

# ŐSI ÖRÖKSÉGÜNK, A VELESZÜLETETT IMMUNITÁS: A *DROSOPHILA* IMMUNRENDSZERE

Andó István

tudományos tanácsadó, a biológiai tudomány doktora

Laurinyecz Barbara

PhD-hallgató

Márkus Róbert

PhD-hallgató

Rus Florentina

PhD-hallgató

Vácz Balázs

PhD-hallgató

Zsámboki János

szakdolgozó

Kurucz Éva

tudományos főmunkatárs, PhD

MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézet

Ando@nucleus.szbk.u-szeged.hu

A rovarok a fajok számát és változatosságát tekintve az élővilág legsikeresebb tagjai. Becslések szerint a jelenleg élő állatfajok mintegy 90 %-át alkotják, és mind a szárazföldön, mind a vizekben széleskörűen elterjedtek. Élőhelyüket potenciális ellenségeikkel, mikroorganizmusokkal és soksejtű parazitákkal osztják meg, melyekkel állandó küzdelemben állnak. A múlt század elején már nyilvánvalóvá vált, hogy a rovarok a kórokozókkal szemben hatékony, humorális és sejtjes elemekből álló immunrendszerrel védekeznek. A *humorális immunválasz* a fertőzések által kiváltott antimikrobiális peptidek termelése, melynek genetikai szabályozása és folyamata jól ismert. Tudjuk, hogy a fertőzés a rovarok zsírtestjének sejtjeiben, a gerincesek májának funkcionális homológjában, és egyes vérésejtjeiben váltja ki az antimikrobiális peptidek termelését. Az antimikrobiális peptidek általában a bakteriális sejtmembránra a szerveződés szempontjából egyik legkonzervatívabb elemeihez, az ionsator-

nákhoz hasonló szerkezeteket hoznak létre: vagy rendszertelen beépülésükkel zilálják szét a membrán szerkezetét, vagy több molekula együtt, csatorna formájában komplexet alkot, átengedi az ionokat, és így teszi tönkre a mikroba ionháztartását. Az ionsatornák szerkezetének nagyfokú konzerváltsága biztosítja a strukturális és működésbeni alapot a peptidek támadásához, ugyanakkor a peptidek membránba történő sikeres beépülése eredményezi a mikroorganizmus biztos pusztulását. Az ionsatornák alapvető biológiai funkciójából származó konzerváltsága eredményezi azt, hogy a peptidekkel szemben az évek tízmilliói során sem alakult ki rezisztencia. Ez a humorális válasz nem rendelkezik a gerincesek immunellenanyagaihoz hasonló specifitással és memóriával, viszont szabályozásának egyes elemei szinte az egész élővilágban azonos szerepet töltenek be. Ezeknek a szerkezetileg egymáshoz hasonló elemeknek a közös őse nem ismert, azonban

valószínű, hogy a saját-nem saját struktúrák egymástól történő megkülönböztetésében játszott szerepet. Ezeknek a molekuláknak az első megismert képviselője a *Drosophila* Toll receptor, amely napjainkban egy soktagú és egyre bővülő molekulacsalád alapítója. A *sejtes immunválasz* legősibb folyamata, a bekebelezés, az egysejtű szervezetektől a rovarokon keresztül a gerincesekig minden állati szervezetben a védekező reakciók részét képezi, és a sejt-nél kisebb méretű részecskék eltávolítására hivatott. A sejt-méretű vagy annál nagyobb részecskék eltávolítására a többsejtű szervezetekben speciális védekező reakciók (tokképzés, természetes ölü aktivitás) jöttek létre.

#### A *Drosophila* immunvédekezése

A *Drosophila* fejlődése minden egyes stádiumában más és más védelmi rendszert használ a szervezete egységének megbontására készülő betolakodókkal szemben. Az embriót a mikroorganizmusok számára áthatolhatatlan burok veszi körül. A lárvákat lágy kitékületűkula védi a mikroorganizmusok behatolásától, de egyes paraziták, például a fűrészdarazsak tojócsove könnyedén áthatol rajta. A testnyílások – a száj, a végbélnyílás és a légzőnyílások – a mikroorganizmusok számára nyithatnak kaput. A kifejlett rovarok kemény kutikulája a fizikai ártalmakkal szemben biztosít hatékony védelmet, de a légzőnyílások és az emésztőcső nyílása a mikroorganizmusok számára ugyanúgy bemeneti kapuként szolgálhat, mint a lárvákban. Az immunvédekezés elemei is ennek megfelelően változnak az egyedfejlődés során. Az embrióban az úgynevezett embrionális falósejtek az apoptotikus sejtek eltávolítására specializálódtak, de az immunvédekezésben betöltött esetleges szerepük nem tisztázott. A lárvában jelennek meg először, és a kifejlett rovarban is jelen vannak a betolakodók eltávolítását szolgáló immunszövetek és immunvédekezési folyamatok. A tápanyag-

gal az emésztőcsőbe jutó mikroorganizmusokat a helyben termelő lizozim enzim, a légzőnyílásokon behatoló baktériumokat és gombákat pedig a nyílásoknál elhelyezkedő hámsejtek által termelt antimikrobiális peptidok támadják meg. A testüregebe bejutott mikroorganizmusokat a testnedvekben keringő vörsejtek egy csoportja, a plazmatociták kebelezik be, valamint a zsírtest által termelt antimikrobiális peptidok pusztítják el. Az így elpusztított mikroorganizmusokat ugyancsak a vörsejtek takarítják el a szervezetből.

