

## **Az elsődleges immunválasz tokképző reakciójának molekuláris genetikai alapjai *Drosophila melanogaster*ben**

### **Részletes zárójelentés**

A szervezetbe jutó testidegen részecskéknek a testüregben történő fizikai elhatárolása, tokba zárása az élővilágban általánosan elterjedt védekező reakció. Ez a folyamat gerinces szervezetekben a tályogképzés, illetve granulomaképzés, melyhez hasonló folyamat a rovarok tokképző reakciója (Brennan 2004). A *Drosophila melanogaster* a paraziták petéit immunsejtjeivel több rétegű tokba zárja. A tokképző reakcióban minden típusú immunsejt, azaz hemocita részt vesz, a fagocita funkcióval rendelkező plazmatociták, a melanizációs kaskád proenzimét kristályos formában tartalmazó ún. kristálysejtek, valamint a nem fagocitálható, nagyméretű részecskék hatására differenciálódó vérsejtek, a lamellociták (Williams 2007). A *Drosophila* lárva testüregébe helyezett parazita darázs petéje nem fagocitálható, nagyméretű részecske, mely körül először a plazmatociták csoportosulnak, majd a lamellociták több rétegű tokba zárva elhatárolják a gazda szöveteitől. A tokképzés során a lamellocitákban és a kristálysejtekben aktiválódó fenoloxidáz láncreakció toxikus melanin termelődéséhez vezet, ami elpusztítja a parazita petét. Bár a sejt-közvetítette immunválasz paraziták elleni védekezésének lépéseit már jó ideje ismerjük, a tokképző reakció részleteit még nem sikerült felderíteni.

Pályázatunk célja a sejt-közvetítette immunválasz tokképző folyamatában résztvevő folyamatok vizsgálata volt *Drosophila melanogaster* modellrendszerben, a *Drosophila* immunsejtjein általunk korábban azonosított molekuláris markerek, az L1, az L4 és az L2 markermolekulák (Kurucz és mtsi. 2003, Zettervall és mtsi. 2004, Kurucz és mtsi. 2007a, Kurucz és mtsi. 2007b) alkalmazásával.

### **Az L1 molekula biokémiai és funkcionális jellemzése**

Az L1 molekula a *Leptopilina bouvardi* G486 parazita darázs által kiváltott immunindukciót követő nyolc órán belül a *Drosophila* keringésében lévő vérsejtek 30%-án megnyilvánuló fehérje. A fehérje a darázsfertőzés hatására differenciálódó lamellocita prekursorokon, illetve a később megjelenő nagyméretű, lapos lamellocita morfológiájú sejteken van jelen (Kurucz és mtsi. 2007b).

Az L1 fehérje tömegspektrometriai analízise (LC-MS/MS) során kapott peptid szekvenciák segítségével azonosítottuk az L1 molekulát kódoló gént, amelyet *atilla*-nak neveztünk el (Kurucz és mtsi. kézirat). Fehérjeszerkezet tervező programok analízise alapján az *atilla* gén terméke egy glikozilfoszfatidilinozitol (GPI) horgonyozó hellyel rendelkező transzmembrán fehérje, mely a Ly6 szupercsalád tagja. A Ly6 szupercsalád tagjai olyan fehérje-fehérje kölcsönhatásban szerepet játszó szerkezeti alegységgel rendelkeznek, amelyek a foszfolipáz C enzimmel hasított szolubilis formában töltik be biológiai funkciójukat. *Drosophila* genom 36 olyan gént tartalmaz, amely Ly6 motívumot tartalmazó fehérjét kódol, funkciójuk nagyrészt ismeretlen, kivéve a *boudin* gént, amely az epitéliális szövetek rekeszes kapcsolódásában (septate junction) játszik szerepet (Hijazi és mtsi. 2009).

A *Drosophila* hemocitákon megnyilvánuló Atilla fehérjét a GPI-kapcsolt molekulákat a sejtek felszínéről szelektíven lehasító foszfatidilinozitol-specifikus foszfolipáz C-vel (PIPLC) emésztettük (Hálová és mtsi 2002), majd indirekt immunofluoreszcíával tettük láthatóvá. A PIPLC-kezelt hemociták FACS analízise az Atilla molekula expressziójának jelentős csökkenését mutatta, ami arra utal, hogy az Atilla molekula GPI-hez kapcsoltnak is beágyazódhat a sejtmembrán koleszterolban és szfingolipidekben gazdag mikrodoménjeibe, az ún. lipid raftokba.

