

Vérsejtleszármaszási vonalak vizsgálata
***Drosophila melanogaster*ben**

Ph.D. értekezés tézisei

Csordás Gábor

Témavezetők: Dr. Andó István és Dr. Honti Viktor

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és
Informatikai Kar

2014.

Szeged

Bevezetés

A veleszületett immunitás az állatvilág legősibb védekező mechanizmusa, melynek alapvető folyamatai az evolúció során szigorú konzerváltságot mutatnak. A veleszületett immunitás vizsgálatához ideális modellszervezet az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*), amely kiterjedt genetikai eszköztárral rendelkezik, valamint fejlődésbiológiai szempontból is rendkívül részletesen jellemzett.

Az ecetmuslica immunvédekezése humorális és sejtközvetített ágakra osztható. A humorális immunválasz során a betolakodók ellen antimikrobiális peptidok termelődnek, valamint koagulációs folyamatok lépnek működésbe. A humorális válasszal szorosan összefügg a sejtközvetített immunvédekezés, melyet különböző funkciókra specializált immunsejtek (hemociták) hajtanak végre. A plazmatociták a mikrobák bekebelezését (fagocitózist) végzik, míg a kristálysejtek a melanizációs kaskád enzimjeit hordozzák kristályos formában, melyeket a sebgyógyulás valamint a tokképzés során szabadítanak fel. Amennyiben a muslica lárvát parazitoid darázs támadja meg, egy harmadik véresejt-típus, a lamellocita differenciálódik. A lamellociták a többi véresejt-típussal együttműködve többrétegű tokot hoznak létre a parazitoid petéje körül, mely a kristálysejtek hatására melanizálódik.

A *Drosophila* lárva véresejtjei három véresejtkompartmentumot népesítenek be: a keringést, a központi nyirokszervet, valamint a szesszilis szövetet. A keringésben nyugalmi állapotban differenciálódott véresejtek (nagyraoszt plazmatociták, kisebb részt kristálysejtek) találhatók. A központi nyirokszerv egy több lebenypárra tagolt kompakt hematopoiétikus szövet, amelyben véresejt-differenciálódás történik, vagyis

egyaránt megtalálhatók benne vérsejt-prekurzorok, valamint érett plazmatociták és kristálysejtek.

Munkánk során a *Drosophila* vérsejtek eredetét és sorsát vizsgáltuk genetikai sejtvonaljelölés és vérsejt-specifikus molekuláris markerek segítségével.

Célkitűzések

Kísérleteink során a következő célokat tűztük ki:

- 1.) Azonosítani azokat a fő vérsajtleszármazási vonalakat a *Drosophila* embrióban, amelyek részt vesznek a lárvális és adult vérsajt kialakításában.
- 2.) Kapcsolatot találni ezen sejtvonalak, valamint a lárvális és adult vérsajtkompartmentumok között.
- 3.) Felderíteni az immunválasz során differenciálódó végrehajtó sejtek kompartmentális eredetét.
- 4.) Felderíteni az egyes vérsajtvonalak differenciálódási plaszticitását, és azonosítani a plaszticitásért felelős szabályozó faktorokat.
- 5.) Létrehozni egy olyan kísérleti rendszert, melynek segítségével a szesszilis vérsajtképző kompartmentum részletes szerkezeti analízise *in vivo* lehetővé válik, és ennek segítségével jellemezni a szesszilis szövetet alkotó vérsajttípusokat.