A lárvák számára jelentős veszélyt jelentenek a paraziták és a parazitoidok, köztük is a leggyakrabban előforduló fűrészdarazsak. Ez utóbbiak petéiket a *Drosophila* lárvá testüregébe rakják, és a fejlődő parazitoidok számára a *Drosophila* szövetei szolgálnak táplálékkul. A parazitoiddal történt fertőzést követően az esetek egy részében a *Drosophila* lárvája a paraziták „felnevelése” során elpusztul. Ha a parazitoiddal történő fertőzés minden esetben sikeres lenne, az előbb-utóbb a gazdaszervezet és ezzel együtt magának a parazitoidnak a kihalásához vezetne. Egy populációs szinten finoman szabályozott immunreakció megléte vagy hiánya azonban biztosítja mind a gazdaszervezet, mind pedig a parazitoid túlélését: néhány esetben a gazdaszervezet hatékony immunreakciót indít a betolakodóval szemben, melynek során nagyméretű, lapos vörsejtek, a lamellociták differenciálódnak. A lamellociták több rétegben burkolják be a plazmatociták által nem bekebelezhető nagyméretű parazoid petéket, majd az így képződött tok a petével együtt melanizálódik, és a pete elpusztul. A melanizációs folyamatban kitüntetett szerepet játszanak a kristályszerű zárványokat, a feltételezések szerint profenoloxidázt tartalmazó vörsejtek, az ún. kristálysejtek. További veszélyforrást jelentenek a *Drosophila* számára a szövetburjánzások, tumorok. Ezek kifejlődése szinte minden esetben a szervezet pusztulásához vezet. Az immunrendszerben

képződő szövetburjánzások és tumoros sejtek invázióját követően a véresejtek száma emelkedik, melyet a legtöbb esetben lamellociták differenciálódása és tokképzés kísér.

A kifejlett rovarra nézve a legnagyobb veszélyt a mikroorganizmusok jelentik. Az emésztő- vagy a légzőszerven keresztül behatoló baktériumokat és gombákat – a lárvához hasonlóan – az antimikrobiális peptidek és a falósejtek távolítják el. Érdekes, hogy osztódó véresejtek kizárólag az embrióban és a lárvában fordulnak elő. A kifejlett rovarban eddig nem sikerült osztódó véresejteket azonosítani.

A Gram-pozitív baktériumok és a gombák, valamint a Gram-negatív baktériumok egymástól eltérő aktivációs utakon keresztül különböző antimikrobiális peptidek termelését indukálják. A humorális immunválasz szabályozásában szerepet játszó transzkripciós faktorok közvetlenül csak az antimikrobiális peptidek termelésének a szabályozásában vesznek részt, a celluláris immunválaszt nem érintik.

#### *A humorális immunitás szabályozása*

A mikrobák – gombák, Gr+ és Gr- baktériumok felismerése – egymástól eltérő genetikai finomszabályozás alatt áll. A *Drosophila* humorális immunválaszához vezető antimikrobiális peptid gének megnyilvánulását alapvetően két aktivációs út, a Toll és az Imd aktivációs utak elemei szabályozzák. A Toll közvetítette utat gombák és Gram-pozitív baktériumok aktiválják, különböző mechanizmus alapján: a gombák, egy eddig ismeretlen folyamat révén egy proteolitikus láncreakció eredményeként a Toll receptor endogén ligandját, a Spätzle-t aktiválják. A Gram-pozitív baktériumok egy ettől független, szekretált, szolubilis, peptidoglikán-felismerő proteinen keresztül aktiválják az immunválaszt. A Toll út aktiválása minden esetben a Dif transzkripciós faktor sejtmagba történő átjutását eredményezi, amit antimikrobiális peptidek (drosomicin) termelése

követ. A Gram-negatív baktériumokat egy peptidoglikán-felismerő transzmembrán receptor ismeri fel, és ez vezet az Imd jelátviteli út Relish NF- $\kappa$ B transzkripciós faktoron keresztüli aktiválásához. Az Imd út nagyfokú hasonlóságot mutat az emlős TNF- $\alpha$  aktivációhoz.

