

# **AZ ENDOCITÓZIS ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE: BIOLÓGIAI ÉS MESTERSÉGES RÉSZECSKÉK FELVÉTELI MECHANIZMUSAINAK VIZSGÁLATA GILISZTA ÉS HUMÁN IMMUNSEJTEKEN**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Kokhanyuk Bohdana**

Témavezető:

Dr. Engelmann Péter, egyetemi docens

Programvezető:

Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ,  
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet



Pécs, 2022

## 1. Összefoglalás

A veleszületett immunrendszer mechanizmusai evolúciósan konzerváltak a gerinctelen és gerinces fajokban, ezért a gerinctelen fajok immunsejteiről azt feltételezik, hogy funkcionális szempontból hasonlítanak a humán makrofágokhoz. Kutatási témánk célja a gerinctelen makrofág-szerű sejtek (gilisza coelomasejtek) és gerinces fagociták (humán THP-1 sejtek) endocitózis útvonalainak összehasonlítása a biológiai (baktériumok) és szintetikus (nanorészecskék) részecskék felvételében.

A dolgozat első részében a baktériumok (*Escherichia coli* és a *Staphylococcus aureus*) felvételében szerepet játszó endocitózis utakat azonosítjuk és hasonlítjuk össze különböző farmakológiai gátlószerek alkalmazásával humán és gilisza immunsejtekben. Ezentúl megvizsgáltuk a mintázatfelismerő receptorok mRNS expresszióját és a baktériumok/lizoszómák kolokalizációját az endocitózis gátlását követően. Megállapítottuk, hogy a baktériumok endocitózisa, egy evolúciósan konzervált aktin-függő (cytochalasin B és D által gátolható) fagocitózis a humán THP-1 monocitákban és a coelomasejtekben. A kolokalizált lizoszómák/baktériumok számának csökkenése alátámasztotta ezeket a megállapításokat. Adataink megerősítik azt a hipotézist, miszerint a humán mieloid sejtek fagocita funkciói erősen konzerváltak, és funkcionális hasonlóságot mutatnak a gilisza coelomasejtekkel.

A dolgozat második részében a 75 nm-es ezüst nanopartikulumok (AgNP-ok) endocitózis mechanizmusait jellemezzük gilisza coelomasejtekben, humán THP-1 monocitákban és makrofágokban. A felvétel gátlását követően vizsgáljuk az AgNP-k intracelluláris lokalizációját, illetve az epigenetikai, metabolikus változásokat és az immunreceptorok mRNS expressziójára kifejtett hatásokat. Eredményeink szerint a humán THP-1 és a PMA-differenciált THP-1 sejtek mikrotubulus-függő, scavenger-receptor és PI3K jelátvitel-mediált makropinocitózis során internalizálják az AgNP-t, ezzel ellentétben a gilisza coelomasejtek az aktin-függő fagocitózisa támaszkodnak, hasonlóan a bakteriális felvételhez. Minden sejttypusban az AgNP-ok a citoplazmában, az endo-/lizoszómákon belül lokalizálódnak. Az AgNP-k felvétele TLR/MyD88-függő folyamat, a humán immunsejtek esetében a BPI mintázatfelismerő receptor (PRR) is szerepet játszik. Eredményeink új információkat szolgáltathatnak a nanomedicina területén alkalmazott NP (nanohordozók) sejtes felvételéről, illetve a nanorészecskék expozíciójának ökotoxikológiai következményeiről.

## 2. Általános bevezetés

A bekebelezett partikulum mérete és eredete, valamint az endoszóma kialakulásának mechanizmusa alapján számos útvonalat különböztetünk meg. Ezek a sejtbiológiai folyamatok különféle makromolekulák, tápanyagok és részecskék sejtekbe való bejuttatására alakultak ki. Általánosságban az endocitózis felosztható fagocitózissra (0,5  $\mu\text{m}$ -nél nagyobb részecskék esetén) és pinocitózissra (folyadékok és oldható molekulák esetén). Ez utóbbi további csoportokra bontható: makropinocitózis, klatrin-mediált endocitózis (CME), kaveolin-mediált endocitózis (CvME) és klatrin/kaveolin-független endocitózis<sup>1</sup>. A fent említett felvételi útvonalak blokkolására alkalmazott farmakológiai inhibitorok igen elterjedtek az endocitózis mechanizmusainak vizsgálatára.

