

B 6553

**A Headcase a *Drosophila melanogaster* vérsejtképződésének
szabályozó faktora**

Varga Gergely István

Doktori értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Honti Viktor



**MTA Szegei Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézet
Immunológiai Témacsoport**



Biológia Doktori Iskola

Szegei Tudományegyetem Természettudományi

és Informatikai Kar

2019.

Szeged



Bevezetés

Az ember és az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) véresejtképzésében számos párhuzam megfigyelhető. A humán véresejtképzés az embrionális korban megkezdődik és két hullámban (primitív – és definitív véresejtképzés) zajlik különböző ún. véresejtképző szövetekben, kompartmentumokban. Az ecetmuslicában is elkülönítünk primitív (embrionális) – és definitív (lárvális) véresejtképzést, és az immunsejtek, vagy hemociták kompartmentalizációja szintén jellemző erre az organizmusra is. Az ember posztembrionális véresejtképzésének fő színtere a véresejtképző őssejt niche, ahol a véresejtképző őssejt egyenlőtlen osztódással hozza létre a különböző sejt típusokat. Az ecetmuslicában is azonosítottak véresejtképző őssejteket, amelyek szintén egy véresejtképző niche-ben, a központi nyirokszervben osztódva hozzák létre a hemocitákat. Az ember és az ecetmuslica védekező rendszere nem csak funkcionális és anatómiai hasonlóságokat mutat, de a *Drosophila* védekezésében szerepet játszó számos génről kiderült, hogy a humán immunfolyamatokban is jelentős szereppel bír. Ezért az ecetmuslica a veleszületett immunitás tanulmányozásához kiváló modellnek bizonyult.

Munkám során az ecetmuslica lárvá véresejtképződésének genetikai szabályozását vizsgáltam. Három végrehajtó sejt típusot azonosítottak a *Drosophila* lárvában: a bekebelezést végző plazmatocitákat, a melanizációs folyamatokban szerepet játszó kristálysejteket és a kizárólag immunindukció hatására differenciálódó lamellocitákat, melyek feladata a testüregbe került veszélyes részecskék körüli többrétegű, melanizálódó tok kialakítása. A hemociták három véresejtképző kompartmentumba rendeződnek: ezek a keringés, a központi nyirokszerv és a szeszilis véresejtképző szövet.

A kompartmentumok közül legrészletesebben a központi nyirokszervben zajló véresejtképződés szabályozása ismert. A páros lebenyekből felépülő nyirokszerv elsődleges

lebenye három működési egységre tagolódik: a kéregállományban differenciálódott hemocitákat találunk, a velőállományban vérsajt előalakok helyezkednek el, a poszterior szignalizációs központ (PSC) pedig a prohemocita állapot fenntartásáért felelős vérsajtképző niche. Számos jelátviteli útvonal összehangolt együttműködése biztosítja a végrehajtó sejtek képződését és a vérsajt előalakok differenciálatlan állapotának fenntartását. A másik két vérsajtképző kompartmentumban zajló szabályozási folyamatok kevésbé ismertek.

Munkám során egy humán tumorszuppresszor, a HECA *Drosophila* homológjának, a Headcase-nek (Hdc) az *ecetmuslica* vérsajtképződésében betöltött szerepét vizsgáltam. A Hdc egy rendezetlen szerkezetű citoplazmatikus fehérje, melyet különböző szövetekben a differenciálódás gátló faktoraként azonosítottak. Szabályozó hatását sejtautonóm és nem-sejtautonóm módon is kifejezheti. Megfigyeltük, hogy a fehérje a központi nyirokszervben is kifejeződik, azonban a nyirokszervből immunindukció hatására felszabaduló és lamellocitává differenciálódó sejtekben a gén aktivitása lecseng, ami arra utalt, hogy szerepe lehet a hemociták érésének szabályozásában.

Célkitűzések

Mivel a *hdc* kifejeződik az *ecetmuslica* lárvá központi nyirokszervében, azonban a nyirokszervből származó effektor sejtekben a gén aktivitása megszűnik, ezért kíváncsiak voltunk a faktor esetleges szerepére a vérsejtekérésének szabályozásában. Ráadásul a Hdc-ről szerzett ismereteink nem csak a *Drosophila* vérsejtképzésének alaposabb megértését szolgálhatják, de más fejlődési folyamatok, sőt a humán tumorképződés tanulmányozása szempontjából is érdeklődésre tarthatnak számot. Ezért a Hdc vérsejtképzésben betöltött szerepének tisztázása érdekében a következő célokat tűztük ki:

1. a *hdc* kifejeződési mintázatának az élő állatokban történő vizsgálata érdekében *hdc-Gal4* genetikai meghajtóelem előállítását,
2. a *hdc* kifejeződési mintázatának követését a vérsejtképző kompartmentumokban a lárvális fejlődés során,
3. a *hdc* allél előállítását és molekuláris jellemzését
4. a *hdc* mutáció vérsejtképzésre gyakorolt hatásának vizsgálatát
5. a *hdc* mutáció fókuszának meghatározását,
6. a Hdc lehetséges együttműködő partnereinek azonosítása érdekében genetikai szűrővizsgálat elvégzését.