#### *A Toll receptor család*

Az legelsőként a *Drosophilában* azonosított, az embrió hát-hasi polaritás kialakulását szabályozó Toll receptor egy transzmembrán fehérje, leucingazdag extracelluláris, és az IL-1 receptor intracelluláris jelátvivő régiójához hasonló domént tartalmaz. A Toll receptornak a specifikus liganddal történő kapcsolódása egy olyan láncreakciót aktivál, melynek eredményeként a citoplazmában lévő transzkripciós faktorok előalakjai proteolízis eredményeként aktiválódnak, a sejtmagba vándorolnak, és ott a Gram-pozitív baktériumokat és gombákat elpusztító antimikrobiális peptideket kódoló gének aktiválódását indítják meg. Bár a *Drosophilában* azonosított Toll receptorok száma jelenleg tíz körül jár, semmilyen jel nem utal arra, hogy a különböző Toll molekulák különböző mikroorganizmusokat ismerne fel. A *Drosophila* Toll nem köt mikrobiális komponenseket, sőt, mikrobákkal történő fertőzést követően a kifejeződésük szintje sem változik. A humán genom program előrehaladtával kiderült, hogy a humán genomban igen sok Toll receptor kódolt, melyek az immunrendszer egyes elemein nyilvánulnak meg. A *Drosophilával* ellentétben, az emlős Toll receptorok mikrobiális komponenseket is felismernek, és a Toll-receptorok közvetítette sejtaktiválás eredője a kialakuló elsődleges immunválasz. A *Drosophila* és a gerinces Toll szekvenciáinak összehasonlítása azt mutatja, hogy a rovarok és az emlősök közös őse valószínűleg egyetlen Toll génnel rendelkezett, mely duplikálódott, és ezt követően, különböző

szelekciós nyomáshoz alkalmazkodva két fő géncsaláddá fejlődött, melyeknek egyike endogén ingereket, míg másik csoportja a mikrobák antigénjeinek konzervált elemeit, mintázatát ismeri fel.

#### *A peptidoglikán receptorok (PGRP-k)*

A PGRP-ket először moleplekében, a melanizációs folyamatok szabályozójaként azonosították. Később felismerték az antimikrobiális peptidok temelésének szabályozásában, ezen belül a peptidoglikánok felismerésében betöltött szerepét, majd szekvenciahomológiák alapján *Drosophilában* is megtalálták. *Drosophilában* legalább tizenhárom, emberben legalább négy formája ismert; valamennyi-nyinek közös eleme a százhatvan aminosavas peptidoglikán-felismerő domén, valamint mindkét fajban létezik szekretált és transzmembrán receptor formája. *Drosophilában* a szekretált forma szükséges a Gr+, míg a transzmembrán forma a Gr- baktériumokkal szembeni immunválasz megindításához.

#### *A Drosophila sejtis immunitása*

Az antimikrobiális peptidok temelésének jól ismert szabályozási folyamatai mellett az immunválasznak olyan folyamatai is léteznek, melyeknek részleteiről keveset tudunk. Ezek közé tartozik a vérszövetek által közvetített *sejtis immunitás* két fő formája, a bekebelezés és a tokképző reakció. A sejtis immunválaszt eddig elsősorban morfológiai szempontból sikerült jellemezni, azaz fénymikroszkópos, elektronmikroszkópos, valamint klasszikus szövettani festési eljárásokkal sikerült azonosítani a fő vérszövetlakokat. Nagyon keveset tudunk azonban azokról a sejtekhez kapcsolt folyamatokról, melyek a támadó mikroorganizmusok és paraziták felismerését követően a mikroorganizmusok bekebelezéséhez vagy a parazitáknak a gazdaszervezetben történő elhatárolásához, betokozódásához vezetnek. A sejtis és a humorális immunválaszt megelőzően, illetve azzal egy időben

proteolitikus kaszkádok aktiválódnak, melyek a testnedvek koagulációját, valamint melanizációs folyamatokat indítanak el, és végső soron a sérülés helyének gyógyulásához vezetnek, vagy a betolakodó pusztulását eredményezik. Nemcsak a sejtis immunitás alapvető folyamatairól szerzett ismereteink hiányosak, hanem a fő vérszövet oszta-lyok fejlődéséről, egymáshoz való viszonyáról is igen keveset tudunk. Ezért határoztuk el, hogy *a Drosophila mint modellszervezet által biztosított molekuláris biológiai és klasszikus genetikai eszköztárat ötvözzük az immunológia eszköztárával. Ennek eredményeként egy genomikai és proteom szintű megközelítésre épült rendszert hoztunk létre, mely a Drosophila veleszületett immunitásának megismerésén túlmenően a veleszületett immunitás eddig ismeretlen, az állatvilágra általánosan érvényes folyamatainak vizsgálatát teszi lehetővé.*