Az evolúciósan, ősi endocitózis folyamatok tanulmányozására<sup>2</sup> számos állatmodell alkalmaznak. Jelenleg a giliszták az evolúciós immunbiológiai vizsgálatok ígéretes állatkutatói modelljei<sup>3</sup>. A giliszta-immunsejtek (coelomasejtek) két alpopulációja közé tartoznak az amoebocyták és az eleocyták, melyek a gerincesek immunsejteihez hasonló immunfunkciókkal rendelkeznek. Az eleocyták antimikrobiális, citotoxikus, opszonizáló és agglutináló molekulákat termelnek<sup>4</sup>, az amoebocyták fagocitózissra és enkapszulációra képesek<sup>5</sup>. Kutatómunkánk során az amoebocyták alpopulációjára koncentráltunk, mivel bebizonyosodott, hogy a giliszta immunsejtek közül az idegen partikulumok felvételében jelentős szerepet játszanak<sup>5</sup>.

Feltételezve, hogy a giliszta amoebocyták a gerinces myeloid sejtekhez hasonlítanak, megvizsgáltuk a gerinctelen és gerinces immunsejtek endocitózis útvonalai közötti hasonlóságokat és különbségeket. Kísérleteinkben három különböző sejtípust alkalmaztunk: humán THP-1 monocitákat, a PMA-differenciált THP-1 makrofág-szerű sejteket és coelomasejteket. Összehasonlítjuk a biopartikulumok (Gram-pozitív, ill. Gram-negatív baktériumok) felvételében szerepet játszó endocitózis mechanizmusokat a gerinctelen makrofágokban (coelomasejtek) és a gerinces fagocitákban (humán THP-1 sejtek). Továbbá, jellemezzük a mesterséges nanorészecskék (ezüst nanopartikulumok, AgNP) felvételi útvonalait coelomasejtekben és humán THP-1 monocita sejtekben.

## 3. Célkitűzések

A sejtek állandóan kommunikálnak külső környezetükkel, és ennek következtében számos folyamat alakult ki a környezeti vegyületek felvételére. Ezek az endocitózis útvonalak alapvető szerepet játszanak a sejtek élettanában, ami magyarázhatja ezen mechanizmusok

konzerváltságát az evolúció során. Külső patogén ágensek elleni védekezés során a sejtek fagocitózisa számos kórokozót távolít el. Ezen gondolatok tükrében a dolgozat két fő részre tagolódik, amelyek szorosan összefüggenek, hiszen a különböző környezeti partikulumokkal szembeni endocitózis összehasonlító vonatkozásaival kapcsolatos kísérleti adatokkal foglalkoznak.

1. A biorészecskék elleni konzervált endocitózis mechanizmusok jellemzése:
  - A) a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumtörzsek **felvételi mechanizmusának** azonosítása **coelomasejtekben és humán** (normál és PMA-differenciált) **THP-1 monocita sejtekben** különböző farmakológiai inhibitorok alkalmazásával;
  - B) **a bekebelezett baktériumok/lizoszómák kolokalizációjának** meghatározása az endocitózis gátlása esetén;
  - C) **konzervált PRR-ek mRNS expressziós mintázatainak** megfigyelése endocitózis gátlást követően.
2. Az ezüst nanopartikulumok (AgNP-ok) endocitózis folyamatainak jellemzése:
  - A) **coelomasejtek és humán** (normál és PMA-differenciált) **THP-1 monocita sejtek** **AgNP-felvételi mechanizmusának** azonosítása különböző farmakológiai endocitózis-gátlók alkalmazásával;
  - B) **az AgNP-ok ultrastrukturális lokalizációja** az endocitózis gátlásakor;
  - C) megfigyeljük **a konzervált PRR-ek mRNS-expressziójának változását** az AgNP-felvétel gátlását követően;
  - D) **a globális DNS-metilációs (5-mC) mintázat értékelése** az AgNP-ok endocitózis gátlása után;
  - E) **a sejtlégzés értékelése** AgNP expozíció után.