Alkalmazott módszerek

1. Vérsejtpreparátumok készítése
2. Központi nyirokszerv és imágó korong preparátumok készítése
3. Indirekt immunfluoreszcencia alkalmazása
4. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok
5. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok
6. *In vivo* konfokális videomikroszkópiás vizsgálatok
7. Immunindukció
8. X-gal festés
9. P elem konverzió
10. Polimeráz láncreakció
11. Rekombináns vonalak előállítása
12. P elem beépülések izolálása
13. P elem mozgáson alapuló mutáns előállítás
14. Genetikai interakciós szűrővizsgálat

Az eredmények összefoglalása

1. Kísérleteink során a *hdc* kifejeződésének *in vivo* követése érdekében P-elem konverzióval a *hdc-LacZ* allélból *hdc-Gal4* genetikai meghajtóelemet hoztunk létre, melynek megfelelő működését *UAS-GFP* riporter konstrukció segítségével ellenőriztük. A meghajtóelem hűen követte a *hdc* mintázatát - így kifejeződött az imaginális szövetekben és a központi nyirokszervben egyaránt. A beépülés pontos genomi pozícióját szekvenálással állapítottuk meg. Kiderült, hogy a P-elemek kicserélődése 8 bázispár híján pontosan történt a *hdc* gén 5' szabályozó régiójában. Megállapítottuk, hogy a létrehozott *hdc-Gal4* allél, a hipomorf *hdc* allélokhoz hasonlóan a báb stádiumban recesszív letális fenotípust okozott. A faktor túltermelésével és csendesítésével igazoltuk, hogy a letalitást a P-elem beépülése, vagyis a *hdc* működésének megzavarása és nem a konverzió során létrejött egyéb mutáció okozza. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a *hdc-Gal4* hipomorf allélnak tekinthető.
2. Az előállított genetikai meghajtóelem segítségével megfigyeltük, hogy a lárvális fejlődés során a központi nyirokszerv elsődleges lebenyében a *hdc* korai kiterjedt kifejeződési mintázata a lárvá életszakasz végére fokozatosan csökken. Ráadásul, míg a második lárvá stádiumban a véresejtképző niche-ben, a PSC-ben is jelentős *hdc-Gal4* expressziót tapasztaltunk, addig a vándorló lárvák PSC-jében megszűnt a gén aktivitása. Ezek a megfigyelések megerősítették azt az elképzelésünket, mely szerint a *hdc*-nek szerepe lehet a központi nyirokszerv és a benne elhelyezkedő véresejtek fejlődésének szabályozásában.

3. A P-elem mozgáson alapuló mutánselőállítás módszerével létrehoztunk egy közel 2 kilobázis kiterjedésű deléciót, mely magába foglalja a gén teljes 5' nem transzlálódó régióját és majdnem a teljes első exont.
4. Az új amorfallél (*hdc^{Δ84}*), valamint egy korábban leírt, ám molekulárisan nem jellemzett *hdc* deficiencia (*hdc^{Δ3}*) és a *hdc^{Δ9}-Gal4* vizsgálata során kiderült, hogy a homozigóta mutáns lárvákban immunindukció hiányában, spontán lamellocita differenciálódás zajlik. Így megállapítottuk, hogy a Hdc valóban részt vesz a hemociták képződésének szabályozásában, mint a lamellocita sejtorsot gátló faktor.
5. A mutáció fókuszának felderítése érdekében a központi nyirokszervben egymástól eltérő kifejeződési mintázatot mutató genetikai meghajtóelemek és a *hdc* kifejeződését gátló RNS interferencia konstrukció felhasználásával a nyirokszerv különböző funkcionális egységeiben csendesítettük a faktort. A különböző mintázatban történt csendesítések lamellocita differenciálódási fenotípusa alapján megállapítottuk, hogy a *hdc* mutáció fókusza a PSC-ben van; vagyis a hematopoietikus niche-ben van szükség a faktorra a lamellocita képződés gátlásához. Ráadásul, amikor a *hdc* csendesítését kiterjesztettük a *Dot* vérsejt leszármazási vonalra, azt is megfigyeltük, hogy a beavatkozás sejtautonóm és nem-sejtautonóm módon is lamellocita differenciálódást okoz.
6. Azt feltételeztük, hogy a *hdc* a központi nyirokszervben működő jelátviteli útvonalak befolyásolása révén vesz részt a differenciálódás szabályozásában, ezért megvizsgáltuk genetikai interakcióját olyan szignalizációs kaszkádok elemeivel, amelyek lamellocita képződésben betöltött szerepét korábban már igazolták. Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a Hdc működése során a Dpp, a Hh és a JAK/STAT útvonalakkal lép kölcsönhatásba a vérsejtképző niche-ben.

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

Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

Szeretném megköszönni a technikai segítséget laborunk jelenlegi és egykori asszisztenseinek: **Balázs Anitának**, **Ilyés Mónikának**, **Képiró Anikónak**, **Kovalecsik Olgának** és **Tápai Szilviának**.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Saját közlemények listája

A doktori eljárás alapját képező közlemények:

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

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

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

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

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

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