Az immunrendszer sejtis elemeire jellemző molekuláris markereket azonosítunk, jellemezzük a kódoló géneket, és meghatározzuk a gének regulátor régióit. Így a vérszövet differenciálódási vonalak azonosítása mellett, a vizsgált gének sejt típus-specifikus kifejeződésének következtében, az adott sejt típus működését is megismerhetjük. Ennek a vizsgálati rendszernek a segítségével a *Drosophila* sejtis immunitásának kialakulásában és a sejtis immunválasz szabályozásában irányító szerepet játszó molekulákat azonosítunk. Eddigi ismereteink szerint a *Drosophila* és az ember utolsó közös őseinek veleszületett immunitása szinte egy egységként maradt fenn az evolúció több százmillió éve alatt, ezért feltételezhetjük, hogy a sejtis immunitás molekuláris elemei is minimális változásokkal éltek túl az evolúció viharait. Reményeink szerint az azonosított új elemek hidat képeznek az idő homályába vesző közös ősökön keresztül a törzsfelődés során egymástól távol került fajok között, ezért a *Drosophila* sejtis immunitásának megisme-

rése alapvetően új elemekkel gazdagítja az élővilág védekező folyamatairól szerzett ismereteinket.

A *Drosophila* embrióban a feji mezodermából származó falósejtek, az ún. embrionális makrofágok már az embrionális élet korai stádiumában megjelennek. Később, a peterakást követően tizennégy-tizenhat órával, a laterális mezodermából alakul ki a fő nyirokszerv, a nyirokmirigy, mely a lárva-ban majdan a fő vérsajt-populációt alkotó plazmatociták, a lamellociták és a kristálysejtek képződési helyéül szolgál. Az embrionális élet végén, az embrióburkot elvető lárva már rendelkezik a vérképző szervvel. Testnedveiben plazmatociták és kristálysejtek keringenek, és a testüreg belső falához is vérsajtek tapadnak, ez az ún. szesszilis szövet. A lárva kétszer vedlik, mielőtt bebábozódna. A második vedlést követően, közvetlenül a bábozódást megelőzően, lamellociták figyelhetők meg a keringésben, melyeknek eredete és funkciója ebben a stádiumban nem ismert. A parazitákkal történt differenciálódás nagyfokú lamellocita-differenciálódás figyelhető meg, eredetük azonban nem ismert, egyes feltételezések szerint a nyirokmirigyből származnak. A bábban az immunrendszer alapvető morfológiai és funkcionális átalakulása megy keresztül. A nyirokmirigy szerkezete felbomlik, a bábban azonban megfigyelhető néhány falósejt. A kifejlett rovar testnedveiben ugyancsak megtalálhatók a vérsajtek, amelyek eredete szintén nem tisztázott, és az sem világos, hogy esetleg mely, eddig ismertett vérsajt-populációhoz tartoznak. A *Drosophilában* folyó vérsajt-differenciálódás tehát egy komplex folyamat, melynek megismerése nemcsak érdekes, a rovarok immunrendszerét érintő kérdésekre adhat választ, hanem segítheti egy, a törzsfajlás során megmaradt és a gerinces szervezetekben is igen hatékony funkcionális egység működésének a megértését.

Az embrionális makrofágok szabadon vándorolnak a fejlődő szövetek közötti virtuális résekben. Elsősorban az embrionális élet során zajló, szöveti átrendeződést kísérő sejtpusztulás termékeit falják fel és takarítják el. Az apoptotikus sejteket a Croquemort (Crq) transzmembrán fehérje (az emberi CD36 funkcionális homológja) ismeri fel. A vérsajtek újabb csoportjai, a lárva testnedveiben keringő vérsajtek a hemociták és a fő vérképző szerv az embrióban indul fejlődésnek. Ebben a stádiumban egy, a mezodermából kialakuló sejtcsomóban vérsajtek differenciálódnak, melyek egyes, a törzsfajlás során konzervált transzkripciós faktorok expresszióját tekintve heterogenitást mutatnak. A transzkripciós faktorok a vérsajtek differenciálódásának a szabályozásában vesznek részt. Az őssejtek differenciálódását a Serpent (Srp) irányítja. Ezekből az sejtekből az embrióban két differenciálódási vonal származik. A Lozenge, egy Runx protein homológ a kristálysejtek, míg a Gcm1 és a Gcm2 (Glial cell missing) a plazmatociták differenciálódását szabályozzák. Ezzel szemben az U-shaped („friend of GATA” faktor) a kristálysejtek differenciálódását gátolja. A Srp, a Lz és a U-shaped különböző kombinációkban egymással kölcsönhatva hajtják végre a vérsajt-differenciálódási programot.

A lamellociták differenciálódásának a szabályozása még kevésbé ismert, bár egyes eredmények arra utalnak, hogy a Toll aktivációs út egyes elemei is részt vesznek benne.