A lipid raftok az evolúció során konzerválódott szerkezetek, amelyek gerincesekben elsősorban a különböző jelátviteli mechanizmusokban szerepet játszó receptor molekulák funkcionális komplexeit tartalmazzák [Horejsi és mtsi 2005]. Annak ellenére, hogy *Drosophila*-ban a lipidek kémiai szekezete az emlősökétől eltérő, a sejtmembrán koleszterolban gazdag régiói mégis képesek lipid raftokba rendeződni (Rietveld és mtsi 1999). A lipid raftok glikoszfingolipid komponense szelektíven köti a kolera toxin B (CTB) alegységét, ami egy általánosan használt lipid raft marker. Ennek felhasználásával élő sejteken fluoreszcens kettősfestéssel vizsgáltuk a lipid raftok és az Atilla molekula együttes elhelyezkedését. Az Atilla fehérje és a CTB alegység kolokalizációjának százalékos mértékét egyrészt a hemocita túltermelő *l(3)mbn-1* mutáns lamellocitáin vizsgáltuk, ahol az Atilla és CTB molekulák együttes megnyilvánulása  $76\% \pm 2$ , (n=16) volt, másrészt a parazita darázs által az *in vivo* immunindukciónak kitett vad típusú *OregonR* lárvák lamellocitáin, ahol  $74\% \pm 3$  (n=7)-os kolokalizációt mértünk. Az *l(3)mbn-1* mutáns lamellocitáin az Atilla molekula lipid-tutajhoz történő kötődését egy másik módszerrel (Gombos és mtsi 2006) is jellemeztük. A natív lamellocitákat enyhe, nem-ionos detergenssel kezelve a sejtmembránból kioldottuk a lipid raftokhoz nem kapcsolt fehérjéket. Ezután immunfestést követő FACS analízissel vizsgáljuk az Atilla molekula sejtfelszíni megnyilvánulását. Azt tapasztaltuk, hogy a detergenssel nem kezelt kontroll mintához képest a kezelt sejtek 80%-ban volt kimutatható az Atilla molekula. Abban az esetben viszont, amikor a lipid raftok szerkezetét stabilizáló koleszterint metil-béta-ciclodextrinnel kivonva a lipid raftok szerkezetét megbontottuk, a detergens kezelést követően az Atilla molekula a lamellociták csupán 50%-án nyilvánult meg. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy az Atilla molekula GPI-hez kapcsoltnak képes beágyazódni a sejtmembrán mikrodoménjeibe a lipid raftokba. Ennek az eredménynek a nyomán az Atilla antigént az első olyan lipid raft asszociált fehérjeként azonosítottuk mely a *Drosophila* vérsejtjein fejeződik ki.

A plazmamembránban lévő lipid raftok lehetővé teszik a fehérjék laterális szegregációját, így a jelátviteli mechanizmusban résztvevő molekulák kompartmentalizálódni képesek a membránban: bizonyos komponensek koncentrálnak a lipid raftokban, mások kizáródnak (Zajchowski és mtsi 2002), a lipid raftokban lokalizálódó komponensek állandó változásával szabályozva a jelátviteli folyamatokat (Simons és mtsi 2010). Kémiai keresztkötést létesítő homobifunkcionális reagensek alkalmazásával, az Atilla molekulával laterálisan kölcsönható molekulákat kerestünk. Mivel az Atilla fehérje extracelluláris doménjében nyolc lizin aminosav található, először különböző távolságokban ható lizin specifikus keresztkötő szereket használtunk diszuccinimidil-tartrate-t (DST), etilén glikol-bisz-szuccinimidil szukcinát-ot (EGS), majd a primer aminokkal reagáló diszuccinimidil-szuberate-ot (DSS). A DSS keresztkötő reagens alkalmazásával a hemociták extraktumából a 16 kDa molekulatömegű Atilla molekula mellett egy 20 és egy 25 kDa molekulatömegű fehérjét ko-

immunoprecipitáltunk. Bár a western blot analízis során mind a 20, mind a 25 kDa-s molekulák esetén a 16 kDa molekulával megegyező erősségű jelet detektáltunk, sem a 20 sem a 25 kDa-os terméket nem tudtuk a tömegspektrometriai analízishez megfelelő mennyiségben előállítani.

A *Drosophila melanogaster* genomjában különböző homológiakereső programokkal 24 „*atilla-szerű*” gént azonosítottunk; az általuk kódolt fehérjék többsége GPI-hasító helyet valamint *u-PAR/Ly-6* domain-t is tartalmaz. Az „*atilla-szerű*” gének egy része a *Drosophila* genomjában egymás mellett, négy klasztert alkotva helyezkednek el, néhányukat más *Drosophilidae*-hez tartozó fajban valamint *Anopheles gambiae*, *Tribolium castaneum* and *Apis mellifera* fajokban is megtaláltuk.