Alkalmazott módszerek

1. *Ecetmuslica* lárvák immunindukálása
2. Vérsajtpreparátumok készítése
3. Kutikula-preparátumok készítése
4. Immunfluoreszcencia
5. Preparált vérsajtek fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata
6. *Drosophila* embriók videómikroszkópiája
7. A fagocitózis vizsgálata
8. A lárvák immobilizálása
9. Ellenanyagok előkészítése az *in situ* immunfestéshez
10. Ellenanyagok injektálása *Drosophila* lárvákba
11. *In situ* konfokális mikroszkópia és videómikroszkópia
12. Keringő vérsajtek immunfluoreszcens festése ellenanyag-keverékekkel

Az eredmények összefoglalása

1. A vérsejtkompartmentumok embrionális eredete

Kísérleteinkben egy olyan transzgenikus rendszert hoztunk létre, amellyel követtük az embrionális vérsejtleszármazási vonalakat a későbbi fejlődési stádiumokban. Megállapítottuk, hogy az embrionális makrofágok utódsejtjeiből alakulnak ki a lárva keringő vérsejtjei, valamint a szesszilis vérsejtképző szövet, a kardiogén mezodermből származó központi nyirokszerv pedig ezen két kompartmentumtól izoláltan fejlődik. Parazitoid darázs által kiváltott immunindukciót követően mindhárom hematopoietikus szövet részt vesz az effektor sejtek (plazmatociták és lamellociták) differenciálódásában.

2. A plazmatociták plaszticitása

Részletesen jellemeztük az immunindukciót követő differenciálódási folyamatokat. Megfigyeltük, hogy a lamellocita-markereket kifejező sejtek a parazitózist követően néhány órával megjelennek a lárva keringésében. Ezek a sejtek mind morfológiai, mind funkcionális kritériumokat figyelmebe véve átmenetet képeznek a fagocitáló plazmatociták és a tokképző lamellociták között. Ezt a feltételezett átalakulást (a plazmatociták plaszticitását) a plazmatocita leszármazási vonal *in vivo* kijelölésével is megerősítettük: sejtvonajelölő transzgéneket hordozó lárvák immunindukcióját követően megfigyeltünk olyan lamellocitákat, melyek a plazmatocita-sejtvonalból származtak. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy az immunindukciót követően megjelenő lamellociták egy része a makrofágok plaszticitásának következtében jön létre.

3. A kristálysejt leszármazási vonal plaszticitása

A kristálysejtek a naív állatok keringésében is jelen vannak, és az immunindukció során bekövetkező melanizációban játszanak szerepet. A kristálysejt-leszármazási vonal kijelölésével és követésével kimutattuk, hogy a plazmatocitákkal ellentétben ezek a sejtek nem képesek lamellocitákká alakulni a parazitoid darázs fertőzését követően. Megfigyeltük azonban, hogy a differenciálódást közvetlenül befolyásoló faktorok kifejeztetésével ebből a leszármazási vonalból is képesek lamellociták kialakulni. Ez a differenciálódási folyamat a kifejeztetett faktortól függően végbemehet mind sejtautonóm, mind nem-sejtautonóm módon.

4. A véresejtleszármazási vonalak sorsa a bábban és a kifejlett egyedben

A lárvális stádium végén megindul a helyhez kötött véresejtkompartmentumok spontán dezintegrációja. A folyamatot fluoreszcens riporterekkel követve megállapítottuk, hogy a központi nyirokszerv mellett a szesszilis véresejtképző szövet szerkezete is felbomlik. A késői bábban megfigyeltük ezen kompartmentum újrendeződését az kifejlett egyedekre jellemző mintázatban.

Az embrionális leszármazási vonalakat *in vivo* sejtvonaljelöléssel végigkövetve azt is kimutattuk, hogy a báb és az adult keringő véresejtjei egyaránt származnak a feji és a kardiogén mezodermből, vagyis elmondható, hogy a kifejlett egyed véresejtjeinek létrehozásában mindhárom lárvális véresejtkompartmentum részt vesz.

A bemutatott eredményekből létrehoztunk egy modellt a parazitoid által kiváltott immunválasz során történő differenciálódási folyamatok leírására, valamint felvázoltuk az *ecetmuslica* véresejtek leszármazási térképét, mellyel a hemociták sorsa végigkövethető az embrionális fejlődési stádiumtól a kifejlett egyedig.