#### *A Drosophila vérsajt-differenciálódási anti-génrendszerének (CD-k) alapjai*

Az embrió-lárva-báb-kifejlett rovar átmenet során a *Drosophila* szerkezete alapvető változásokon megy keresztül. A különböző fejlődési stádiumokban különböző vérsajt-populációk differenciálódnak, és ennek megfelelően az egyes fejlődési stádiumokban más-más sejt-populáció az uralkodó típus. A differenciálódás szabályozásának vizsgálá-

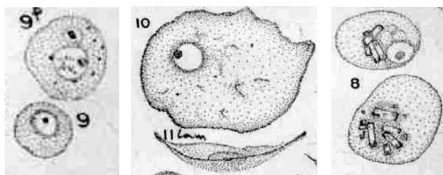
CD	Sejttípus	M.S. <sup>+</sup>	Klón
H1	minden véresejt és embrionális makrofág	135-160	H11
H2	minden keringő véresejt	30-60	1.2
H3	minden keringő véresejt	16	4A12
P1a	plazmatocita	100-110	N1
P1b	plazmatocita	100-110	N47
P3	plazmatocita alpopuláció	*	8B1
L1a	lamellocita	16	H10
L1b	lamellocita	16	7A6
L1c	lamellocita	16	29D4
L2	lamellocita	44	31A4
L4	lamellocita alpopuláció	82-86	1F12
L5	lamellocita alpopuláció	85-100,240	4B8
L6	lamellocita alpopuláció	96	H3
C1	kristálysejtek és előalakjai	84	12F6
C2	kristálysejtek és előalakjai	*	21D3
C3	kristálysejtek és előalakjai	*	10D2
C4	érett kristálysejtek	100	9C8
C5	érett kristálysejtek	66,135	1.19
Ad1	felőtt véresejtjei	10	7C8

<sup>+</sup> kDa, nem redukált körülmények között  
<sup>\*</sup> térszerkezetfüggő epitóp

1. táblázat • *Drosophila* véresejt-antigének (CD-k)

tábla alapvető fontosságú a megfelelő, egyes alpopulációkra, differenciálódási vonalakra jellemző molekuláris markerek használata (1. táblázat).

Bár az egyes, terminálisan differenciálódott sejtpopulációk morfológiai sajátosságai alapján elkülöníthetők egymástól (1. ábra), a közvetlen előalakok és az őssejtek morfológiai bélyegek alapján nem ismerhetők fel, így nem jellemezhetők.



plazmatociták      lamellociták      kristálysejtek

1. ábra • A morfológiai jegyek alapján felismerhető véresejt-típusok *Drosophilában*

Az immunológiai markerek – melyek nemcsak egyes véresejt-alpopulációkat, differenciálódási vonalakat jellemeznek, hanem az egyes populációk szeparálására is lehetőséget adnak – használata már eddig is komoly sikereket hozott a gerincesek immunrendszerének megismerésében. Miután expressziójuk egy-egy adott sejt-típusra jellemző, gyakran jelátviteli utak részeként is azonosíthatók. Megismerésük a veleszületett immunitás általános folyamatainak a megértését is segíti. Laboratóriumunkban a *Drosophila* véresejtjeit jellemző immunológiai markereket azonosítunk és használunk a véresejt-differenciálódás és a veleszületett immunitás folyamatainak a megértéséhez.

A markereket a laboratóriumunkban kifejlesztett monoklonális ellenanyagok segítségével azonosítottuk. A markerek cluster-analízise eredményeként azonosítottuk

az egyes véresejt alpopulációkra jellemző molekulákat, és kialakítottuk a *Drosophila* CD-ket, melyek, az egér- és az emberi CD-hez hasonlóan, alkalmasak a hemociták azonosítására és funkcionális jellemzésére. Az azonosított clustereket az 1. táblázatban foglaltuk össze. A lárvában bármely sejtípus a rá jellemző antigének mintázatával jellemezhető. A falósejtek és az antimikrobiális peptideket termelő sejtek a H, P antigének expressziójával és az L, C antigének hiányával, a tokképzésben részt vevő sejtek a H és az L antigének expressziójával és a P, C antigének hiányával, a kristályokat tartalmazó, a melanizációban részt vevő sejtek a H és a C antigének expressziója alapján és a P, L antigének hiányával, a véresejt előalakok a H antigének expressziójával és a P, L, C antigének hiányával jellemezhetőek (2. táblázat).