### **Az Atilla (L1) fehérje sejt-közvetítette immunválaszban betöltött szerepének vizsgálata deléciós mutánsok létrehozásával**

Az *atilla* gén immunválaszban betöltött szerepét deléciós mutánsok létrehozásával vizsgáltuk. Ehhez rendelkezésünkre állt két EP-elem beépülés kb. egy kilobázis távolságra az *atilla* gén 3' végétől, amelyek két gén közötti, nem kódoló régióban helyezkednek el. Az EP elemek re-mobilizációja során gyakran előfordul, hogy a genomból való kiugrás során a P-elem a környezetéből DNS-szakaszokat visz magával, deléciót hagyva maga mögött, amely érintheti a környező géneket is. A genomban a homozigóta életképes *EP<sup>364</sup>* beépülést mobilizáltuk majd nyolc olyan deléciós jelöltből alapítottunk törzset, amelyek a delécióra nézve homozigóta életképes (*atilla<sup>40</sup>*, *atilla<sup>41</sup>*, *atilla<sup>275</sup>*, *atilla<sup>309</sup>*, *atilla<sup>346</sup>*, *atilla<sup>371</sup>*, *atilla<sup>376</sup>*, *atilla<sup>387</sup>*). Meghatároztuk a deléciók töréspontjait, majd a legnagyobb méretű deléciót hordozó *atilla<sup>309</sup>* allélt hordozó törzsből és kontrollként a pontos kivágódást tartalmazó *atilla<sup>384</sup>* törzsekben darázsszúrásal lamellocita differenciálódást indukáltunk. A hemociták extraktumával western-blot analízist végeztünk és azt tapasztaltuk, hogy az Atilla fehérje a homozigóta *atilla<sup>309</sup>* deléciós állatokban nem fejeződik ki, míg a kontrollként használt *atilla<sup>384</sup>* törzs hemocitáiban megnyilvánul.

Az Atilla molekulának a sejt közvetítette immunválasz tokképző reakciójában betöltött szerepét a legnagyobb méretű deléciót hordozó *atilla<sup>309</sup>* allélt és kontrollként a pontos kivágódást hordozó *atilla<sup>384</sup>* allélt hordozó törzsekben vizsgáltuk. A *Leptopilina bouvardi* G486 parazitoid darázs által kiváltott tokképzési reakcióban eltérést nem tapasztaltunk, ami azt jelenti, hogy az Atilla fehérje hiánya önmagában nem befolyásolja a parazita darázs elleni immunválaszt. Az elsődleges immunválasz folyamataira és az abban résztvevő molekulákra általánosan jellemző, hogy a korlátozott specifitást nagymértékű redundancia ellensúlyozza. Mivel a *Drosophila melanogaster* genomjában 24 *atilla-szerű* gént találtunk, így nem meglepő, hogy az Atilla fehérje hiánya nem feltétlenül jár együtt a tokképző funkció megváltozásával.

### **Az *atilla* deléció microarray analízise**

Az *atilla* gén sejt közvetítette immunválaszban betöltött szerepének megismeréséhez microarray analízist végeztünk. Ehhez a legnagyobb méretű deléciós allélt homozigóta formában hordozó, az Atilla fehérjét nem expresszáló *atilla<sup>309</sup>* vonalat, kontrollként pedig az Atilla fehérjét termelő pontos EP-elem kivágódással létrehozott

*atilla*<sup>384</sup> törzset használtuk. Második stádiumú *atilla*<sup>309</sup> és *atilla*<sup>384</sup> lárvákat *Leptopilina bouvardi* G486 parazita darázssal immunindukáltuk és az immunindukciót követő 24, 48, és 72 órával mRNS-t tisztítottunk. Az Affymetrix 2.0 microarray chipre páronként hibridizáltuk a két törzsből származó mRNS mintákat. Eredményeink szerint az immunindukciót követő 24. órában az attacin A antimikrobiális peptid génexpressziós szintje a logaritmus skálán ötödére, az attacin B antimikrobiális peptid génexpressziós szintje negyedére, további hét annotált, eddig ismeretlen funkciójú gén expressziós szintje a harmadára csökkent. A *minibrain* gén valamint két további ismeretlen funkciójú gén expressziós szintjében viszont közel ötszörös emelkedést mértünk. Az immunindukciót követő 48. órában három annotált, eddig ismeretlen funkciójú gén expressziós szintje közel négyszeresére emelkedett. Az immunindukciót követő 72. órában tíz annotált gén szintjében mértünk csökkenést és nyolc gén esetében viszont expresziós szint emelkedést, melyek közül négy az ecdizon vedlési hormon szabályozása alatt áll (*Eig71Ec*, *Eig71Ef*, *Eig71Eb*, *Eig71Ed*).

