

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

Ph.D. értekezés tézisei

Lerner Zita

Témavezetők: Prof. 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

Bevezetés

Az élő szervezetek elsődleges védelmi vonalát az immunrendszer biztosítja a vírusokkal, mikroorganizmusokkal és többsejtű parazitákkal szemben. A rovarok hatékony veleszületett immunitással rendelkeznek, mely a specializált vérsejtek által végrehajtott sejt-közvetítette immunválasz, és a szolubilis faktorokra épülő humorális immunválasz által valósul meg. A veleszületett immunitás folyamatainak tanulmányozására kitűnő modellorganizmus az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*), hiszen immunrendszerük számos szabályozó faktora és konzervált védekező mechanizmusa mutat hasonlóságot a gerincesekben megtalálható immunfolyamatokhoz. Az ecetmuslica lárvában három vérsejttípus ismert; a fagocitáló plazmatociták, a melanizációs folyamatok beindításában fontos kristálysejtek és az immunindukciót követően differenciálódó, tokképző lamellociták, amelyek a nem fagocitálható méretű testidegen részecskék körüli többrétegű tok kialakításában vesznek részt. Az effektor sejtek három vérsejtképző kompartmentumban helyezkednek el; a keringésben, a szesszilis vérképző szövetben és a központi nyirokszervben. Ismert, hogy immunindukciót követően, például egy parazitoid darázsfertőzés hatására, mindhárom vérképző kompartmentum hozzájárul az effektor vérsejtek differenciálódásához.

A *Drosophila melanogaster* veleszületett immunválasza részletesen tanulmányozott, azonban egyéb *Drosophila* fajok elsődleges

immunválaszáról keveset tudunk. A Ph.D. munkám során vizsgált *ananassae* alcsoport eredetileg szubtrópusi fajai, mára kozmopolita elterjedésűvé váltak, ezért evolúciós- és populációgenetikai vizsgálatok kedvelt modellorganizmusai. A sikerük háttérében álló esetleges immunológiai adaptációk mindeddig nem voltak ismertek, ezért a dolgozatomban megvizsgáltam, hogy különböző *Drosophila* fajok sikeres alkalmazkodásának háttérében milyen alternatív immunfolyamatok állhatnak.

Célkitűzések

Az elsődleges immunválasz sejt-közvetítette folyamatainak részletes tanulmányozása rovarokban, számos konzervált immunmechanizmus jobb megértését szolgálhatja. A különböző elterjedésű *Drosophila* fajok immunválaszának hátterében alternatív véresejtképzési és differenciálódási folyamatok állhatnak, ezért kísérleteink során célunk volt:

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

Alkalmazott módszerek

1. Vérsajtpreparátumok készítése
2. Vérsajt-specifikus monoklonális ellenanyagok előállítása
3. Transzgenikus *Drosophila ananassae* vonalak előállítása
4. Indirekt immunfluoreszcencia vizsgálatok
5. Western blot analízis
6. Parazitoid darázsformák fenntartása
7. Központi nyirokszerv preparátumok készítése
8. A vérsjtek fagocitáló képességének vizsgálata
9. A sokmagvú óriássejtek *ex vivo* fúziójának vizsgálata
10. Gazda-parazitoid kölcsönhatás vizsgálatok
11. Nitrogén-monoxid hatásvizsgálatok
12. Immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok
13. Statisztikai elemzések
14. Mikroszkópos vizsgálatok: sztereomikroszkóp, epifluoreszcens mikroszkóp, videomikroszkópia, konfokális mikroszkópia, transzmissziós elektronmikroszkópia

Az eredmények összefoglalása

1. Az *ananassae* alcsoportba tartozó *Drosophila* fajok véresejtjeit vizsgálva megállapítottuk, hogy *Leptopilina boulardi* parazitoid darázsszal történő immunindukciót követően a lárva keringésében egy eddig ismeretlen, sokmagvú, nyúlványos sejtípus differenciálódik, amit sokmagvú óriássejtnek neveztünk el. Megfigyeltük, hogy a *biplectinata* komplex egyedeiben, már a naiv lárva keringésében is fellelhetőek a sokmagvú óriássejtek előalakjai, míg az *ananassae* komplex egyedeiben kizárólag immunindukció után differenciálódnak.