#### 4. A bakteriális felvételi mechanizmusok funkcionális hasonlóságokat mutatnak a giliszta és a humán immunsejtek között

##### 4.1. Bevezetés

A giliszták mikrobákban gazdag környezetben élnek<sup>6</sup>, de a mikrobák sejtes felvételi útvonalai viszonylag ismeretlenek a gilisztáknál, valamint más gerinctelen modelleknél. A különböző endocitózis utak farmakológiai gátlószereit alkalmazva célul tűztük ki az *Eisenia andrei* coelomasejtek és humán megfelelőjük, a THP-1 monociták és differenciált THP-1 makrofág-szerű sejtek Gram-negatív (*Escherichia coli*) és Gram-pozitív (*Staphylococcus aureus*) szembeni bakteriális endocitózis mechanizmusainak összehasonlítását.

A gilisztákban előforduló PRR-ek funkcionális vonatkozásairól (különösen a TLR tekintetében) rendkívül korlátozottak az információink<sup>7</sup>. Az *Eisenia andrei* TLR-t (*EaTLR*) és az antibakteriális válaszban betöltött szerepét a közelmúltban jellemezték<sup>8</sup>, de az útvonalhoz kapcsolódó további effektor molekulákat még nem határozták meg. Az összehasonlító megközelítés érdekében vizsgálatainkban csak azokat az immunreceptor géneket (*TLR*, *MyD88* és *LBP/BPI*) választottuk ki, melyek homológjait gerinctelen és gerinces modelleken is tesztelhetünk.

E fejezetben tárgyaljuk a lehetséges endocitózis mechanizmusokat, valamint a receptorokat, amelyek részt vesznek a Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok által kiváltott válaszokban a coelomasejtekben és humán THP-1 monocitákban és makrofágokban.

## 4.2. Anyagok és módszerek

4.2.1. Sejtenyésztés, és coelomasejt izolálás

4.2.2. Endocitózis-gátlószerek és bakteriális kezelések

4.2.3. Áramlási citometria mérések

4.2.4. F-aktin és lizoszómák jelölése, konfokális mikroszkópia (CLSM) és a lokalizáció mennyiségi kiértékelése

4.2.5. RNS izolálás, cDNS szintézis és valós idejű PCR

4.2.6. Statisztikai analízis és az adatok elemzése

## 4.3. Eredmények

A FITC-konjugált, hő-inaktivált *E. coli* és *S. aureus* felvételének kinetikai elemzése gyors bakteriális internalizációt mutatott a THP-1 sejtekben, már az inkubáció első órájától kezdve, és mintegy 90%-a sejteknek vett részt a folyamatban 24 óra elteltével. Az endocitózis útvonalak célzására -különböző farmakológiai vegyületekkel- végzett előkezelés azt mutatta, hogy az aktin-depolimerizáló ágens, a cytochalasin B szignifikánsan csak a *S. aureus* bekebelezését gátolta, míg a cytochalasin D szignifikánsan gátolta mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumok felvételét THP-1-sejtekben a kontroll mintákhoz képest.

A PMA-differenciált THP-1 sejtek (diff. THP-1) bakteriális bekebelezésének kinetikája a normál THP-1 sejtekhez volt hasonló. Az *E. coli* internalizáció szintje megközelítőleg 90%-ot ért el 24 óra elteltével, míg ez kicsit alacsonyabb volt a *S. aureus* esetében. A THP-1 monocitákhoz hasonlóan a legerősebb gátlást a cytochalasin D váltotta ki, azonban a cytochalasin B is csökkentette a *S. aureus* bekebelezését. Más inhibitorok érdemben nem

befolyásolták a baktériumok felvételét a diff. THP-1 sejtekben. A cytochalasin D-vel kezelt sejtek mikroszkópos analízise megerősítette az áramlási citometriával mért bakteriális felvétel gátlási adatokat.

A coelomasejtek (amoebocyták) bakteriális felvételének kinetikáját értékelve egy lassabb folyamatot tapasztaltunk, mint a humán sejtekben. A baktériumokat bekebelező sejtek mennyisége négy óra múlva fokozatosan emelkedni kezdett, és 48 óra elteltével érte el a 70%-ot. A coelomasejtekt endocitózisát a cytochalasin D gátolta, hasonlóan a THP-1-hez és a diff. THP-1 sejtekhez. Érdekes módon a cytochalasin B hatékonyan gátolta a Gram-negatív baktériumok felvételét is, eltérően a humán immunsejtektől.