A véresejtek antigénmintázata az egyedfejlődés során változik, azaz úgy tűnik, hogy az egyedfejlődés során a véresejtek sajátos érési folyamaton mennek keresztül (1. ábra). Az embrionális makrofágokon egyik véresejt antigén sem található meg, de valamennyin jelen van a Crq antigén. A lárvá véresejtjein a H antigének, valamint egymást kizáró módon a P, az L és a C antigének vannak jelen. A kifejlett egyedek véresejtjeinek túlnyomó többségén a P antigének, egy alpopuláción a C antigének vannak jelen, továbbá valamennyi véresejten megnyilvánul egy, kizárólag a kifejlett rovar véresejtjeire jellemző antigén, az Ad1, ugyanakkor a lárvális véresejtekre jellemző H2 antigén hiányzik. Ezek az

eredmények és transzplantációs kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a *Drosophila* fejlődése során a véresejtek az egyedfejlődés során megmaradnak, és túlélnek a lárvabáb-kifejlett rovar átmenet során zajló nagyfokú szövetszétésést, azonban nem egyszerű túlélők. Az antigénmintázatban megnyilvánuló jellegzetes változások arra utalnak, hogy a sejtek a fejlődés során génexpresszió szintű változásokon mennek keresztül, ami az egyed fejlődésével összefüggő genetikai finomszabályozás alatt áll.

A véresejtek differenciálódását és funkcióit a lárvában vizsgáltuk a legrészletesebben (2. és 4. táblázat). Megállapítottuk, hogy a plazmatociták, a lamellociták és a kristálysejtek egymástól különböző differenciálódási vonalat képeznek. Az osztódó sejtek a  $H^+P^+L^+C^-$ , a  $H^+P^+L^+C^-$ , a  $H^+P^+L^+C^-$  és a  $H^+P^+L^+C^+$  populációban találhatók. A mikroorganizmusokat a  $H^+P^+L^+C^-$  sejtek kebelezik be. A paraziták és egyéb, eddig nem definiált ingerek a lamellocitákon és előalakjaikon az L antigének expresszióját indukálják. Az L1 és az L2 antigén először kis, plazmatocitaszerű sejteken jelenik meg, majd ezek az  $L1^+, 2^+$  sejtek nagy, lemezszerű lamellocitává differenciálódnak. Az L1,2 antigének megjelenését követő terminális differenciálódás során a sejtek nem osztódnak. A terminális differenciálódás komplex folyamata, azaz a kis kerek sejtekből a testidegen részecskéket beborítani képes nagy, lemezes sejtékké történő átalakulás az antigénmintázat változásaival is jellemezhető. A kis kerek sejteken megjelenik

Cluster	Őssejtek	Fagocitáló sejtek	Lamellociták	Kristálysejtek
H2	+/-	+	+	+
P1	-	+	-	-
L1-L6	-	-	+	-
C1	-	-	-	+

2. táblázat • A *Drosophila* véresejtjeinek fenotípusa

CD	Központi nyirokszerv	Szesszilis szövet	Keringő vérsejtek
H2	+	+/-	+
P1	- <sup>1</sup>	+/-	+ <sup>2</sup>
L1-L6	- <sup>1</sup>	-	- <sup>3</sup>
C1	-	-	+

<sup>1</sup>Indukciót követően jelenik meg

<sup>2</sup>Első lárvastádiumban jelenik meg és a 3. stádiumig heterogenitást mutat.

<sup>3</sup>Késői harmadik stádiumban és immunindukciót követően jelenik meg.

### 3. táblázat • A *Drosophila* lárva vérsejt-kompartmentjeinek immunológiai fenotípusa

az L4 antigén, majd a terminálisan differenciálódott sejteken az L6 antigén. A folyamat a sejtvezérlés átrendeződésével jár, melyben szerepet játszik a filamin (egy aktinkötő fehérje), hemocitákban az L5 antigénként definiált új, magas izoformájú változata. A lamellociták differenciálódása során az antigének szekvenciálisan jelennek meg. Regulációjuk tanulmányozására lehetőséget ad a sejtek szeparálása és ezzel komplex, genomikai és proteom szintű vizsgálata.

A lárvaiban a vérsejtek három fő kompartmentben találhatóak: a keringésben, a központi nyirokszervben és a testüreg falát bélelő szesszilis szövetben (3. táblázat).

A kompartmentek markeranalízise érdekes eredményt hozott. A keringő sejtek túlnyomó többsége az érett plazmatocitákra, kisebbik hányada pedig a kristálysejtekre jellemző markereket hordozza. A központi nyirokszerv és a szesszilis szövet éretlen fenotípusú sejteket tartalmaz. Immunstimulációt

követően ez a kép jellegzetesen megváltozik. A központi nyirokszervben, melyben – az irodalomban ismertetett feltételezések szerint – a differenciálódás és a vérsejtek fejlődése zajlik, semmilyen változást nem észleltünk, azonban a szesszilis szövet sejtjei osztódásnak indulnak, és rajtuk a P és az L differenciálódási markerek jelennek meg. Ugyanez történik a keringésben lévő sejtekkel. Mindez azt mutatja, hogy a vérsejtek differenciálódásának fő helye a szesszilis szövet és a keringés, nem pedig a központi nyirokszerv.

