

Giliszta immunsejtek aktivációjának és lisenin- expressziójának vizsgálata

PhD tézisek

Opper Balázs

**Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és
Biotechnológiai Intézet**

**Doktori Iskola vezetője: Dr. Lénárd László
egyetemi tanár**

**Programvezető: Dr. Németh Péter
egyetemi tanár**

**Témavezetők: Dr. Németh Péter
egyetemi tanár
Dr. Engelmann Péter
egyetemi adjunktus**

Pécs, 2014

1. BEVEZETÉS

1.1. A veleszületett és az adaptív immunitás kapcsolata az élővilágban

Az immunrendszer legfontosabb feladata az egyedi integritás fenntartása, a túlélés feltétele a kórokozók vagy a szervezet saját, de módosult struktúrái elleni folyamatos védekezés. A gerinctelen és a gerinces szervezetek immunrendszerének összehasonlító szemléletű vizsgálata napjainkban mind az alap kutatások fontos részét, mind az alkalmazott kutatás ígéretes területét képezik.

Az adaptív immunrendszerrel nem rendelkező, gerinctelen állatfajok számos mechanizmust alkalmaznak szervezetük védelmére, pl. leukocyta jellegű immunsejteket, amelyek képesek immunprotektív molekulák szintézisére és szekréciójára. Ezek az immunsejtek sem morfológiai, sem pedig funkcionális szempontból nem egységesek. A veleszületett immunitás sejtes és molekuláris komponenseinek összehangolt rendszere teszi lehetővé az antimikrobiális peptidok termelését, a koagulációt, enkapszulációt, cytotoxikus és a fagocita funkció megvalósítását.

Ezt a komplex immunrendszert számos, az evolúció során konzervált molekula és mechanizmus jellemzi az élővilágban, ezért a gerinctelen fajok immunrendszerének megértése fontos lépés a gerincesek immunitásának megismeréséhez is. Az emlősök szervezetében is a védelem első vonalában szerepelnek a veleszületett immunitás gyorsan aktiválódó komponensei, biztosítva a szervezet védelmét az adaptív immunitás lassabb aktivációjáig.

1.2. A gilisztafajok immunrendszere: általános jellemzők, molekulák és sejttípusok

A gyűrűsféreg törzsébe (*Annelida*), a nyeregképzők osztályába (*Clitellata*) és a kevésértéjűek alosztályába (*Oligochaeta*) sok eltérő megjelenésű gilisztafaj tartozik. A kevésértéjű gyűrűsféregek összajúak, háromszakaszos bélcsatornával rendelkeznek. Érdekes, hogy zárt keringési rendszerrel rendelkeznek, ami egyedülálló a gerinctelen állatfajok között. A mezoderma tagolt, belőle számos szerv és szövet differenciálódik. A mezodermből alakul ki a valódi, másodlagos testüreg (ún. coeloma), mely hámmal bélelt.

Ezt az üreget tölti ki a coelomafolyadék, melyben szabad immunsejtek és humorális komponensek is találhatóak.

A giliszták immunrendszerének celluláris alkotóelemei a gerincesek fehérvérsejtjeihez hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, így képesek a fagocitózisra, sejt-sejt kölcsönhatásokra és a lítikus folyamatokban való részvételre.

A humorális és a sejtes elemek egymástól függetlenül vagy együttműködve is szolgálhatják a veleszületett immunitás folyamatait. A célsejt-immunsejt kapcsolatot igénylő folyamatoknál gyorsabb védelmet biztosítanak a coelomafolyadék lítikus hatású humorális faktorai, ezek termelése segíti az állatok túlélését a sokszor kedvezőtlen tulajdonságú, mikroorganizmusokat és szennyező anyagokat is tartalmazó talajban. Ez azonban csak egy aspektusa a giliszták immunvédekezésének, és alapját a szolubilis faktorokat termelő és szekretáló immunsejtek csoportjai képezik.

A giliszták immunsejtjeit - a testüregükben előforduló ún. coelomasejteket- lítikus és fagocita folyamatok mediátorainak tartják. A kis coelomasejteket a cytotoxikus folyamatokért, a nagy coelomasejteket pedig a fagocitózisért tartották felelősnek. A sejtcsoportok további elkülönítéséhez elektronmikroszkópiát és áramlási citometriát használtak. Más csoportosítás szerint granulált és hyalin coelomasejteket, továbbá szabad chloragocytá sejtcsoportot írtak le. A chloragocyták autofluoreszcens sejtek, amiért a chloragoszómákban található riboflavin felelős. A giliszták chloragocytá alcsoportját hozzák kapcsolatba bizonyos lítikus és agglutinációs hatással rendelkező molekulák (hemolizinek) termelésével, melyek közé olyan citolítikus faktorok tartoznak, mint a fetidinek, lyseninek és az eiseniapore.

Egyes tudományos közlemények szerint a coelomafolyadékban előforduló szabad chloragocyták (az úgynevezett eleocyták) végállapotú sejtek, melyek a középbelet körbevevő chloragogén szövetből származnak. Ez a sejtípus helyhez kötötten kezdi fejlődését, majd szabad sejtalakká válik.

A giliszta immunsejtípusok pontosabb funkcionális elkülönítése, és giliszta coelomasejt CD markerek meghatározása (EFCC markerek) érdekében monoklonális ellenanyagokat termeltettek a coelomasejtek ellen. A létrehozott ellenanyagok felhasználásával három coelomasejt alpopuláció különíthető el *E. fetida* gilisztában, melyek

közül kettő effektor sejttypusként vesz részt az immunológiai folyamatokban (fagocitózis és enkapszuláció).

1.3. A kalciumion jelentősége a gerinctelenek és a gerincesek immunválaszában

Az élővilágban a kalciumszint változása plazmamembránhoz vagy sejtorganellumokhoz kapcsolt kalciumtranszporterek és ioncsatornák, valamint kalciumkötő fehérjék által valósul meg. A kalciumcsatornákat potenciálváltozás vagy ligandok kötése aktiválhatja. A Ca^{2+} -pumpák (Ca^{2+} -ATPázok) előfordulhatnak a sejtek plazmamembránjában (PMCA), vagy az endoplazmatikus, ill. szarkoplazmatikus retikulumhoz kötve (SERCA).