### **Az *atilla*-GAL4 meghajtó elemet hordozó transzgenikus törzs létrehozása**

A tokképző reakcióban szerepet játszó gének azonosításához első megközelítésben az *atilla* gén szabályozó régiójának felhasználásával lamellocita specifikus meghajtó elemet kívántunk létrehozni. Az *atilla* gén 5' regulátor régiója igen nagyméretű, 30 kb, ezért az *atilla* gén promóterétől 5' irányban elhelyezkedő öt, egyenként 6 kb nagyságú, egymással átfedő DNS szakaszt választottunk ki az *atilla* gén kifejeződését tükröző GAL4 meghajtó elemek előállítására. A regulátor szakaszokat CaSpeR vektorba klónoztuk és *white* embriókba injektáltuk, majd a *miniwhite* marker gén alapján azonosítottuk az inszerciót hordozó egyedeket, ezután a hímeket UAS-GFP konstrukciót hordozó szüzekhez kereszteztük. Az utódokat parazitoid darázssal immunindukáltuk, és lamellocita-specifikusan GFP-t expresszáló egyedeket kerestünk. Mivel lamellocita specifikus GFP expressziót egyetlen inszerció esetében sem találtunk, egy másik megközelítést alkalmaztunk.

A Flybase adatbázisában potenciális enhanszer-csapdázó inszerciókat kerestünk. Az *atilla* gén 5' nem transzlálódó régiójában található egy *minos* (MiET1) inszerció. Irodalmi adatok alapján (Metaxakis és mtsi 2005) a MiET1 elem enhanszerek csapdázásra képes; az elemben található egy 3xP3 promóterrel ellátott EGFP riportergén és egy hsp70 promóter által vezérelt GAL4 gén. Kísérleteink során mind a *Leptopilina bouvardi* parazitoid darázs pete által kiváltott immunindukció során differenciálódott lamellociták, mind a *l(3)mbn1* véresejt-tumoros genetikai háttéren képződő lamellociták kifejezik a GFP riportert, ami arra utal, hogy a *Mi{ET1}CG6579MB03539* jelű inszerció valóban csapdázza az *atilla* gén lamellocita specifikus enhanszerét (Honti és mtsi 2009). Bár az inszercióban található GAL4 gén aktivitását genetikai rendszereinkben nem tudtuk kimutatni, és így ez az inszerció nem használható lamellocita specifikus meghajtó elemként, mégis egyedi eszközként szolgál a lamellociták *in vivo* nyomkövetésében, továbbá egyéb véresejt-specifikusan kifejeződő GAL4 forrásokkal kombinálva az inszerció *in vivo* kettős-jelöléses rendszerekben is alkalmazható.

Az *atilla*-GAL4 meghajtó elem létrehozását nem adtuk fel, harmadik megközelítésként az *atilla*<sup>minos</sup> mutációt felhasználva, jelenleg P-elem re-mobilizáció segítségével egy funkcióképes GAL4 forrást tartalmazó P-elemet (*PGawB*) kívánunk az

*atilla* génbe ugratni. A kísérlet során a P-elemet a *miniwhite* riportergén kifejeződése alapján követjük, a megfelelő pozícióba történő beépülést pedig a *minos* elem GFP-expressziójának változása alapján detektáljuk.

### **Egy *Drosophila* integrin alegység (L4/Myospheroid $\beta$ PS) azonosítása a lárva tokképző sejtjein, a lamellocitákon**

A parazita darazsak petéi által kiváltott immunindukciót követően a *Drosophila* lárva véresejt kompartmentumai átrendeződnek; a prekursor típusú sejtek morfológiai változásokon mennek át és immunológiai sajátásaik is alapvetően megváltoznak (Márkus és mtsi. 2009). A lárva testüregének falára kitapadt szeszilis kompartmentumban található kis kerek prekursor típusú sejtek diszkoidális, majd nagy megnyúlt lamellocitákká alakulnak, miközben a sejtek antigén-mintázata és funkciója is alapvetően megváltozik. Az L4 molekula az indukciót követő 5. órában a hemociták 80%-án, később a differenciálódó diszkoidális és megnyúlt morfológiájú lamellocitákon expresszálódik. A darázs fertőzés korai szakaszában L4 expressziót figyeltünk meg a fagocita funkcióval bíró kis kerek, plazmatocita morfológiájú és a nagyobb méretű szintén fagocitáló diszkoidális alakú hemocitákon, míg a fertőzés későbbi szakaszában az L4-t expresszáló nagyméretű, megnyúlt morfológiájú lamellociták elvesztették fagocitáló képességüket. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy fagocita funkcióval rendelkező sejtek tokképző lamellocitává alakulhatnak. (Honti és mtsi. 2010).