A markereink kifejeződését az embrióban sikeresen használt transzkripciós faktorok megjelenésével korreláltatva, megerősítve láttuk azt, hogy az eddig azonosított transzkripciós faktorok feltehetően részt vesznek a vérsejt-differenciálódás szabályozásában. A lárva vérsejtjeiben a szabályozás a faktorok egymással történő komplex kölcsönhatása révén valósul meg, ami lényegesen különbözik a faktoroknak az embrionális makro-

H2 <sup>+</sup> L1 <sup>-</sup> P1 <sup>-</sup> C1 <sup>-</sup> (Össejtek)	Fagocitózis, sejtosztódás
H2 <sup>+</sup> L1 <sup>+</sup> P1 <sup>+</sup> C1 <sup>-</sup> (Fagocitáló sejtek vetlen előalakjaik)	Fagocitózis, cecropintermelés és sejtosztódás
H2 <sup>+</sup> L1 <sup>+</sup> P1 <sup>+</sup> C1 <sup>-</sup> (Lamellociták és közvetlen előalakjaik)	Tokképzés, cecropintermelés és fagocitózis hiánya, sejtosztódás hiánya
H2 <sup>+</sup> L1 <sup>+</sup> P1 <sup>+</sup> C1 <sup>+</sup> (Kristálysejtek)	Melanizáció, koaguláció

### 4. táblázat • A vérsejt-alpopulációk funkciói

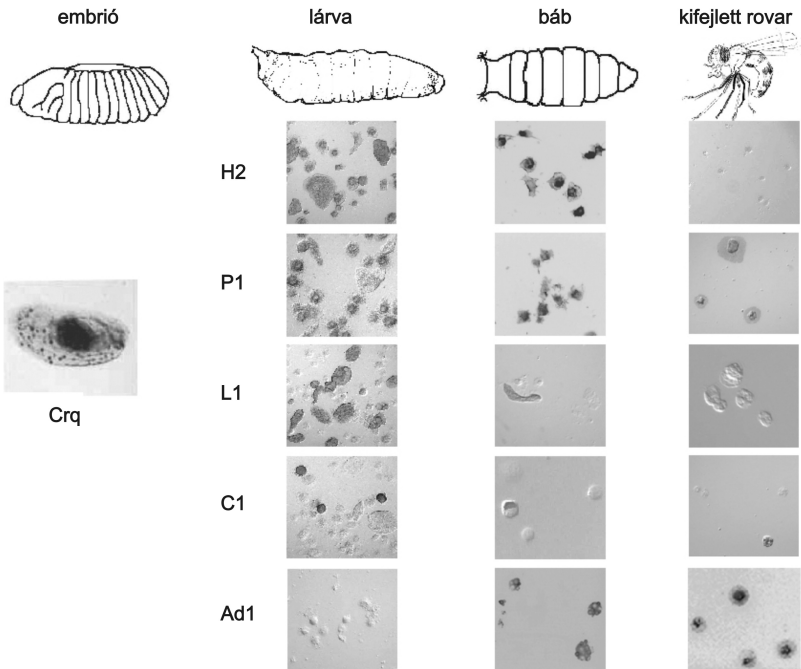


fágokban betöltött kizárólagos szabályozó szerepétől.

Mivel az antigének kizárólag véresejten vagy alpopulációkon található, megismerésük segíthet a veleszületett immunitás működésének a megértésében. Az antigének biokémiai jellemzése és a gének molekuláris szintű jellemzése már eddig is sok érdekes információval szolgált. A H2 antigén (Hemese) a lamellociták differenciálódását szabályozó transzmembrán fehérje, mely a glikoforinok családjának egy új tagja. Anti-adhéziós molekula, mely a sejtek érése során feltehetően a szesszilis szövetből történő távozásukat biztosítja. A P1 antigén egy EGF (epidermális növekedési faktor) receptor doméneket hordozó transzmembrán fehérje, melynek közvetlen környezetében tűz, vele nagyfokú szerkezeti homológiát mutató gént – terminológiánk szerint a P1-géncsaládot – azonosítottunk. Meglepő lenne, ha ez a

géncsalád nem játszana alapvető szerepet a vérsajt-differenciálódás szabályozásában. Az L1 antigénnel kapcsolatos adataink arra utalnak, hogy ez egy GPI-kapcsolt (glikofoszfatidilinozitol) membránfehérje, melynek több szerkezeti homológja található az élővilágban, köztük gerincesekben. Legközelebbi eddig azonosított gerinces homológja a leukocitákban történő jelátviteli folyamatokat szabályozza. A fehérje biokémiai jellemzése azt mutatja, hogy membrán hajókban-lipidutajokban helyezkedik el, és nagyobb, jelátviteli komplexek létrehozásában játszik aktív szerepet.