A gerincesek veleszületett és adaptív immunrendszerében a sejtek aktivációja kalciumhoz köthető jelátviteli utakon keresztül valósul meg. Az intracelluláris kalciumszint emelkedése számos immunológiai folyamathoz vezethet, például kemotaxisához, degranulációhoz, fagocitózishoz, citokinek felszabadulásához vagy proliferációhoz.

1.4. Humorális faktorok szerepe a giliszták immunválaszában

A coelomasejtek a celluláris immunválasz mellett a humorális folyamatokban is részt vesznek hemolítikus és antimikrobiális faktorok termelése révén. A coelomafolyadék fontos alkotóeleme a giliszták veleszületett immunválaszában, egyes szerzők szerint antigénkötő fehérjéket is tartalmazhat.

A fetidin/lysenin fehérjecsald a coelomafolyadék egyik központi összetevője. Az *E. fetidában* leírt fetidinek polimorf lipoproteinek, melyek antibakteriális és hemolítikus tulajdonságokkal rendelkeznek, valamint a testfolyadék alvadási folyamatában (koaguláció) is részt vesznek.

Az *E. fetida* fajból izolált lysenin a fetidinekhez hasonló tulajdonságokkal rendelkezik. A lyseninnek és rokon vegyületeinek szerepe lehet a fizikai sérülést követően a giliszták coelomaüregébe kerülő kórokozók elleni védelemben.

2. CÉLKÍTŰZÉSEK

Részleteiben nem ismert, hogy a mitogének vagy ionofórok befolyásolják-e a giliszta immunsejtek kalciumszintjét illetve a coelomasejtek képesek-e osztódásra vagy végállapotú, differenciálódott sejtek.

A gilisztafajok (*Eisenia fetida* és *Allolobophora caliginosa*) immunsejtjein végzett funkcionális kísérleteinket az alábbi célokkal kezdtük meg:

1. A giliszta coelomasejt alcsoportok nyugalmi intracelluláris kalciumszintjének meghatározása.
2. Ionofórok (ionomycin), valamint mitogének (növényi lektinek és lipopoliszacharid) kalciumion-mobilizáló hatásának vizsgálata.
3. Többféle mitogénstimulust és nyugalmi (regenerációs) periódust alkalmazva a giliszták coelomaüregében *in vivo* osztódási fázisban lévő immunsejtek arányának tanulmányozása.

A fetidin/lysenin fehérjecsalád tagjai feltehetőleg fontos szerepet töltenek be a giliszták immunválaszában. A lysenin termelődési helye és immunválaszban betöltött szerepe még nem tisztázott. További kísérleteinkben anti-lysenin monoklonális ellenanyagot használva céljaink között szerepelt:

4. A lysenin sejtes és szöveti lokalizációjának térképezése.
5. A szabad coelomasejtek baktérium expozíciót követő lysenin expressziós változásainak nyomon követése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Coelomasejtek izolálása

Kísérleteinkhez *E. fetida* és *A. caliginosa* gilisztafajokat használtunk. A kísérletek megkezdése előtt a gilisztákat 2 napig nedves törlőkendőn tartottuk, béltartalomuk ezalatt kiürült. Az állatokat izoláló puffert tartalmazó Petri-csészébe helyeztük. Az állatok coelomasejteket tartalmazó coelomafolyadékot bocsátottak ki a testüregükből, amit összegyűjtöttünk, majd kétszeres térfogatra hígítottunk *Lumbricus* balanced salt solution (LBSS) pufferrel. Az élő sejtek számát tripánkék festéssel határoztuk meg.

3.2. A sejtek feltöltése Ca^{2+} -szenzitív fluoreszcens indikátorral

Az izolált coelomasejteket Fluo-3 AM tartalmú DMEM tápoldatban vagy Ca^{2+} -mentes PBS-ben vettük fel 10^7 sejt/ml koncentrációban. A csöveket DMEM-mel, vagy Ca^{2+} -mentes PBS pufferrel töltöttük fel. A sejtszuszpenziók alap Ca^{2+} -szintjét áramlási citométerrel mértük, majd különböző kezeléseket (ionofór, eltérő koncentrációjú -LPS, PHA, ConA, és PWM- mitogén vagy fMLP kemoattraktáns stimulust) alkalmaztunk. A fluoreszcens jel intenzitását áramlási citometriával az FL-1 csatornában detektáltuk.

3.3. Coelomasejtek stimulálása, proliferációjuk vizsgálata

Ismételt sejtizolálások valamint mitogénstimulusok coelomasejt proliferációt befolyásoló hatását tanulmányoztuk. Az ismételt sejtizolálások hatásának vizsgálatakor az első coelomasejt izolálást még további három követte. Az izolálások között a gilisztákat talajba helyeztük regenerálódni. Az első és a második sejtizolálás között 1 nap, a második és harmadik izolálás között 3 nap, a végül a harmadik és negyedik izolálás között 7 nap regenerációs időt alkalmaztunk. Mitogén stimulus hatását tanulmányozva a coelomasejt izolálást követően az állatokat különböző koncentrációjú mitogénekkal -LPS, PHA, ConA, vagy PWM- kezeltük. Kontrollként LBSS-ben tartott gilisztákat használtunk. Másnap a

stimulus rövid távú hatásának ellenőrzésére a kísérleti csoportokból újra sejtizolálást végeztünk. Az izolálást követő mosási lépések és tripánkéék festékkizárás után RNáz-A-t és PI-t is tartalmazó PI jelölőpufferben reszuszpendáltuk a sejteket. Az inkubáció után áramlási citométerrel mértük a mintákat.

3.4. Ca²⁺-ATPáz enzim citokémia

Sejtizolálást követően a coelomasejteket tárgylemezre ülepítettük. A lemezeket ATP-t és kalcium-kloridot tartalmazó Na-barbitál pufferben inkubáltuk, majd kalcium-kloriddal, kobalt-kloriddal és ammónium-szulfiddal kezeltük. Az inkubációs idő letelte után Mayer-féle hematoxilinnal kontrasztosítottuk a sejteket. Az enzimreakció terméke fekete csapadékként jelent meg a pozitív jelet adó sejtekben.