2. A sokmagvú óriássejtek sejtvezát vizsgálva megállapítottuk, hogy a sejtmagvak körül, sűrű, folytonos aktin és mikrotubulus hálózat helyezkedik el, de a magvak között sejtmembrán nem látszik, tehát valódi sokmagvú struktúrát alkotnak. A kolhicin kezelés hatására az óriássejtek nem képesek kitekeredni, kompakt szerkezetűek maradnak, ami arra utal, hogy a mikrotubulus polimerizációnak fontos szerepe van végleges szerkezetük kialakításában. Az elektronmikroszkópos metszetek alapján megfigyeltük, hogy a kettős sejtmembrán szerkezet egyedi módon betűrődések révén hálózatot alkot a citoplazmában. Ezt a rendszert extracelluláris perifériás labirintusként írtuk le.

3. Az elsődleges immunválasz sejt-közvetítette folyamatainak részletes vizsgálata érdekében *D. ananassae* és *D. biplectinata* véresejt-specifikus monoklonális ellenanyagokat állítottunk el,

amelyekkel vérsajt-alpopulációkat különítettünk el (plazmatociták, kristálysejtek és sokmagvú óriássejtek) ezekben a fajokban. Azonosítottunk sokmagvú óriássejt-specifikus és plazmatocita-specifikus immunológiai markereket, melyeknek Western blot analízis segítségével meghatároztuk a molekulatömegüket.

4. A továbbiakban az alcsoport névadó fajában, a *D. ananassa*ban vizsgáltuk a vérsajt immunválaszban betöltött funkcióját parazitoid darázsfertőzést követően. Megállapítottuk, hogy a plazmatociták fagocitáló sejtek, azonban a sokmagvú óriássejtek nem képesek a baktériumok bekebelezésére. Ezek a sejtek a lamellocitákhoz hasonlóan a parazitoid darázs körüli többrétegű tok képzésében vesznek részt.

5. *D. melanogaster* esetében ismert, hogy az enkapszuláció effektor sejtjei, a lamellociták, fagocitáló plazmatocitákból differenciálódnak. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, vajon *D. ananassa*ban képesek-e a plazmatociták sokmagvú óriássejteké alakulni, tanulmányoztuk a keringő vérsajt morfológiai és funkcionális változásait immunindukciót követően különböző időpontokban. Megállapítottuk, hogy a keringésben, az immunindukciót követően 24 órával megjelenő kis, egymagvú, nyúlványokkal rendelkező sejtek már kifejezték az óriássejtekre jellemző markert (7C5) és még képesek voltak a fagocitózisra. Azonban immunindukciót követően 48 és 72 órával, a sokmagvú, terminálisan differenciálódott óriássejtek már nem voltak képesek a baktériumok bekebelezésére. Tehát a *D. melanogaster*hez hasonlóan

a fagocitáló plazmatociták tokképző sejtekké differenciálódnak immunindukciót követően *D. ananassaeban* is.

6. Annak érdekében, hogy a vérsejtdifferenciálódási folyamatok és a sejtek kompartmentális eredete *in vivo* is vizsgálható legyen, genetikai rendszert építettünk ki *D. ananassaeban*. *Hml*-GFP és *Pxn*-GFP transzgenikus vonalakat hoztunk létre és ezek, valamint az immunológiai markerrendszer segítségével vizsgáltuk a sokmagvú óriássejtek kompartmentális eredetét. Megállapítottuk, hogy a sokmagvú óriássejtek a keringésben és a szeszilis vérképző szövetben differenciálódnak immunindukciót követően. A központi nyirokszerv szerkezete a *D. melanogaster*nél ismert folyamatoktól eltérően, immunindukciót követően is intakt szerkezetű maradt, sejtosztódásra utaló anti-foszfohisztonH3 festődést is csak kis százalékban figyeltünk meg. A központi nyirokszervben óriássejt differenciálódásra utaló jelet nem detektáltunk.