Az L4 molekulát tömegspektrometriai (MALDI-TOF) analízissel *Drosophila melanogaster*  $\beta$ PS fehérjéjeként azonosítottuk. Azt, hogy az L4-t valóban a *myospheroid* gén kódolja-e úgy vizsgáltuk meg, hogy a *myospheroid* gént csendesítő RNSi konstrukciót (1560R-2, Kyoto Törzsközpont) *Hemese-GAL4* (HP3#85) meghajtóelem segítségével véresejtspecifikusan kifejeztettük, és az immunindukált egyedek véresejtjein az L4 antigénnel reagáló ellenanyagunk segítségével meghatároztuk az antigén expressziójának a szintjét. A *myospheroid* gén termékének RNS interferenciával történő csendesítését követően azt tapasztaltuk, hogy a *w; mys-RNAi/+; Hemese-Gal4/+* lárvák véresejtjein az L4 antigén, azaz a  $\beta$ PS fehérje kifejeződése a szülői törzsekből származó hemocitákkal összevetve, a felére csökken. A tokképző reakció során jellegzetesen megnyilvánuló L4 antigént tehát egy, a sejt-sejt kölcsönhatásokban résztvevő *Drosophila* integrin complex  $\beta$  alegységeként azonosítottuk, mely az immunindukciót követően mind a plazmatocitákban, mind a lamellocitákban részt vesz a tokképző reakció alakításában (Honti és mtsi 2010).

Mivel az *atilla*<sup>309</sup> deléciós mutáns vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az Atila fehérje hiánya nem befolyásolja a tokképzést, ezért megpróbálkozunk a lamellocita specifikus gének mutánsainak kombinációival. Rekombinációval létrehoztunk egy *atilla*<sup>minos</sup> *myospheroid* RNSi /CyOGFP *Drosophila* törzset, melynek segítségével előállíthatók olyan lárvák, melyek az *atilla*-ra nézve null mutánsok, azaz nem fejezi ki az Atila fehérjét, viszont a lamellociták kifejezik *minos* elembe található GFP-t, azaz zölden fluoreszkálnak (Honti és mtsi. 2009). Ezekben a lárvákban a myospheroid (L4) expressziójának a szintje a különböző hemocita specifikus meghajtó elemekkel csökkenthető. Ennek az *atilla*<sup>minos</sup> *myospheroid* RNSi/CYOGFP törzsnek a felhasználásával azt kívánjuk megvizsgálni, hogy a tokképzési reakció során az *atilla* és a *myospheroid* mutat-e genetikai interakciót.

A tokképzés folyamatának *in vivo* vizsgálatához létrehoztunk egy olyan transzgen kombinációt hordozó *Drosophila* vonalat, amelyben az egyes véresejt típusok különböző színű fluoreszcens molekulákat fejeznek ki, a plazmatociták *eater*-RFP-t expresszálnak, így pirosan világítanak, a kristálysejteket a *Black cells*-CFP kéken jelöli, a lamellociták pedig a *misshapen*-GFP (Tokusumi és mtsi. 2009) kifejeződésének köszönhetően zöld színben fluoreszkálnak.

### A lamellocitákon megnyilvánuló L2 molekula vizsgálata

A nagyméretű, terminálisan differenciálódott lamellocitákon megnyilvánuló L2 molekulát lamellocitákat túltermelő *l(3)mbn-1* mutáns hemocita extraktumából immunoprecipitáltuk és az immunoprecipitált mintában MALDI-TOF analízissel *Drosophila* Actin57B peptideket azonosítottunk. Az L2 molekulát felismerő 31A4-es ellenanyag a lamellocitákon kívül a harántcsíkolt izom festődését mutatja, de az *drxex8* actin57B mutáns lárvák lamellocitáin nem állt módunkban az L2 molekula expresszióját megvizsgálni, mert ez a vonal az irodalomban közölt eredmények ellenére nem hozzáférhető (Davis és mtsi. 2003).

Az Act57B géntermék kifejeződését RNS interferenciával gátoltuk, ehhez egyrészt a *Hemese-GAL4* meghajtó elemet használtuk, másrészt egy *UAS-actin57B* RNSi törzset hoztunk létre. Ehhez az actin57B gén 3'UTR-ból építettünk be egy szakaszt a vektorba, a hairpin képzéshez kétfele orientációban, mert a *Drosophila* aktin-ok közül kizárólag ez a szakasz rendelkezik egyedi szekvenciával az *actin57B* génre nézve. A *Hemese-GAL4>UAS-actin57B* RNSi lárvákban *Leptopilina bouvardi* G486 parazitoid darázs immunindukció hatására képződött lamellocitákon az L2 expressziója nem változott a szülői törzsekből származó lamellociták L2 kifejeződéséhez képest.

Mivel RNS interferenciával nem minden esetben csendesíthető a géntermék képződése, ezért egy másik megközelítési móddal is megpróbálkoztunk: *UAS-actinGFP* fúziós transzgeneket (Röper és mtsi. 2005) fejeztettük ki hemocitákban a *Hemese-GAL4* meghajtó elem felhasználásával. A *Hemese-GAL4>UAS-actinGFP* genotípusú parazitoid darázzsal immunindukált lárvákban a véresejtek döntő többsége zölden fluoreszkált, azaz kifejezte a GFP fúziós fehérjét, de L2 festődés kizárólag a lamellocitákon volt megfigyelhető, ami azt jelenheti, hogy az L2 molekulát azonosító 31A4 ellenanyag nem közvetlenül kötődik az aktin molekulához, hanem valószínűleg egy aktin-asszociált molekulát ismer fel.