3.5. Monoklonális anti-lysenin ellenanyag létrehozása

Desztillált vízzel 1 mg/ml koncentrációjú lysenin törzsoldatot készítettünk. Nőstény 8 hetes BALB/c egerekbe 10 µg lysenint oltottunk, amit két további, inkomplett Freund adjuvánssal végrehajtott intraperitoneális injekció követett három hetes intervallumokban. Végül az antitest titer és izotípus alapján kiválasztott egerek egy további injekciót is kaptak 3 nappal a tervezett splenocyt/myeloma sejtfüziót megelőzően. A hibridóma felülúszókat indirekt ELISA módszer segítségével teszteltük lysenin és coelomasejt-lizátum antigénekkkel, valamint BSA kontroll felhasználásával.

3.6. Giliszta coelomasejtek immuncitokémiai vizsgálata

A coelomasejteket ($5 \cdot 10^5$ sejt/ml LBSS pufferben) tárgylemezre ülepítettük. A mintákat jéghideg acetonnal fixáltuk, majd a sejtek endogén peroxidáz aktivitását fenil-hidrazin-hidrokloriddal blokkoltuk. A tárgylemezeket ezután BSA oldatban inkubáltuk, majd lysenin ellen termeltetett hibridóma felülúszókkal (a-EFCC5) vagy tisztított IgG frakciókkal jelöltük a coelomasejteket. A következő lépésben HRP-konjugált anti-egér IgG másodlagos ellenanyagot használtunk. Az immuncitokémiai reakciókat acetátpufferben felvett 3-amino-9-etil karbazollal tettük láthatóvá.

Kettős immunfluoreszcens jelölés során egérben termeltetett monoklonális a-EFCC5 IgG frakciókat alkalmaztunk, majd másodlagos ellenanyagként NL557 konjugált szamár anti-egér immunglobulint használtunk. Ezután FITC konjugált a-EFCC1, a-EFCC2, a-EFCC3 vagy a-EFCC4 monoklonális ellenanyagot alkalmaztunk.

Másik kísérleti elrendezésünkben egér monoklonális a-EFCC1-4 IgG frakciókat detektáltunk a mintákon, NL557 konjugált szamár anti-egér immunglobulinnal, majd a lyseninre specifikus, FITC konjugált monoklonális a-EFCC5 ellenanyagot használtuk.

3.7. Immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatok giliszta szöveteken

A gilisztákat boncoltuk, az így nyert szövetmintákat Zamboni-féle fixáló oldatba helyeztük majd szukrózba ágyaztuk. A mintákból zselatinnal bevont tárgylemezre metszeteket készítettünk kriosztáttal. A metszeteket immunhisztokémiai vagy immunfluoreszcens módszerekkel vizsgáltuk. Az egyes lépések között a mintákat 0,1% Triton-X 100 tartalmú PBS-ben mostuk.

3.8. *In vitro* baktérium kezelés vizsgálata

Izolált giliszta coelomasejteket 6 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk hővel inaktivált *Staphylococcus aureus* (OKI II2001) vagy *Escherichia coli* (ATCC 25922) baktériumokkal. A coelomasejteket (10^6) a baktériumokkal (10^7) 1 ml térfogatban kevertük össze Eppendorf csövekben. Az inkubációs idő letelte után a mintákat centrifugáltuk. A felülúszót $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további vizsgálatokig, az üledékből coelomasejt-lizátumot készítettünk.

3.9. Coelomasejt-lizátum készítése

A coelomasejteket proteáz inhibitor keverékkel kiegészített RIPA pufferben jégen lizáltuk. A coelomasejt-lizátumok és a felülúszók fehérjetartalmát BCA kit-tel határoztuk meg, immunreaktivitásukat ELISA és Western blot módszerekkel vizsgáltuk.

3.10. Indirekt ELISA-vizsgálat anti-EFCC5 ellenanyaggal

Mikrotiter lemezeket coelomasejt-lizátummal vagy tisztított lysenin fehérjével érzékenyítettük. A nem-specifikus kötőhelyeket zselatinnal blokkoltuk. A lemezeket a-EFCC5 felülúszóval inkubáltuk. A mosási lépések után a lemezre a HRP-konjugált kecske anti-egér IgG ellenanyag került. Az a-EFCC5 monoklonális ellenanyag izotípusát indirekt ELISA módszerrel határoztuk meg egér monoklonális ellenanyag izotípus meghatározó kittel a gyártó leírása alapján. A színreakciót ortofenilén-diaminnal hívtuk elő, majd kénsavval állítottuk le. Az egyes lépések között a lemezeket 0,05 % Tween 20 tartalmú PBS-sel mostuk. A színreakció erősségét 490 nanométeren detektáltuk.

3.11. Szendvics ELISA a-EFCC5 ellenanyaggal

Mikrotiter lemezeket poliklonális anti-lysenin ellenanyaggal érzékenyítettük. A nem-specifikus kötőhelyeket zselatinnal gátoltuk. A standard görbe készítéséhez különböző lysenin koncentrációkat alkalmaztunk, 2 µg/ml és 50 µg/ml közötti tartományban.

Kontroll vagy bakteriális stimulust kapott coelomasejtekből nyert felülúszókkal inkubáltuk a mikrotiter lemezeket. A mintákhoz a-EFCC5 ellenanyagot adtunk és a további lépésekben fentebb leírt ELISA protokolt követtük (ld. indirekt ELISA-vizsgálat anti-EFCC5 ellenanyaggal).

3.12. SDS-poliakrilamid gél elektroforézis és Western blot anti-lysenin ellenanyaggal

A fehérjék elválasztásához 10% poliakrilamid gélt használtunk. Az elválasztás után a proteineket nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránokat blokkoltuk 1% BSA/TBS-Tween alkalmazásával, ezután a géleket 60 percig inkubáltuk monoklonális a-EFCC5 ellenanyaggal, vagy nyúlból származó poliklonális anti-lysenin ellenanyaggal. A következő lépésben HRP-konjugált anti-egér vagy anti-nyúl IgG ellenanyagot alkalmaztunk szobahőmérsékleten. A mosási lépésekhez TBS/ 0,05% Tween puffert alkalmaztunk, a reakciók előhívása pedig ECL reagenssel történt.