Konfokális mikroszkópia segítségével kimutattuk a FITC-konjugált baktériumok és a jelölt aktin filamentumok kolokalizációját, valamint cytochalasin D kezelést követően az alacsony mértékű fagocitózist, ami megerősíti az áramlási citometria adatokat. LysoTracker alkalmazásával kimutattuk, hogy a cytochalasin D lecsökkentette a baktériumok felvételét a sejtekben. Mindhárom sejttypusban szignifikánsan csökkentette a baktériumokból és lizoszómákból származó kolokalizált jelek mennyiségét. Ezeket az adatokat a Manders kolokalizációs együttható elemzése statisztikailag igazolta.

Az immunreceptor gének mRNS expresszióját vizsgálva a THP-1 sejtekben nem volt szignifikáns emelkedés a *TLR*, *MyD88* vagy *BPI* szintjében. Azonban a *TLR* expressziója megemelkedett a cytochalasin D előkezelés után. Az *E. coli* expozíció csökkentette a *TLR* mRNS expresszióját a THP-1 sejtekben a kontroll mintákhoz képest. A coelomasejtekben a *TLR* mRNS expressziója csak a *S. aureus* expozíció után növekedett meg, és egyik cytochalasin sem befolyásolta ezt a paramétert. Az *LBP/BPI* mRNS szintek szignifikánsan megemelkedtek az *E. coli* hatására, és mikróba kezeléstől függetlenül az mRNS expresszióját a cytochalasin D gátolta.

#### 4.4. Következtetések

Emlős sejtekkel végzett vizsgálatokból ismert, hogy az aktin polimerizációja szükséges a fagocitózis és a makropinocitózis kivitelezéséhez, de nem nélkülözhetetlen a többi endocitózis útvonal működéséhez<sup>9</sup>. Eredményeink alátámasztják, hogy az aktin citoszkeleton részt vesz a bakteriális fagocitózis folyamatában a coelomasejtek és humán monocita sejt vonal esetében is. Az aktin citoszkeletonális rendszer alapvető szerepet tölt be a fagoszóma képződésben. Így az F-aktin depolimerizáló ágens, a cytochalasin D univerzális inhibitornak bizonyult mind a Gram-negatív, mind a Gram-pozitív baktériumok fagocitózisában,

mindhárom vizsgált sejttípusban. Számos különbség mellett (pl. intracelluláris jelátvitel), a baktériumok felvételében szerepet játszó, konzervált aktin-függő fagocitózis a humán és giliszta immunsejtek funkcionális hasonlóságára utal.

## **5. Az AgNP-ok felvétele eltérő endocitózis útvonalakon valósul meg a coelomasejtekben és humán THP-1 sejtekben**

### **5.1. Bevezetés**

Az elmúlt évtizedekben igen nagy mértékben megnövekedett a nanorészecskék (NP-k) felhasználása az ipar és az egészségügy különböző területein. Számos egyéb alkalmazás mellett katalizátorként, szennyvízkezelő szerként<sup>10</sup>, és gyógyszer-szállító rendszerekként<sup>11</sup> is használják a NP-kat. A NP-ok közül a nanoezüst (AgNP) a legszélesebb körben elterjedt kereskedelmi termék<sup>12</sup>. A veszélyes immunrendszer sejtjes elemei, különösen a monociták és a makrofágok, az AgNP-kre adott immunológiai válasz első vonalában állnak. Az AgNP-ok nagymértékű alkalmazása során kikerülnek a környezetbe, és bejuthatnak a táplálékláncba is. Az AgNP-ok a talajba is bejuthatnak, így veszélyforrást jelentenek a talajlakó szervezetekre<sup>13</sup>, beleértve a gerincteleneket is, amelyek az elsők között találkoznak NP-kal. Korábban beszámoltunk arról, hogy az AgNP-ok expozíciója *E. andrei* gilisztában oxidatív stresszhez, DNS-károsodáshoz, valamint megváltozott génexpressziós mintázathoz vezet az immunválasz tekintetében<sup>14-16</sup>.