7. A központi nyirokszerv funkciójának megértése érdekében megvizsgáltuk a Collier transzkripciós faktor expressziós mintázatát a *D. ananassae* központi nyirokszervében, immunindukció előtt és azt követően. A Collier felelős a központi nyirokszerv kompakt állapotának fenntartásáért. Expressziója a korai fejlődési stádiumú lárva elsődleges lebenyének minden sejtére jellemző, majd később kizárólag a PSC (Posterior Signaling Centre) sejtjeire korlátozódik. *D. melanogaster*nél ismert, hogy immunindukciót követően az elsődleges lebeny felbomlik és kizárólag a Collier pozitív PSC sejtek maradnak intaktak. A legújabb eredmények szerint a Collier a

sejtek prohemocita állapotának fenntartásáért is felel. Tehát, a *D. ananassaenál* tapasztalt konstans Collier expresszió, ami immunindukciót követően is fennmarad az elsődleges és hátsó lebenyek minden sejtjében, arra utal, hogy a központi nyirokszervet prohemocita állapotú sejtek alkotják. Ezért nem bomlik fel az elsődleges lebeny és onnan nem válnak le érett hemociták.

8. A sokmagvú óriássejtek kialakulását videomikroszkópia és egy speciális BrdU jelölésen alapuló rendszer segítségével vizsgálva megállapítottuk, hogy azok egymagvú, aktivált plazmatociták fúziójával jönnek létre, hasonlóan az emlősök granulóma képzésében részt vevő sokmagvú óriássejtekhez.

9. A *D. ananassae* immunválaszát különböző gazdaspecificitású *Leptopilina* parazitoid darázsfajjal szemben vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a *L. bouvardi* szűk-gazdaspecificitású fajjal szemben nagyon hatékony immunválasz alakult ki. Az esetek nagy részében a tokképző sokmagvú óriássejtek differenciálódtak a keringésben, a parazitoid nem tudott kikelni egyetlen esetben sem a bábból. A generalista *L. vicoriae* és *L. heterotoma* fajokkal szemben kevésbé volt hatékony a gazda immunválasza. A *L. heterotoma* fertőzést követően csökkent óriássejt differenciálódást tapasztaltunk és ez a faj, kis százalékban (1-2%), de képes volt kikelni a gazda bábból. A *L. victoriae* fertőzés hatékonyan gátolta az óriássejt differenciálódást és nagyon alacsony összejszámot eredményezett. Az esetek egy részében mind a gazda, mind a parazitoid elpusztult és 4%-ban képes volt kikelni a darázs a gazdabábból.

10. A *D. ananassae* esetében tapasztalt tokképzés nem járt szabad szemmel észlelhető melanizációval, mégis a parazitoid hatékony elpusztításához vezetett. Ismert, hogy a toxikus melaninon kívül egyéb reaktív oxigén- és nitrogén vegyületek is hozzájárulhatnak a betolakodók elpusztításához. Ennek tesztelésére megvizsgáltuk a nitrogén-monoxid (NO) szintézis útvonal szerepét az immunválaszban, különböző parazitoid darázsfertőzést követően. 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 darázsakkal szemben, a kezelés hatására az óriássejtek differenciálódási aránya csökkent. Az L-arginin kezelés esetén hatékonyabb tokképzést és az óriássejtek differenciálódásának megnövekedett arányát tapasztaltuk. Az intracelluláris NO szint intenzitása közel azonos mértékben változott a sokmagvú óriássejtekben és a plazmatocitákban a különböző kezelések hatására, mindezek arra utalnak, hogy a NO és a keletkező szabadgyökök főként differenciálódási szignálként szolgálhatnak.

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 rejtelseibe 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 gyűjtött nagy segítségüket. Köszönettel tartozom Dr. Juhász Gábornak, Dr. Kovács Attilának és Pálfia Sárinak az EM vizsgálatokban nyújtott segítségükért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Gácser 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 és GINOP- 2.3.2-15-2016-00035.

Saját közlemények jegyzéke

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