottuk, hogy a Filamin 240 kDa izoformája a lamellocita differenciálódás szuppresszora.

Közlemények:

Andó István, Laurinyecz Barbara, Nagy István, Márkus Róbert, Florentina Rus, Váczi Balázs Zsámboki János, Fehér László, Elisabeth Gateff, Dan Hultmark, Kurucz Éva: **Ősi örökségünk: a veleszületett immunitás. A *Drosophila* sejtes immunitása.** *Magyar Immunológia*, 2003, 2(4):39-45

Barbara Laurinyecz, Éva Kurucz, Katalin Medzihradzky, István Andó: **Identification of the first lamellocyte-specific cell surface receptor in *Drosophila melanogaster*.** (abstract), *Cytometry*, 2003, 56(2)

Andó István, Laurinyecz Barbara, Márkus Róbert, Rus Florentina, Váczi Balázs, Zsámboki János, Kurucz Éva: **Ősi örökségünk, a veleszületett immunitás: A *Drosophila* immunrendszere.** *Magyar Tudomány*, 2004, (10):1080-1085

Florentina Rus, Éva Kurucz, Róbert Márkus, Sergey A. Sinenko, Barbara Laurinyecz, Csilla Pataki, János Gausz, Zoltán Hegedűs, Andor Udvardy, Dan Hultmark, István Andó: **Expression pattern of Filamin-240 in *Drosophila* blood cells.** *Gene Expression Patterns*, 2006, (8):928-934

Éva Kurucz, B. Váczi, R. Márkus, Barbara Laurinyecz, P. Vilmos, J. Zsámboki, Kinga Csorba, Elisabeth Gateff, D. Hultmark, I. Andó: **Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens.** *Acta Biologica Hungarica*, 2007, (58):95-111

¹Róbert Márkus, ¹Barbara Laurinyecz, ¹Éva Kurucz, Viktor Honti, Izabella Bajusz, Botond Sipos, Kálmán Somogyi, Jesper Kronhamn, Dan Hultmark, István Andó: **Sessile hemocytes as a novel hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*.** *PNAS*, 2009, 106(12): 4805-9,
¹megosztott első szerzők

Viktor Honti, Éva Kurucz, Gábor Csordás, Barbara Laurinyecz, Róbert Márkus, István Andó: **In vivo detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*.** *Immunology Letters*, 2009, 126(1-2):83-34

Barbara Laurinyecz, Éva Kurucz, Róbert Márkus, Péter Vilmos, Zsuzsanna Darula, Katalin F. Medzihradzky, József Mihály, Tamás Lukacsovich, Kálmán Somogyi, Botond Sipos, Balázs Váczi, Elizabeth Gateff, Dan Hultmark, István Andó: **Identification and characterization of atilla in lamellocytes of *Drosophila melanogaster*.** kézirat

Előadások:

- 2002 MTA SZBK, Straub Napok, Szeged
- 2003 Magyar Immunológiai Társaság 33. Kongresszusa, Győr
- 2004 MTA SZBK Straub Napok, Szeged
- 2005 VI. Magyar Genetikai Kongresszus és XIII. Sejt és Fejődésbiológiai Napok, Eger
- 2005 13th Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, Hungary
- 2009 15th Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, Hungary

Poszterek:

- 2002 III. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest
- 2005 European *Drosophila* Research Conference, Eger, Hungary
- 2006 4th International Conference on Innate Immunity, Corfu, Greece
- 2007 Magyar Immunológiai Társaság 36. Kongresszusa, Hajdúszoboszló