Általában az NP-ok és közvetlen környezetének tulajdonságai, mint például a részecskeméret, az alak, a felszín, a felületi töltés, az expozíciós idő stb., meghatározzák a részecskék felvételi útvonalait, és ebből következően a toxikológiai hatásait<sup>17</sup>. Az AgNP-ok expozíciójának toxikológiai következményeire vonatkozó adatok meglehetősen bőségesek, azonban korlátozott információ áll rendelkezésünkre az AgNP-ok sejtjes felvételi mechanizmusairól, különösen a gerinctelen fajok esetében.

Az OECD ajánlja az *Eisenia andrei* gilisztát modellszervezetként talaj-toxikológiai vizsgálatokhoz<sup>18</sup>, így a coelomasejtek AgNP-felvételi mechanizmusai külön figyelmet érdemelnek. A humán fehérvérsejtek endocitózis-mechanizmusainak ismerete szintén döntő jelentőségű a NP alapú gyógyszer-szállító rendszerek fejlesztése szempontjából. A NP-ok fizikai-kémiai tulajdonságainak megváltoztatása fontos szerepet játszhat a molekuláris célpontok elérésében és az intracelluláris folyamatokban.

Tanulmányunkban endocitózis-gátlószerek alkalmazásával vizsgáljuk a 75 nm-es AgNP-ok endocitózis folyamatait három, funkcionálisan hasonló gerinctelen és gerinces

sejttípusban. Továbbá, molekuláris szinten értékeljük az AgNP-ok által okozott változásokat, beleértve az immunrendszerrel kapcsolatos gének és a sejtlégzési profilok eltéréseit.

## **5.2. Anyagok és módszerek**

5.2.1. Nanorészecskék fizikai-kémiai jellemzése

5.2.2. Sejtenyésztés, és coelomosejt izolálás

5.2.3. Az AgNP-ok által kiváltott dózis-válasz vizsgálatok

5.2.4. A célsejtek kezelése endocitózis-gátlószerekkel

5.2.5. A „belső komplexitási” (SSC) paraméterek áramlási citometriás mérése

5.2.6. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) intracelluláris AgNP lokalizációhoz

5.2.7. Az intracelluláris ezüsttartalom mennyiségi meghatározása ICP-MS segítségével

5.2.8. RNS izolálás, cDNS szintézis és valós idejű PCR

5.2.9. 5-metilcitozin immuncitokémia és a genomi DNS-metilációs szintek mennyiségi meghatározása

5.2.10. A sejtlégzés bioenergetikája AgNP kezelést követően

5.2.11. Statisztikai analízis és az adatok elemzése

## **5.3. Eredmények**

A kapott túlélési arányok alapján az AgNP-ok  $EC_{20}$  értékei a következők voltak: 3.1  $\mu\text{g/mL}$  a THP-1 sejteknél, 3.6  $\mu\text{g/ml}$  a diff. THP-1 sejtekben és 38.9  $\mu\text{g/ml}$  a coelomasejtek esetében, ami jelzi, hogy a coelomasejtek jobban tolerálták a magas AgNP-dózisokat, mint a humán fagocita sejtek. A megállapított alacsony citotoxikus koncentrációkat alkalmaztuk a további kísérletekben.

Farmakológiai inhibitorokkal kezelt célsejtek AgNP felvételét áramlási citometrián alapuló vizsgálatokkal értékeltük az „belső komplexitás” (side scatter, SSC) tulajdonságainak megfelelően (az AgNP-t felvevő sejteknek megemelkedik az SSC értéke). Eredményeink alapján a tíz tesztelt inhibitor közül három (a colchicin, poli(I) és wortmannin) hatékonyan gátolja az AgNP-ok felvételét mind a THP-1 monocitákban, mind a diff. THP-1 makrofág-szerű sejtekben. A citoszkeleton két fő komponense közül a mikrotubulosokat gátolja a colchicin kezelés, mely megakadályozza AgNP-k endocitózisát a humán immunsejtekben. A mikrotubulusok szerepe fontos az összes pinocitózis folyamatban, ebből arra következtethetünk, hogy humán sejtek esetében ez az endocitózis mechanizmus áll az AgNP-



k felvételének hátterében. Két másik farmakológiai inhibitor (a poli(I) és a wortmannin) szintén hatékonyan gátolta az AgNP-ok felvételét a THP-1 és diff. THP-1 sejtekben. Ennek alapján a scavenger receptorok, és a PI3K jelátviteli útvonal szintén szerepet játszik az AgNP-ok celluláris felvételében.