3.13. Áramlási citometria FITC konjugált a-EFCC5 ellenanyaggal

Az izolált coelomasejteket PBS pufferben mostuk, majd 4% paraformaldehiddel fixáltuk. A mosási lépések során 0,1 % nátrium-azidot tartalmazó PBS-t, majd permeabilizáló puffert (0,1% nátrium-azidot és 0,1% szaponint tartalmazó PBS) használtunk. Permeabilizáló pufferben felvett FITC konjugált a-EFCC5 ellenanyagot adtunk a mintákhoz, amit 30 perc inkubáció követett 4 °C-on. A mintákat kétszer mostuk szaponintartalmú permeabilizáló pufferben, majd egyszer BSA-t és nátrium-azidot tartalmazó PBS pufferben. Végül a mintákat 0,5% paraformaldehiddel kiegészített PBS pufferben fixáltuk. FACSCalibur áramlási citométerrel mértük a minták fluoreszcencia intenzitását az FL1 csatornában.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az *E. fetida* és *A. caliginosa* fajokból származó coelomasejt alcsoportok nyugalmi kalciumszintje

Az intracelluláris kalciumszintet egy áramlási citometrián alapuló módszerrel határoztuk meg. A Fluo3-AM fluoreszcens festék jelintenzitása korrelál a sejtek szabad kalciumszintjével. Szignifikáns eltérést figyeltünk meg a coelomasejt-alcsoportok nyugalmi Ca^{2+} -szintje között, az *E. fetida* chloragocyta populációja magasabb kalciumszinttel rendelkezik, mint a granulált és hyalin coelomasejtek populációi. Megfigyeléseink szerint az *A. caliginosa* faj coelomasejt és chloragocyta alcsoportjai hasonló Ca^{2+} -szinttel rendelkeznek, mint az *E. fetida* faj megfelelő populációi.

4.2. Ionofór kezelés hatása coelomasejt alcsoportok kalciumszintjére

Coelomasejt izolálást követően a sejteket kalciumtartalmú DMEM médiumban töltöttük fel Fluo3-AM-mel. Az alap kalciumszint mérése után 7 μ M ionomycint adtunk a csövekhez. Az *E. fetida* sejtcsoportok közül a coelomocyta populáció nagymértékű, három-négyszeres Ca^{2+} -szint emelkedést mutatott már néhány másodperccel az ionomycin

hozzáadása után. Az előző sejtcsoporttal ellentétben a chloragocyta/eleocyta populáció nem reagált az ionomycin kezelésre Ca^{2+} -szint emelkedésével.

Vizsgáltuk, hogy kimutatható-e különbség a két gilisztafaj coelomocyta populációjának kalciumjelében. Az ionomycin *A. caliginosa* coelomasejtekben is szignifikáns mértékű Ca^{2+} -szint emelkedést váltott ki ($p < 0,05$), de ez a változás kisebb mértékű volt, mint az azonos körülmények között kezelt *E. fetida* coelomasejtek esetében. Hasonlóan az *E. fetida* chloragocyta/eleocyta sejtekhez, az *A. caliginosa* –ból származó chloragocita/eleocita alcsoport sem mutatott Ca^{2+} -jel változást az ionomycin kezelés során.

Ionomycin hatására a sejtmembrán és/vagy intracelluláris raktárak kalciumcsatornái is kinyílnak, ami a citoplazma Ca^{2+} -szintjének megemelkedéséhez vezet. Kísérleteinkben a kalcium forrása ismeretlen volt, ezért a coelomasejteket Ca^{2+} -mentes PBS-ben töltöttük fel Fluo3-AM-mel, majd áramlási citometriával vizsgáltuk az ionomycin hatását.

Az *E. fetida* coelomasejtek Ca^{2+} -szintje magasabb lett a kezelést követően, de a változás elmaradt a Ca^{2+} -tartalmú DMEM médiumban tartott sejteknél mért értéktől. A nyugalmi szinthez képest azonban szignifikánsan nőtt a citoplazma szabad kalciumion szintje ($p < 0,001$), ami arra utal, hogy az ionomycin intracelluláris kalciumraktárak kiürülését is okozza. Az *A. caliginosa* gilisztafajokat vizsgálva kalciummentes PBS pufferben végzett feltöltés után nem figyelhető meg Ca^{2+} -influx.

4.3. A PMA kezelés nem indukált kalcium mobilizációt a coelomasejt alcsoportokban

A forbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA) egy speciális protein kináz C aktiváló hatással rendelkező forbol észter. A vizsgálatban felhasznált gilisztafajok egyik sejt típusa sem reagált a PMA kezelésre a nyugalmi kalciumszint megváltozásával. Azonban, egy percig tartó ionomycin kezelést követően adott 1 nM vagy 10 nM PMA azonnal bekövetkező kalciumszignál csökkenéshez vezetett. A megfigyelt változás nem különbözött szignifikánsan a kizárólag ionomycinnel stimulált minták kalciumszintjének változásától, de a jel csökkenésének mértéke függött az alkalmazott PMA mennyiségétől és tranziens folyamatot tapasztaltunk. Az ionomycinnel és PMA-val is kezelt coelomasejtek kalciumjele 200 másodperc elteltével nem különbözött a kizárólag ionomycinnel kezelt mintákétól.

4.4. Giliszta coelomasejtek thapsigargin-szenzitív kalciumpumpái

További kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a coelomasejtek intracelluláris Ca^{2+} -raktárainak feltöltésében milyen szerepe lehet az endoplazmás retikulum membránjában található Ca^{2+} -ATPázoknak (SERCA-pumpáknak). A kísérletsorozathoz thapsigargin (TG) használtunk, mely az endoplazmás retikulum SERCA pumpáinak specifikus gátlószere.

A thapsigargin hatására a feltételezett SERCA-pumpák aktivitása csökken, így megfigyelhető a coelomasejtek citoplazmatikus szabad Ca^{2+} -szint emelkedése. A $2 \mu\text{M}$ thapsigarginnal inkubált *E. fetida* coelomasejtek esetében a Ca^{2+} -szint kezdetben gyengébb ($p < 0,05$), majd kifejezettebb, szignifikáns ($p < 0,001$) emelkedését detektáltuk.

Egy másik kísérletsorozatban a coelomasejteket 30 percig $2 \mu\text{M}$ thapsigarginnal előinkubáltuk, majd ionomycinnel kezeltük, a létrejött Ca^{2+} -influx szignifikánsan kisebb mértékűnek ($p < 0,01$) bizonyult, mint a kizárólag ionomycinnel kezelt minták esetében tapasztalt Ca^{2+} -jel.