Az L2 molekulát kódoló gén azonosítását expressziós génkönyvtár screenelésével is megkíséreltük. Ehhez hemocitákat túltermelő, *l(3)mbn-1* véresejtjeiből indultunk ki, amely kb 30 %-ban tartalmaz lamellocitákat. Az expressziós cDNS könyvtár készítéséhez ZAP Express™ cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene) kitet használtuk. A könyvtárat az L2 molekulát felismerő monoklonális ellenanyaggal, blotting technikával screeneltük. Az *l(3)mbn-1* hemocita cDNS könyvtár szűrővizsgálata során a 31A4 ellenanyaggal  $209 \times 10^4$  fúziós fehérjét tartalmazó tarfoltot vizsgáltunk meg, melynek során hét független klónt azonosítottunk. A fágokból *in vivo* excízió során nyertük ki a cDNS inszertet tartalmazó pBK-CMV fágmid vektorokat, amikkel az XL0LR baktérium törzset transzformáltuk. Az XL0LR törzsben felszaporítottuk a fágmid vektorokat, és független baktériumtelepekből plazmid DNS-t izoláltunk. Klónonként 2-6 plazmid DNS-t szekvenáltattunk meg, és az EcoRI és XhoI hasító helyek közötti szekvenciával BLAST

keresést végeztünk. A BLAST keresés a hét függetlenül izolált cDNS klónból hat esetben a *Drosophila* Laminin B2 aleggységét kódoló gént (*LanB2*) azonosította. A Laminin B2 géntermék RNS inhibíciós csendesítésével megvizsgáltuk, hogy a *Drosophila* lárva véresejtjein a 31A4 ellenanyaggal azonosított molekulát valóban a *LanB2* gén kódolja-e. Darázsfertőzést követően az L2 antigén megnyilvánulása az RNS interferenciával csendesített utódok esetében nem csökkent, tehát az L2 molekulát valószínűleg nem a *LanB2* gén kódolja. Az expressziós génkönyvtár szűrése során a pozitív tarfoltokat valószínűleg immunológiai keresztreakció okozza, hiszen a prokarióta rendszerben kifejeztetett eukarióta fehérjék másodlagos módosulása sok esetben zavart szenvedhet.

### **A tokképző sejtek differenciálódásának vizsgálata az Atila (L1) és L2 molekulák felhasználásával**

A parazita darázs petéje által kiváltott immunindukciót követően a *Drosophila* lárvában nyomon követtük a tokképző sejtek, a lamellociták képződését. A lárva véresejtjeit a *Hemese-GAL4>UAS-GFP.nls* konstrukcióval tettük láthatóvá, majd darázsfertőzést követően a NimC1 (Kurucz és mtsi. 2007a) és a L1 molekulák segítségével meghatároztuk a szesszilis szövetben és a keringésben a véresejtek számának változását, valamint immunológiai fenotípusukat. A darázsszűrást követő harmadik napon azt tapasztaltuk, hogy a lárva kutikulájának belső falához tapadt, sávokba rendeződött szesszilis véresejtek leváltak, ezzel egy időben a lárva keringő véresejtjeinek száma a szesszilis véresejtek számával megegyező mértékben emelkedett. Ezután a szesszilis szövetet egy ligatúra segítségével elhatároltuk a központi vérképző szervtől a lymph gland-tól, majd az elkülönített testrészekben a darázsszűrást követően meghatároztuk a differenciálódó véresejtek fenotípusát. Az L2 marker segítségével megállapítottuk, hogy 48 órával a darázsfertőzést követően lamellociták kizárólag a lárva poszterior felében jelennek meg, azaz a szesszilis véresejtekből differenciálódnak. A lárva anterior felében elhelyezkedő a lymph gland sejtjeit jelölő enhanszer csapdázó *hdc<sup>B5</sup>* vonal segítségével megállapítottuk, hogy lymph gland eredetű lamellociták csak a darázsfertőzés késői stádiumában, a lymph gland szétesése során, akkor is kis számban, kerülnek a keringésbe. A lamellociták szesszilis sejtekből történő differenciálódásának további vizsgálatához az L1 molekulát nem expresszáló, *Hemese>GFP-t* kifejező szesszilis véresejteket vad típusú *Oregon-R* lárvákba transzplantáluk, melynek során azt tapasztaltuk, hogy a zölden fluoreszkáló szesszilis sejtek a recipiens lárvákban L1 molekulát kifejező lamellocitákká differenciálódtak. A szesszilis vérképző szövet parazita darázs immunindukciót követő vizsgálata során kapott eredményeinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy az eddig, a szakirodalom által a lamellociták differenciálódásának kizárólagos helyéül deklarált vérképző szerven, a lymph gland-en kívül, a lárva kutikulájának belső falához tapadt ún. szesszilis véresejtek szolgálnak a parazita darázs petéje elleni immunválasz elsődleges forrásául (Márkus és mtsi 2009).