5. A lárvális vérsejtkompartmentumok *in vivo* vizsgálatának egy új módszere

Az elmúlt években sokat fejlődtek a konfokális képalkotó módszerek, így lehetővé vált az élő állatok nagyfelbontású vizsgálata. Mivel a lárva szesszilis vérsejtképző szövetének szerkezete jelentősen sérül a preparálásakor, létrehoztunk egy új, kísérleti elrendezést, amelyben *in vivo* állapotban vizsgálható a vérképző kompartmentumok szerkezete fluoreszcens riporterek segítségével. Módszerünk alapját a lárvák reverzibilis megbénítása képezi, amellyel akár óras időtartamú videómikroszkópos felvételek is készíthetők. Az *in vivo* riporterek nyújtotta előnyöket összekötöttük a vérsejt specifikus markerek felhasználásával, melynek során a lárvába injektálható, fluoreszcensen jelölt, vérsejt specifikus ellenanyagkeverékeket hoztunk létre. Konfokális mikroszkópos vizsgálatokkal megerősítettük a módszer specifitását, és az élő állatok vérsejtképző kompartmentumaiban azonosítottuk az egyes vérsejtpopulációkat. A módszer használatával a jövőben szeretnénk jellemezni a vérsejtképző kompartmentumok dinamikáját az élő állatban, valamint megvizsgálni a hematopoézist befolyásoló faktorok hatását a vérképző szövetekre.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetem kifejezni **Dr. Andó Istvánnak**, amiért 2006-ban a csoportjához csatlakozhattam, és amiért nem csak lehetőséget adott, hanem végtelen energiájával buzdított arra, hogy megszeressem a kutatást. Köszönöm a türelmét, valamint az évek során nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom **Dr. Honti Viktornak**, aki segítségével bepillantást nyerhettem az *ecetmuslica* genetika rejtelseibe. Rengeteget tanultam tőle a szakmai alázatról, a dolgok értékéről és a tudományos gondolkodásról.

Köszönet jár **Dr. Márkus Róbertnek**, aki diákkörös témavezetésem vállalta magára, és elindított a *muslica* véresejtképzés rögzös útján.

Köszönöm **Dr. Kurucz Évának** türelmét, szakmai segítségét és fáradhatatlan munkáját, melynek folyamányaként a laborban minden kísérlet rendben és gördülékenyen zajlott.

Köszönettel tartozom Ph.D. hallgató társamnak, **Varga B. Gergely Istvánnak**, akivel számos kísérletet vállalva végeztünk, és hosszas szakmai vitákat folytattunk mindkettőnk okulására.

Köszönet jár **Balázs Anitának**, **Tápai Szilviának**, **Kovalcsik Olgának**, valamint **Képiró Anikónak** technikai segítségükért, mellyel nagyságrendekkel megkönnyítették a labormunkát.

Megköszönöm továbbá a **labor egykori és jelenlegi dolgozóinak**, amiért mindig számíthattam segítségükre, legyen az szakmai, vagy személyes tárgyú.

Hálával tartozom **Dr. Bajusz Izabellának** és **Dr. Gyurkovics Henriknek** a rendkívül tanulságos beszélgetésekért, tanácsaikért és ötleteikért, amelyek jobba tették a munkámat, és engem is.

Megköszönöm **Dr. Jankovics Ferencnek** Ph.D. tutori tevékenységét, melynek során sokat gazdagodtam szakmai és emberi szempontból egyaránt.

Köszönöm az SZBK **hatodik emeleti *Drosophila* közösségének**, hogy szakértelmükkel és segítségükkel hozzájárultak a dolgozat létrejöttéhez.

Köszönöm **Ferhan Ayaydinnak** és **Kószó Zsuzsának** a konfokális mikroszkóp használatában nyújtott segítségüket.