Az *A. caliginosa* coelomasejtek esetében is megfigyeltük a thapsigargin Ca^{2+} -mobilizáló hatását. Thapsigargin adásával ($2 \mu\text{M}$) elnyúlt hatás ismerhető fel a mérés során. Az alapjelhez képest szignifikáns kalciumjel emelkedés figyelhető meg ($p < 0,001$), ám ez az emelkedés elmarad az *E. fetida* coelomasejtek esetében tapasztalttól.

Az intracelluláris Ca^{2+} -pumpák funkcionális vizsgálatai mellett mindkét gilisztafajnál enzimidokémiai reakciót is végeztünk az intracelluláris Ca^{2+} -ATPázok lokalizálása és jellemzése céljából. A coelomasejtek jellegzetes festődési mintázatot mutattak. A legfeltűnőbb reakció a sejtmag közelében volt látható, bár néhány esetben a sejt teljes citoplazmája erős reaktivitást mutatott. Általában a kisméretű, aránylag nagy sejtmaggal és kisebb citoplazmával rendelkező sejtek festődtek, míg a chloragocyták/eleocyták valamint a nagy méretű coelomasejtek nem mutattak reakciót.

4.5. Fitohemagglutinin Ca^{2+} -mobilizáló hatása *E. fetida* coelomasejtekben

Vizsgálataink során gerincesek leukocytáin végzett tanulmányokban használt mitogének (LPS, PHA, ConA, illetve PWM) giliszta coelomasejtek kalciumszintjére gyakorolt hatásának elemzésével is foglalkoztunk. A kísérletekben felhasznált vegyszerek

közül egyedül a fitohemagglutinin (PHA) befolyásolta az *E. fetida* coelomasejtjeit. A vizsgált különböző PHA koncentrációk közül a 30 µg/ml, valamint a 60 µg/ml koncentráció alkalmazásakor tapasztaltuk a legintenzívebb intracelluláris Ca^{2+} -szintemelkedést ($p < 0,05$), bár ez a hatás nem volt koncentrációfüggő. Az *E. fetida* chloragocytá sejtjei nem reagáltak ezekre a stimulusokra, *A. caliginosa* esetében pedig egyik alkalmazott PHA koncentráció sem okozott a tanulmányozott sejtcsoportokban jelentős kalciumszint változást.

4.6. Bakteriális formil peptid intracelluláris kalciumszint emelkedést okoz a coelomasejtjeiben

A baktériumból származó, rövid fMLP peptid az intracelluláris kalcium mobilizálása révén aktiválja a gerinces fagocitasejtjeit. Kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy az fMLP képes-e bármilyen hatást kifejteni giliszta immunsejtjei Ca^{2+} -szintjére. A kísérlet nem mutatott erős intracelluláris kalciumszint változást, míg a kinetikus diagram kivehető intracelluláris Ca^{2+} -szintemelkedést mutat fMLP adását követően. Számos független kísérlet eredménye is alátámasztotta, hogy 5 µM fMLP hozzáadása a mintákhoz a nyugalmi kalciumszint szignifikáns, bár tranziens növekedéséhez vezetett a vizsgálat időtartama alatt ($p < 0,05$). Kalciummentes PBS-ben felvett sejtekkel elvégezve ugyanezt a mérést szintén szignifikáns Ca^{2+} -szintemelkedés történt, de ennek mértéke nem különbözött a jelentősen a DMEM médiumban mért eredményektől. *A. caliginosa* coelomasejtjei esetében nem tapasztaltunk változást

4.7. Coelomasejtjei sejtciklusának vizsgálata különböző stimulációt követően

Frissen izolált coelomasejtjei proliferációs aktivitását vizsgáltuk PI festést követően áramlási citometriával. Ugyanazokból az *E. fetida* egyedekből végzett ismételt sejtzölésű és regenerációs időszakokat követően megfigyelhető volt a G0-G1 fázisban és az M-fázisban lévő coelomasejtjei növekvő mennyisége. A legtöbb mitotikus aktivitással rendelkező sejt a második és a harmadik sejtzölésűt követően fordult elő a vizsgált

mintákban. Az utolsó, negyedik coelomasejtizolálásból származó mintákban az M-fázisban lévő coelomasejtek már kisebb számban fordultak elő.

Sejtizolálást, majd mitogénekkal végzett ismételt stimulusokat követően is megfigyeltük a coelomasejtek proliferációs aktivitásának fokozódását. A kezeléseknél során 12 µg/ml LPS-t, 25 µg/ml PHA-t, 25 µg/ml ConA vagy 25 µg/ml PWM stimulust alkalmaztunk. A stimulusok közül a PWM és a ConA lektinek hatására, valamint kis mértékben az LPS kezelést követően is megfigyelhető volt a mitotikus fázisban lévő coelomasejtek arányának emelkedése az LBSS-sel kezelt kontroll mintákhoz képest.

4.8. Izolált coelomasejtek lysenin expressziója

Korábbi tanulmányok már beszámoltak giliszta coelomasejtek által termelt anyagok cytotoxikus hatásairól. Lysenin elleni monoklonális antitestet (a-EFCC5) hoztunk létre, amellyel az *Eisenia* coelomasejtek lysenin expresszióját vizsgáltuk.

Méréseink során a coelomaüreg szabad immunsejt-alcsoportjai közül hármat tudtunk azonosítani. Az EFCC5 pozitívítást, bár eltérő intenzitással, de mindhárom alcsoport esetén megfigyeltük. A legtöbb a-EFCC5 pozitív sejtet a szabad chloragocyta/eleocyta tartalmazó populációban detektáltuk.

A pozitív immunreakciót adó sejtek nagy mennyiségű, granulált citoplazmával és aránylag kis sejtmaggal rendelkeznek. A pozitív jelet főleg a granulumban gazdag citoplazma mutatta. Az EFCC5 pozitív sejtek morfológiája leginkább a szabad chloragocyta/eleocyta sejtcsoportot jellemzi. Egy másik, kis citoplazmával és nagy sejtmaggal rendelkező sejt típus nem adott specifikus jelet az a-EFCC5 immunfestés során. Ez az alcsoport valószínűleg megfeleltethető a hyalin sejtcsoportnak.