### **Az L6 molekula vizsgálata**

Az L6 molekula az hemocitákat túltermelő *l(3)mbn-1* mutáns lárvális véresejtjein a terminálisan differenciálódott nagyméretű, megnyúlt lamellociták alpopulációján nyilvánul meg. A vad típusú *Oregon-R* törzs lárváiban a parazita darázsak petéi által

kiváltott immunindukciót követő 12 és 16 óra között, a vizsgált lamellocita specifikus markerek közül a legkésőbb időpontban jelenik meg (Honti és mtsi 2010), a teminálisan differenciálódott nagy elnyúlt morfológiájú lamellocitákon. Az L6 molekulát biokémiai módszerekkel eddig nem tudtuk izolálni, ezért *l(3)mbn1* hemocita expressziós génkönyvtárat screeneltük az L6 molekulát azonosító ellenanyaggal. A  $209 \times 10^4$  fúziós fehérjét tartalmazó tarfoltot blotting vizsgálatával a génkönyvtárból nem sikerült pozitív klónt kihalásznunk.

A pályázat keretében a sejt-közvetítette immunitás tokképző reakciójában résztvevő szabályozó folyamatokat vizsgáltuk *Drosophila melanogaster* modellszervezetben, az ecetmuslica immunsejtjein az általunk korábban azonosított molekuláris markerek felhasználásával.

Reverz genetikai módszerekkel azonosítottuk az *atilla* gént. Megállapítottuk, hogy az Atilla (L1) fehérje egy glikozilfoszfátidilinozitol (GPI) horgonyozó hellyel rendelkező transzmembrán molekula, a Ly6 szupercsalád tagja, az első olyan, lipid raftokkal asszociált fehérje, mely a *Drosophila* vérsejtjein fejeződik ki. A *Drosophila melanogaster* genomjában 24 „*atilla-szerű*” gént azonosítottunk, az általuk kódolt fehérjék nagy része GPI-hasító helyet valamint *u-PAR/Ly-6* domént is tartalmaz. Az *atilla-szerű* gének egy része a *Drosophila* genomjában négy klaszterben helyezkedik el. *Atilla-szerű* géneket találtunk továbbá a *Drosophilidae*-hez tartozó egyéb fajokban, valamint *Anopheles gambiae*-ban, *Tribolium castaneum*-ban és az *Apis mellifera*-ban.

Az *atilla* gén 5' nem transzlálódó régiójában *minos* (MiET1) inszerciót azonosítottunk, melyről kimutattuk, hogy az csapdázza az *atilla* gén lamellocita specifikus enhanszerét. Az inszercióban található GAL4 gén aktivitása genetikai rendszerekben nem mutatható ki, azonban egyedi eszközként szolgál a lamellociták *in vivo* nyomonkövetésében, továbbá egyéb vérsejt-specifikusan kifejeződő GAL4 forrásokkal kombinálva ez az inszerció *in vivo* kettős-jelöléses rendszerekben is alkalmazható.

Az L4 antigént, mint a *Drosophila*  $\beta$ PS integrin alegységet azonosítottuk a lárva tokképző sejtjein, a lamellocitákon. Genetikai sejtvonaltjelölő rendszer alkalmazásával megállapítottuk, hogy az L4/ $\beta$ PS-t expresszáló populáció a tokképző reakció során morfológiai és funkcionális változáson megy át: a sejtek megnyúlnak, és ezzel párhuzamosan elveszítik fagocitáló képességüket és kizárólag a tokképző reakcióban vesznek részt. Ezek az eredmények rámutatnak a veleszületett immunitás sejtes elemeinek nagyfokú morfológiai és funkcionális plaszticitására.

Az L2 intracelluláris lamellocita marker vizsgálata során megállapítottuk, hogy a molekula a lamellocita differenciálódás végső stádiumában feltehetőleg az aktinnal képez molekula-komplexet.

Az általunk azonosított hemocita specifikusan kifejeződő markereket alkalmazva megállapítottuk, hogy az eddig, a szakirodalom által a lamellociták differenciálódásának kizárólagos helyéül deklarált vérképző szervben, a lymph gland-en kívül, a lárva testüregére tapadt ún. szesszilis vérsejtek funkcionálisan egységes szövetet képeznek, melyből származó sejtek szolgálnak a parazita darázs petéje elleni immunválasz elsődleges forrásául.



