

Florentina Rus

A Drosophila melanogaster Filamin-240
izoformájának a kifejeződése és szerepe a lamellociták
differenciálódásában

Témavezető: Dr. Andó István
tudományos tanácsadó

MTA-Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intezét

Szeged, 2006

Bevezető

A *Drosophila* hatékony veleszületett immunrendszerrel rendelkezik, amely nagyfokú hasonlóságot mutat a gerincesek veleszületett immunitásával. A sejtes immunitás a *Drosophila* veleszületett immunitásának elsődleges védelmi vonala, melynek elemei a vérsejtek. A vérsejtek morfológiai jegyek alapján három csoportba oszthatók: plazmatociták, lamellociták és kristálysejtek. A lamellociták mind morfológiai mind pedig funkcionális szempontból egy egyedülálló vérsejt-populációt képeznek. Nagyméretű, lapos vérsejtek, amelyek a lárva testüregébe kerülő testidegen természetű részecskék, vagy az abnormálisan fejlődő szövetek elhatárolásában játszanak szerepet. Egészséges lárvákban a lamellociták nincsenek jelen, de a bábozódáskor néhány lamellocita látható, azonban ebben a stádiumban a szerepük nem ismert. Parazitoid darázs fertőzését követően számos lamellocita jelenik meg a lárvák keringésében; a lamellociták rátapadnak a parazitoid petéjére, tokot képeznek, amely melanizálódik, és a lárván belül elhatárolódik. Ezekben a sejtekben azonosítottuk a Filamin magas molekulásúlyú izoformáját, mely a lárva vérsejtjei közül kizárólag itt nyilvánul meg és melyről megállapítottuk, hogy a lamellocita differenciálódás szuppresszora.

Alkalmazott módszerek

- Monoklonális ellenanyagok előállítása
- Indirekt immunfluoreszcencia, kettős festés
- Immunhisztokémia
- Drosophila ováriumok vizsgálata
- Western blot
- A Filamin génjének azonosítása génexpressziós könyvtár segítségével
- Parazitoid darázzsal történő immunindukció

Eredmények és tárgyalásuk

Munkánk során egy monoklonális ellenanyagunk segítségével egy, a lamellocitákban kifejeződő molekulát azonosítottunk. *Drosophila* cDNS expressziós könyvtárnak az ellenanyaggal történt screenelését követően az azonosított pozitív klónokból 7 DNS fragmentumot izoláltunk. *A fragmentumok szekvenálása és az adatok elemzése alapján kiderült, hogy az azonosított gén a Drosophila cheerio génje, amely a Filamint kódolja.* Korábban kimutatták, hogy a Filamin-240 aktin kötő fehérjeként jelen van a *Drosophila* ováriumok gyűrűsatornáiban, hiánya nősténysterilitást okoz. Kísérleteink során kiderült, hogy a Filamin-240 kDa izoformája, amelyet az ellenanyagunk segítségével azonosítottunk, az immunindukált lárvák valamint a hemocita túltermelő *l(3)-mbn1* lárvák lamellocitáiban fejeződik ki. Indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálatokkal valamint Western blot analízissel kimutattuk, hogy a funkcióvesztéses *cher¹* homozigóta lárvákban ez az izoforma nem fejeződik ki. Megfigyeltük, hogy a funkcióvesztéses *cher¹* mutánsokban, immunindukció hiányában is jelen vannak a lamellociták és parazitoid darázs fertőzés hatására a lamellociták száma sokszorosa a heterozigótákban illetve a vad típusban kimutatott lamellocita számnak. Annak igazolására, hogy valóban a Filamin hiánya okozza a lamellocita túltermeléses fenotípust, menekítési kísérleteket végeztünk. A teljes hosszúságú *cheerio1* transzgen kifejeződése egy hősokk promóter szabályozása alatt állt, az állatok genotípusa: *P[hs-FLNI-20];cher¹* volt. Kimutattuk, hogy az így létrehozott állatokban kifejeződik a Filamin-240, ugyanakkor a keringésükben lévő vérsejtek száma a *cher¹* heterozigóta állatok vérsejtszámával azonos, és immunindukció hiányában nem történik spontán lamellocita differenciáció. Ezeket a menekített lárvákat parazitoid darázs fertőzésének vetettük alá, és megállapítottuk, hogy a képződő

lamellociták száma hasonló a heterozigótákban illetve a vad típusban tapasztalt lamellocita számhoz, tehát a Filamin-240 kifejeztetése a *cheerio* homozigóta háttéren képes visszaállítani a normális lamellocitaszámot. A véresejtszám és a lamellocitaszám adatok elemzése révén megállapítottuk, hogy a hatás lamellocita specifikus, ugyanis a *cheerio* gén jelenléte vagy hiánya a plazmatociták számát nem befolyásolta. Mindezek alapján megállapítottuk, hogy a *Filamin-240 kDa izoformája a lamellocita differenciálódás szuppresszora*.