A korábban létrehozott coelomasejt-alpopulációk azonosítására használt monoklonális ellenanyagokat is felhasználva kettős immunfluoreszcenciát végeztünk. Az a-EFCC3 pozitív sejtek jellemzően adherenciára hajlamos, kisebb sejtcsoportokat hoznak létre, míg az a-EFCC5 pozitív sejtek inkább egyesével fordulnak elő.

4.9. Szabad chloragocya sejtek lysenin expressziója

Immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs vizsgálatok eredményei szerint a lysenint a typhlosolis chloragocya sejtjei termelik. Immunhisztokémiai és immuncitokémiai kísérleteink alapján az a-EFCC5 pozitív (lysenint expresszáló) sejteket a coelomaüreg szabad coelomasejtjei között találtunk. Az EFCC5 immunpozitív sejtek a coelomaüregben kisebb csoportokban illetve izomhoz, vagy idegdúchoz kötött magányos sejtekként is láthatóak voltak.

4.10. Gram-pozitív baktériumok lysenin termelést befolyásoló hatása

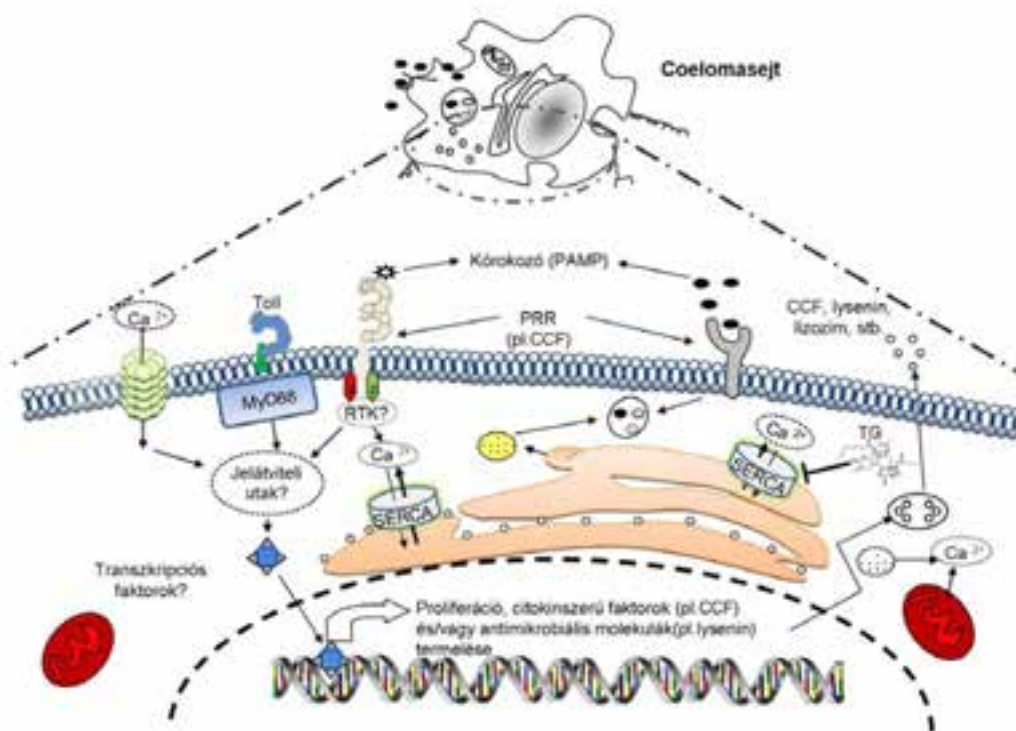
A lysenin expressziót befolyásoló bakteriális hatás vizsgálata érdekében szükséges volt tisztázni, hogy az a-EFCC5 jelű monoklonális ellenanyag valóban a lysenint ismeri-e fel. A Western blot vizsgálatok azt mutatták, hogy az ellenanyag a coelomasejt lizátumból csak egy proteincsíkot jelöl, aminek molekulamérete megegyezett a tisztított lysenin fehérjével. A kontrollként alkalmazott poliklonális anti-lysenin ellenanyag is ilyen molekulasúlyú csíkot adott. A negatív kontrollként alkalmazott Jurkat lizátumnál nem kaptunk egyik ellenanyag esetében sem reakciót. A coelomasejteket *in vitro* körülmények között hővel inaktivált *E. coli* és *S. aureus* törzsekkel inkubáltuk 6 órán át. A coelomasejtek intracelluláris lysenin expresszióját Western blottal, a stimulált sejtek által a felülúszóba kibocsátott lysenin proteint szendvics-ELISA módszerrel mértük.

A *S. aureus* törzssel inkubált coelomasejtek lysenin expressziója szignifikánsan megnőtt az *E. coli* törzssel kezeltékhez képest ($p=0,0043$), valamint a kontroll mintákhoz képest is nem szignifikáns ($p=0,058$) növekedési tendenciát mutatott. Az *E. coli* baktériumokkal inkubált coelomasejtek lysenin expressziója jelentősen csökkent a kontrollhoz képest ($p=0,042$). A felülúszó (coelomasejtek által szekretált) lysenin-tartalma a fehérje intracelluláris expressziójával azonos mintázatot mutatott. A *S. aureus* törzssel kezelt minták esetében emelkedett lysenintartalmat figyeltünk meg a kontroll ($p=0,018$), valamint az *E. coli*-val inkubáltakhoz képest ($p=0,012$). Az *E. coli* törzssel végzett inkubáció nem okozott szignifikáns lyseninszint változást a kezeletlen kontrollhoz képest ($p=0,55$) a sejtek felülúszójában.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A coelomasejtek nyugalmi intracelluláris kalciumszintjei és a Ca^{2+} -influx indukciója ionomycinnel illetve gátlása PMA-val

A hatékony veleszületett immunrendszer a kórokozók jellemző membránkomponenseit (PAMP) felismerő mintázatfelismerő receptorok (PRR) működésén alapul. A receptorok jelátviteli útvonalakat aktiválnak, melyek végül gyulladási mediátorokat, antimikrobiális peptideket és a fagocitózis elemeit kódoló géneket szabályoznak (1. ábra). A gerincesek veleszületett és adaptív immunrendszerében a sejtek aktivációja kalciumhoz köthető jelátviteli utakon keresztül valósulhat meg. Az intracelluláris kalciumszint emelkedése számos immunológiai folyamathoz vezethet, például kemotaxisához, degranulációhoz, fagocitózishoz, citokinek felszabadulásához vagy proliferációhoz.