Köszönetem fejezem ki külföldi együttműködő partnereinknek, **Prof. Dan Hultmarknak**, **Prof. Utpal Banerjeenek**, **Dr. Michele Crozatiernak** valamint **Dr. Bruno Lemaitrenak**. Az általuk szolgáltatott reagensek, *ecetmuslica* törzsek a dolgozatban bemutatott munkához jelentős mértékben hozzájárultak.

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

Szeretnék köszönetet mondani **egykori tanárainak**, amiért megkedveltették velem a biológiát, a genetikát, és a tudományos gondolkodást. Közülük szeretném külön kiemelni **Dr. Gál Béla** gimnáziumi biológia tanáromat, valamint **Dr. Maróy Pétert** és **Dr. Török Tibort**, akik az egyetemen tartott Genetika kurzussal irányt adtak a tudományos gondolkodásomnak.

Külön köszönetem szeretném kifejezni **Dr. Mihály Józsefnek** és **Dr. Gácsér Attilának**, amiért rövid határidővel elvállalták dolgozatom bírálatát.

Hálás vagyok **Dr. Németh Tibornak** 15 éve tartó barátságáért, tisztán látásáért, valamint a szakmai és nem-szakmai témájú beszélgetéseinkért.

Végül szeretném megköszönni **családomnak, rokonaimnak és barátaimnak**, hogy kitartottak mellettem és hogy mindenben számíthattam rájuk. Köszönöm.

Saját közlemények jegyzéke

A dolgozat alapját képező közlemények:

V. Honti, G. Csordás, R. Márkus, É. Kurucz, F. Jankovics, I. Andó. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. Mol Immunol., 47(11-12) (2010),pp. 1997-2004. **IF: 2.916** MTMT: 1921048

V. Honti, G. Csordás, É. Kurucz, R. Márkus, I. Andó. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. Dev Comp Immunol. 42(1) (2014),pp. 47-56. (Összefoglaló) **IF: 3.238** MTMT: 2372553

G. Csordás, G.I.B. Varga, V. Honti, F. Jankovics, É. Kurucz, I. Andó. *In vivo* immunostaining of hemocyte compartments in *Drosophila* for live imaging. PLOS One. 9(6) (2014): e98191. **IF: 3.534** MTMT: 2708773

További közlemények:

V. Honti, É. Kurucz, G. Csordás, B. Laurinyecz, R. Márkus, I. Andó. *In vivo* detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. Immunol Lett., 126(1-2) (2009),pp. 83-84. **IF: 2.906** MTMT: 1920812

B. Kari, J. Zsámboki, V. Honti, G. Csordás, R. Márkus, I. Andó, É. Kurucz. A novel method for the identification of factors involved in host-pathogen interactions in *Drosophila melanogaster*. J Immunol Methods. 398-399 (2013),pp. 76-82. **IF: 2.225** MTMT: 2463198

V. Honti, Gy. Cinege, G. Csordás, É. Kurucz, J. Zsámboki, C.J. Evans, U. Banerjee, I. Andó. Variation of NimC1 expression in *Drosophila* stocks and transgenic strains. Fly (Austin). 7(4) (2013),pp. 263-266. **IF: 1.105** MTMT: 2372552

J. Zsámboki, G. Csordás, V. Honti, L. Pintér, I. Bajusz, L. Galgóczy, I. Andó, É. Kurucz. *Drosophila* Nimrod proteins bind bacteria. Centr Eur J Biol 8(7), pp. 633-645. **IF: 0.818** MTMT: 2326115

G. Csordás, V. Honti, R. Márkus R, F. Jankovics, G.I.B. Varga, É. Kurucz É, I. Andó. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) véresejtképződése. Tudomány a vidék mindennapjaiban: Magyar Tudomány Ünnepe ISBN:978-963-306-245-6 (2013),pp. 23-28. (Könyvrészlet/Digitális kiadvány magyar nyelven) MTMT: 2519808