Élesztő két hibrid rendszerben kimutatták, hogy a Filamin, kölcsönhatásban áll az aktinnal valamint a Toll receptor fehérjével is, mely utóbbi konstitutívan aktív formája lamellocita túltermelést eredményez. A lamellociták kialakulása során a sejtvázas is átrendeződik, és ebben az átrendeződésben valószínű, hogy a Filamin-240-nek aktin kötő fehérjeként szerepe van. Lehetséges, hogy a Toll receptor és a Filamin kölcsönhatása valamilyen módon aktiválja a lamellociták differenciálódását, azonban ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása további vizsgálatokat igényel.

Munkánk során azonosítottunk egy új lamellocita specifikus antigént, a Filamin-240-t. A molekula szerepet játszik a lamellociták differenciálódásának a szabályozásában: a lamellocitákban a Filamin-240 kDa-os izoformája a lamellocita differenciálódás szuppresszora.

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönöm témavezetőmnek Dr. Andó Istvánnak, hogy csatlakozhattam a csoportjához és hogy tanácsaival segítette munkámat. Nagyon hálás vagyok Dr. Kurucz Évának a folyamatos segítségért és a kritikai észrevételeiért. Köszönöm munkatársaimnak: Laurinyecz Barbarának, Nagy Istvánnak, Márkus Róbertnek, Vácsi Balázsnak és Zsámboki Jánosnak a segítségüket.

Köszönet Dr. Lynn Cooleynak (Yale Egyetem, AEÁ) a *P[hs-FLN1-20]* transzgenikus törzset valamint az anti-C-Fil ellenanyagot; Dr. Gorjánác Mátýásnak a *cher¹* allélt. Köszönöm Matusek Tamásnak és Pataki Csillának (SZBK, Szeged) a menekítési kísérletekben nyújtott segítséget. Tápai Szilviát, Árva Ágneszt és Kovalcsik Olgát a technikai segítségért illeti a köszönet. Köszönettel tartozom Dr. Dusha Ilonának és Dr. Erdélyi Miklósnak, hogy a tutoraim voltak.

Közlemények

Rus Florentina, Kurucz Éva, Márkus Róbert, Sinenko Sergey A., Laurinyecz Barbara, Pataki Csilla, Gausz János, Hegedűs Zoltán, Udvardy Andor, Hultmark Dan, Andó István, **Expression pattern of Filamin-240 in *Drosophila* blood cells**, *Gene Expression Patterns*, doi:10.1016/j.modgep.2006.03.005

Márkus Róbert, Kurucz Éva, **Rus Florentina**, Andó István, **Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster***, *Immunology Letters* 101, 2005, 108-111.

Andó István, Laurinyecz Barbara, Márkus Róbert, **Rus Florentina**, Váczi Balázs, Zsámboki János, Kurucz Éva: **Ósi örökségünk, a veleszületett immunitás: A *Drosophila* immunrendszere** *Magyar Tudomány* 2004/10

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

Előadások

Rus Florentina, Kurucz Éva, Gausz János, Hegedűs Zoltán, Udvardy Andor, Andó István, **Expression and a novel function of Filamin-240 in lamellocyte development in *Drosophila melanogaster***, A Magyar Immunológiai Társaság XXXIII. Kongresszusa, Győr, 2003, October 15-16.

Laurinyecz Barbara, Kurucz Éva, Nagy István, **Rus Florentina**, Andó István, **Az antigén-indukálta sejtés immunválasz folyamata *Drosophilában***, A Magyar Immunológiai Társaság XXXII. Kongresszusa, Kaposvár, 2002, October 30-02.

Rus Florentina, Kurucz Éva, Andó István, **Identification of hemocyte-antigens in *Drosophila melanogaster***, ITC 200/2001, Proceeding of the Closing Seminar, BRC, Hungarian Academy of Sciences, 99-110.