1. ábra: A mintázatfelismerő receptorok (PRR) által megkötött patogének különböző, feltételezett jelátviteli útvonalon keresztül aktiválják a coelomasejteket, mely fagocitózishoz, sejtszótódáshoz és antimikrobiális faktorok termeléséhez vezet (Sematikus ábra az *Inv Surv J*, 2011, 8: 78-84 alapján).

A gerinctelen fajok is hasonló evolúciósan konzervált biokémiai, jelátviteli mechanizmusokkal rendelkeznek.

Munkánkban elsőként figyeltük meg egy áramlási citometrián alapuló módszerrel a giliszta coelomasejt alcsoportok eltérő kalciumjelét, valamint ennek változásait különböző mediátorok (ionofór, kalciumpumpa gátlók, lektinek és kemoattraktáns) adagolása után.

Első lépésként meghatároztuk a két gilisztafaj coelomasejt-alpopulációinak intracelluláris nyugalmi kalciumszintjét. A chloragocyta/eleocyta alcsoport mindkét gilisztafaj esetében magasabb kalciumjellel rendelkezett, mint a granulált vagy hyalin coelomasejtek.

A vizsgált sejtípusok nyugalmi kalciumszintjének meghatározása után munkánkat az intracelluláris kalciumszintet moduláló reagensek hatásának tesztelésével folytattuk. Az ionomycin kezelés után az intracelluláris szabad kalciumszint háromszoros emelkedését figyeltük meg a coelomasejtekben, ami azonban nem jelentkezett a chloragocyta/eleocyta sejtek esetében. Az *E. fetida* fajhoz képest az *A. caliginosa* coelomasejtek kisebb mértékű, de nyugalmi szintjükhez képest szignifikáns kalciumjel emelkedést mutattak ionomycinnel stimulálva. Érdekes módon a chloragocyta/eleocyta populáció nem reagált az ionomycin kezelésre. A chloragocyta/eleocyta sejtcsoport differenciálódásuk/érésük folyamán elveszítheti a kalciummobilizáló képességét. Az ionomycin hatásának hiánya chloragocytákon azonban a sejtmembrán kalciumcsatornáinak alacsony permeabilitásával vagy zárva maradásukkal is magyarázható.

Az ionomycin hatására bekövetkező intracelluláris kalciumszint változás során először a sejten belüli kalciumraktárak kiürülése zajlik le, amit a sejtmembrán kalciumcsatornáinak aktiválódása követ. Ezt a feltevést igazolandó, az ionomycin coelomasejtekre kifejtett hatását kalciummentes PBS-ben is vizsgáltuk. Eredményeink szerint a coelomasejtek kevésbé reagáltak az ionomycin stimulációra kalciumszintjük emelkedésével az 1,8 mM extracelluláris kalcium jelenlétében inkubált mintákhoz képest, tehát az ionomycin jelentős sejten belüli szabad kalciumszint emelkedést okoz a nyugalmi szinthez képest, mégpedig az intracelluláris kalciumraktárakon keresztül.

Eredményeink szerint a PKC aktiváló hatással rendelkező PMA coelomasejtek esetében sem a plazmamembránon keresztül, sem intracelluláris kalciumraktárakból történő Ca^{2+} -mobilizációt nem indukált. Vizsgálataink kiegészítik a szakirodalomban korábban

publikált gerinces vagy gerinctelen modelleket felhasználó tanulmányokat, megerősítve az általánosan előforduló jelátviteli mechanizmusok meglétét az élővilágban. Elméletünk szerint a giliszta immunsejtcsoportok esetén a különböző stresszhatások eltérő aktivációt vagy kalcium mobilizációt okozhatnak.

5.2. Ca^{2+} -ATPáz aktivitás a coelomasejtekben

Thapsigargin alkalmazásával vizsgáltuk az evolúciósan konzervált Ca^{2+} -ATPázok jelenlétét gilisztasejteken. A thapsigargin kalciumszintre gyakorolt hatásának detektálásával mindkét vizsgált gilisztafaj funkcionális Ca^{2+} -ATPáz aktivitását kimutattuk, továbbá a thapsigargin előkezelést kapott minták csökkent kalciumszint emelkedése az ionomycin kezelést követően arra utal, hogy az effektor coelomasejtek elsődleges kalciumraktára az endoplazmás retikulum.

Az enzimaktivitás helyének meghatározását Ca^{2+} -ATPáz citokémia segítségével végeztük el. Korábbi vizsgálatok szerint a giliszták és piócák mezodermais eredetű szövetei rendelkeznek ATPáz enzimaktivitással. Mindkét faj coelomasejtjei között találtunk pozitív enzimreakciót adó sejteket, melyek jellegzetes festődési mintázata a sejtmag körül volt látható. A festési mintázat megfelelhet az endoplazmás retikulum ATPáz enzimeitől származó jelnek.

5.3. Mitogén és kemoattraktáns által kiváltott kalciumjel a coelomasejtekben

Az LPS, illetve a növényi lektinek közül a PHA, a ConA, vagy a PWM *in vitro* és *in vivo* kísérletekben gyakran alkalmazott mitogének. Ezek az anyagok gerinces leukocyták aktivációja és proliferációja során a sejtek kalciumszintjének változását okozhatják. Kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy a gerinctelen fajok immunsejtjeinek mitogénekkal történő aktivációjakor megfigyelhető-e kalcium mobilizáció. Korábbi eredmények szerint a mitogénstimulus hatására bekövetkezik coelomasejt proliferáció. A különböző mitogénkezelések közül csak a PHA kezelés váltott ki detektálható kalciumszint emelkedést. Az LPS, PWM és ConA proliferációt fokozó hatása feltehetőleg kalciumtól független jelátviteli útvonalakon zajlik. Az fMLP elnyújtott hatása a mérés során körülbelül 1 perccel a stimulus után jelentkezett, és 5 perc után állt vissza a nyugalmi kalciumszint. A

coelomasejtek korai, de viszonylag gyenge aktivációjában lehet szerepe ennek a folyamatnak.