### **A K68830 pályázat támogatásával megjelent közleményeink:**

Márkus R, Laurinyecz B, Kurucz E, Honti V, Bajusz I, Sipos B, Somogyi K, Kronhamn J, Hultmark D, Andó I (2009) Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4805–4809.

Honti V, Kurucz E, Csordás G, Laurinyecz, Márkus R, Andó I (2009) In vivo detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunology Letters* 126:83–84.

Honti V, Csordás G, Márkus R, Kurucz E, Jankovics F, Andó I (2010) Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Immunology* 47:1997–2004.

### **Hivatkozások:**

Brennan CA. and Anderson, KV (2004) The Genetics of Innate Immune Recognition and Response. *Ann Rev Immunol* 22:457-483.

Davis RJ, Tavsanli BC, Dittrich C, Walldorf U, Mardona G (2003) *Drosophila retinal homeobox (drx)* is not required for establishment of the visual system, but is required for brain and clypeus development. *Developmental Biology* 259:272–287.

Gombos I, Bacsó Zs, Detre C, Nagy H, Goda K, Andrásfalvy M, Szabó G, Matkó J (2004) Cholesterol sensitivity of detergent resistance: a rapid flow cytometric test for detecting constitutive or induced raft association of membrane proteins. *Cytometry* 61A:117–126.

Hálová I, Dráberová L, Dráber P (2002) A novel lipid raft-associated glycoprotein, TEC-21, activates rat basophilic leukemia cells independently of the type 1 Fc epsilon receptor. *Int Immunol*.14:213-23.

Hijazi A, Masson W, Augé B, Waltzer L, Haenlin M, Roch F. (2009) *boudin* is required for septate junction organisation in *Drosophila* and codes for a diffusible protein of the Ly6 superfamily. *Development* 136: 2199-2209.

Honti V, Kurucz E, Csordás G, Laurinyecz, Márkus R, Andó I (2009) In vivo detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunology Letters* 126:83–84.

Honti V, Csordás G, Márkus R, Kurucz E, Jankovics F, Andó I (2010) Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Immunology* 47:1997–2004.

Horejsi V. Lipid rafts and their roles in T-cell activation. (2005) *Microbes and Infection* 7:310–316.

Kurucz É, Zettervall CJ, Sinka R, Vilmos P, Pivarsci A, Ekengren S, Hegedüs Z, Andó I, Hultmark D. (2003) Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2622–2627.

Kurucz É, Márkus R, Zsámboki J, Folkl-Medzihradzky K, Darula Z, Vilmos P, Udvardy A, Krausz I, Lukacsovich T, Gateff E, Zettervall CJ, Hultmark D, Andó I. (2007a) Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr Biol.*17:649–54.

Kurucz É, Váczi B, Márkus R, Laurinyecz B, Vilmos P, Zsámboki J, Csorba K, Gateff E, Hultmark D, Andó I. (2007b) Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biol Hung.* 58 Suppl:95-111.

Kurucz É, Laurinyecz B, Somogyi K, Márkus R, Honti V, Csordás G, Zsámboki J, Varga G, Folkl-Medzihradzky K, Darula Zs, Lukacsovich T, Udvardy A, Mihály J, Horejsí V, Andó I. Atilla is a member of the Ly6 superfamily is associated to lipid rafts in *Drosophila* blood cells (Kézirat).

Márkus R, Laurinyecz B, Kurucz E, Honti V, Bajusz I, Sipos B, Somogyi K, Kronhamn J, Hultmark D, Andó I (2009) Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4805–4809.

Metaxakis A, Oehler S, Klinakis A, Savakis C (2005) Minos as a genetic and genomic tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 171:571–81.

Rietveld A, Neutz S, Simons K, Eaton S (1999) Association of Sterol- and Glycosylphosphatidylinositol-linked Proteins with *Drosophila* Raft Lipid Microdomains. *JBC.* 274:12049–12054.

Röper K, Mao Y, Brown NH (2005) Contribution of sequence variation in *Drosophila* actins to their incorporation into actin-based structures *in vivo*. *J.Cell Science* 118:3937-3948.

Simons K, Gerl MJ (2010) Revitalizing membrane rafts:new tools and insights. *Nature Rew.* 11:688-698.

Tokusumi T, Shoue DA, Tokusumi,Y, Stoller JR, Schulz RA (2009) New hemocyte-specific enhancer-reporter transgenes for the analysis of hematopoiesis in *Drosophila*. *Genesis* 47:771–774.

Williams MJ (2007) *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* 178: 4711–4716.

Zajchowski LD, Robbins SM (2002) Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur.J.Biochem.* 269:737-752.

Zettervall CJ, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, Kurucz E, Ando I, Hultmark D.  
(2004) A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14192–14197.