A *Drosophila* CD antigének a gerincekben azonosított funkcionális homológok megismerésén túlmenően nemcsak az antigének *in vivo* vizsgálatát teszik lehetővé, hanem a vérsajt-differenciálódás komplex genomikai elemzését is. A gének regulátor régióinak izolálása és genetikai rendszerekben



2. ábra • A vérsajt fenotípusának változásai az egyedfejlődés során

történő felhasználása elősegíti a veleszületett immunitásban részt vevő jelátviteli utak térképezését. A regulátor régiók segítségével szövet- és sejttípus-specifikusan megnyilvánuló markermolekulák az immunválasz nyomon követését teszik lehetővé *in vivo*. Eddig a H2 antigén regulátor régióját izoláltuk, és segítségével funkcionyeréses genetikai *screen*-t végeztünk. Megállapítottuk, hogy a véresejtek proliferációja és terminális differenciálódása egymástól elválasztható genetikai szabályozás alatt állnak, azaz különböző jelátviteli utak szabályozzák. A screenben azonosított komponensek komplex genomikai jellemzése és az aktivációs utak térképezése folyamatban van.

Az L1-L6 antigének megjelenésével jellemzett lamellocita-differenciálódás, a H2-Ad1 váltás genomikai szintű vizsgálata, az L1 antigénnel asszociált fehérjék analízise és a regulátor régiók izolálását követően létrehozott genetikai meghajtóelemek alkalmazása minden bizonnyal további új ismeretekkel gyarapítja a véresejtek differenciálódásáról szerzett eddigi ismereteinket.

Fontos megjegyezni, hogy minden gerinces szervezet *rendelkezik* veleszületett immunitással, melynek elemei részt vesznek a szerzett immunitás (az ellenanyag-termelés és a T sejt-válasz) kialakulásában és az

effektor folyamatok irányának a megszában. Az elmúlt évszázadban a figyelem elsősorban a szerzett immunitás megismerésére összpontosult, és csak a századforduló környékén kezdődött el a veleszületett immunitás folyamatának a részletesebb vizsgálata. Az érdeklődés először a nagytestű ízeltlábúak (*Cecropia*, *Manduca*) felé fordult, de a *Drosophila* genetikai rendszerének megismerése, majd genomjának szekvenálása és a kódoló régiók meghatározása ezt a fajt helyezte a kísérletek középpontjába. A molekuláris genetika eszköztára a *Drosophila* genom megismerésével kombinálva egyedi lehetőségeket kínál; nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* körülmények között is lehetővé válik a veleszületett immunitás komplex genetikai, genomikai analízise.

Köszönetnyilvánítás: Az ismertetett, de még közöletlen eredmények az OTKA (T035074 és T035249) és a Szegedi Biológiai Központ által adományozott Center of Excellence, Contract Number: ICA 1-CT-2000-70026 támogatások segítségével születtek.

Kulcsszavak: *veleszületett immunitás, Drosophila, genetikai szabályozás, sejt felszíni antigén, receptor, differenciálódási marker, hemocita*

#### IRODALOM

- Evans, Cory J. – Hartenstein, Volker – Banerjee, Utpal (2003): Thicker Than Blood: Conserved Mechanisms in *Drosophila* and Vertebrate Hematopoiesis. *Developmental Cell*. 5, 5, 673-690
- Leclerc, Vincent – Reichhart, Jean-Mark (2004): The Immune Response of *Drosophila Melanogaster*. *Immunological Reviews*, 198, 1, 59-71
- Werner, Thomas – Borge-Renberg, K. – Melloroth, P. – Steiner, H. – Hultmark, D. (2003): Functional Diversity of the *Drosophila* PGRP-LC Gene Cluster in the Response to Lipopolysaccharide and Peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 29, 26319-26322
- Kimbrell, Deborah A. – Beutler, Bruce (2001): The Evolution and Genetics of Innate Immunity. *Nature Reviews, Genetics*. 2, 2, 256-267
- Hultmark, Dan (1994): Insect Immunology. *Ancient Relationships*. *Nature*. 367, 116-117
- Hedengren, Marika – Åsling, B. – Dushay, M. S. – Ando I. – Ekengren, S. – Wihlborg M. – Hultmark, D. (1999): *Relish*, a Central Factor in the Control of Humoral, but not Cellular Immunity in *Drosophila*. *Molecular Cell*. 4, 827-837
- Kurucz Éva – Zettervall, C.-J. – Sinka R. – Vilmos, P. – Pivarcsi A. – Ekengren, S. – Hegedüs Z. – Ando I. – Hultmark, D. (2003): Hemese, a Hemocyte-specific Transmembrane Protein, Affects the Cellular Immune Response in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100, 2622-2627
- Vilmos Péter – Nagy I. – Kurucz É. – Hultmark, D. – Gateff, E. – Ando I. (2004): A Rapid Rosetting Method for Separation of Hemocyte Sub-populations of *Drosophila Melanogaster*. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 555-563