5.4. Ismételt sejtizolálások és mitogénstimuláció hatása a coelomasejtek sejtosztódására

A giliszták immunreakciói során a coelomasejtszám helyreállítása alapvető fontosságú. Munkánkban ismételt sejtizolálásokat és regenerációs periódusokat alkalmazva megfigyeltük a mitotikus fázisban lévő coelomasejtek arányának emelkedését a második, illetve harmadik coelomasejtizolálást követően. Az utolsó, negyedik sejtizoláláskor már a proliferáló coelomasejtek arányának csökkenését tapasztaltuk.

Vizsgálatainkban a mitogének hosszabb és rövidebb távú hatásait is elemeztük *E. fetida* és *A. caliginosa* coelomasejtek proliferációjára. Ismételt mitogénstimulusokat alkalmazva *E. fetida* esetében a ConA és a PWM lektin erősebb, míg az LPS stimulus gyengébb sejtproliferációt serkentő hatását tapasztaltuk.

5.5. A lysenin expressziója *Eisenia* coelomasejtekben és szövetekben

A gyűrűsférgek immunválaszában kitüntetett szerepet játszanak a különböző cytotoxikus és antimikrobiális fehérjék. Korábbi tanulmányok nem tárgyalták egyértelműen a lysenin molekula expressziós mintázatát az *Eisenia* szövetekben és feladatát az immunitásában.

Sikerült meghatároznunk az izolált coelomasejttípusok és a szövetek lysenin expresszióját. Eredményeink szerint a lysenint nem a helyhez kötött, chloragogén szövetet alkotó, centrális chloragocyta sejtek termelik, hanem a fehérje kizárólag a coelomaüreg szabad chloragocyta/eleocyta sejtjeiből származik. Ezeket az adatokat nemcsak az Intézetünkben előállított lysenin specifikus monoklonális a-EFCC5 ellenanyag által adott festési mintázat alapján állítjuk, ugyanis párhuzamosan a poliklonális a-lyseninnel végzett immunfestések hasonló eredményekkel szolgáltak.

Nem zárható ki, hogy a centrális chloragocyta sejtek rendelkeznek lysenin kódoló mRNS-sel, míg a szabad, érett chloragocyta sejtek lehetnek a lysenin proteinnel rendelkező

effektor sejtek. Az ellentmondás feloldására a giliszták lysenin expressziójának szezonális, vagy a sejtek érése során bekövetkező változásaira vonatkozó további adatok birtokában lenne esély, ezek azonban egyelőre nem állnak rendelkezésre.

5.6. *In vitro* baktérium-kezelés befolyásolja a coelomasejtek által termelt lysenin mennyiségét

A lysenin molekula immunválaszban betöltött szerepét *E. coli* és *S. aureus* baktériumokkal kezelt coelomasejtekben vizsgáltuk. Eredményeink szerint a lysenin expresszió Gram-pozitív baktériumok hatására *in vitro* rendszerben fokozódhat. Az *E. coli* baktériumokkal történt inkubáció után megfigyelt lysenin expresszió csökkenés összhangban van a szakirodalomban már korábban publikált eredményekkel.

Érdekesség, hogy a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumkezelés eltérően modulálja a lysenin expresszióját. Az eltérő expressziós mintázat pontosabb megértéséhez további vizsgálatok szükségesek.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a lysenin egy multifunkcionális fehérje, mely több eltérő feladatot is elláthat az giliszták immunválasza során. Adataink alapján nemcsak cytotoxikus, hanem antibakteriális funkcióval is bír a lysenin.

6. A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Opper B., Bognar A., Heidt D., Németh P., Engelmann P.: Revising lysenin expression of earthworm coelomocytes. *DEV COMP IMMUNOL.* 2013; 39(3):214-218. IF: 3,7. Független idéző: 2

Engelmann P., Cooper E.L., **Opper B.**, Németh P.: Earthworm innate immune system. In A. Karaca (Ed.): *Biology of earthworms, Soil Biology 24.* Springer Verlag Heidelberg, 2011; pp 229-245. Független idéző: 2

Engelmann P., **Opper B.**, Németh P.: Interactions of intracellular calcium and immune response in earthworms. *INV SURV J* 2011; 8: 78-84.

Opper B., Németh P., Engelmann P.: Calcium is required for coelomocyte activation in earthworms. *MOL IMMUNOL.* 2010; 47(11-12):2047-56. IF: 2,9; Független idéző: 4

7. EGYÉB TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Horvath G., Reglodi D., Brubel R., Halasz M., Barakonyi A., Tamas A., Fabian E., **Opper B.**, Toth G., Cohen M., Szereday L.: Investigatin of the possible functions of PACAP in human trophoblast cells. *J Mol Neurosci.* 2014 May 30. [Epub ahead of print]

Szakaly P., Laszlo E., Kovacs K., Racz B., Horvath G., Ferencz A., Lubics A., Kiss P., Tamas A., Brubel R., **Opper B.**, Baba A., Hashimoto H., Farkas J., Matkovits A., Magyarlaki T., Helyes Z., Reglodi D.: Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptid (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischaemia/reperfusion injury. *Neuropeptides.* 2011; 5:113-121.

Horvath G., Brubel R., Kovacs K., Reglodi D., **Opper B.**, Ferencz A., Szakaly P., Laszlo E., Hau L., Kiss P., Tamas A., Racz B.: Effects of PACAP on the oxidative stress-induced cell death in rat kidney and human hepatocyte cells. *J Mol Neurosci.* 2011 Jan; 43(1):67-75.

Horvath G., Reglodi D., **Opper B.**, Brubel R., Tamas A., Kiss P., Toth G., Csernus V., Matkovits A., Racz B.: Effects of PACAP on the oxidative stress-induced cell death in chicken pinealocytes by the phase of the circadian clock. *Neurosci Lett.* 2010 Oct 29; 484(2):148-52.

Matics R., Varga S., **Opper B.**, Klein A.K., Horvath G., Roulin A., Putnoky P., Hoffmann Gy.: Partitioning of genetic (RAPD) variability among sexes and populations of the Barn Owl (*Tyto alba*) in Europe. *J Raptor Res.* 2005; 39:142-148.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Engelmann Péternek és Dr. Németh Péternek, valamint a PTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézet és Anatómia Intézet munkatársainak a dolgozat elkészítéséhez nyújtott segítségüket. Külön köszönet Dr. Reglódi Dórának a támogatásért.