Ezek az endocitózis gátlószerek, amelyek hatékonyan blokkolják az AgNP-ok felvételét a THP-1-ben és a diff. THP-1 sejtekben, nem mutattak semmilyen hatást a coelomasejtekben. Ebben a sejttypusban, a cytochalasin B és a cytochalasin D (az aktin-depolimerizációs ágensek) blokkolták az AgNP-ok endocitózisát. Ezek az eredmények a különböző evolúciós stádiumú immunsejtek AgNP felvételéhez kapcsolódó eltéréseket mutatják. A citoskeletális komponensek két fő eleme közül, a humán immunsejtekben a mikrotubulusok, míg a coelomasejtek esetében az aktin filamentumok vesznek részt az AgNP-ok internalizációjában.

Az eltérő endocitózis mechanizmusok ellenére nem találtunk jelentős különbséget az AgNP-ok sejtes lokalizációjában a vizsgált sejttypusok között. Ultrastruktúrálisan az AgNP-okat a citoplazmában (az endoszómákban vagy fagolizoszómákon belül) detektáltuk. Az inhibitorokkal kezelt sejtekben csak ritkán találtunk AgNP-ket a vezikulák belsejében.

A humán THP-1 és diff. THP-1 immunsejtek hasonló génexpressziós mintázatokat mutattak, különösen a *MyD88* fontosságát tapasztaltuk az AgNP-ok felvételében, valamint feltételezzük a TLR, *MyD88* és SRs komplexek közötti lehetséges közreműködést az AgNP által kiváltott folyamatokban. A *BPI* expresszió szignifikáns növekedését AgNP-kel való inkubáció során először detektáltuk THP-1 és a diff. THP-1 sejtekben. A humán immunsejtekhez hasonlóan a coelomasejtekben a *MyD88* magasabb expressziót mutatott AgNP-ok alkalmazása után, de a cytochalasinok részben lecsökkentették a *MyD88* expresszióját a kontroll szintre. Eltérően más gilisztafajokhoz, az LBP/BPI nem vett részt a coelomasejtek AgNP-kre adott válaszában, ami arra utal, hogy nem csak a különböző endocitózis utak, hanem a különböző méretű NP-ok felvételi mechanizmusa is eltér bizonyos fajok között.

A globális DNS metilációs mintázat elemzése során a humán immunsejtek AgNP-val való kezelése nem váltott ki szignifikáns változást a metilált citozinok (5-mC) szintjében, ugyanakkor észleltük néhány endocitózis gátlószer hatását a metilációs mintázatban. Továbbá, megemelkedett DNS-metilációs szintet figyeltünk meg a coelomasejtekben AgNP-ok expozíció hatására.

A sejtlegzés, például az oxigén-fogyasztás mértéke (OCR) és az extracelluláris savasodási ráta (ECAR) mérése során az OCR-szintek csökkenését mutatták az AgNP-vel

kezelt THP-1, ill. a diff. THP-1 sejtekben is. A maximális légzés és a tartalék légzési kapacitás paraméterei szignifikánsan eltértek egymástól, ami általában a humán immunsejtek alacsonyabb légzési teljesítményét jelzi stresszes körülmények között. A coelomasejtek esetében, míg a kontroll sejtek nem jelentősen hagytakoztak a mitokondriális légzésre, addig az AgNP kezelés megnövelte a mitokondriumok oxigénfogyasztási arányát.

#### 5.4. Következtetések

Kimutattuk, hogy a giliszta coelomasejtek és a humán fagocita sejtek különböző endocitózis mechanizmusokat (eltérő citoskeletális elemeket és különböző receptorokat) használnak a 75 nm-es AgNP-ok internalizálására. A humán immunsejtek AgNP felvétele egyidejűleg és/vagy felváltva a „scavenger” receptorok és mikrotubulusok bevonásával zajlik ezeken az endocitózis útvonalakon. A humán sejtekkel ellentétben a coelomasejtek aktin-függő fagocitózis mechanizmusokat alkalmaznak mind a biológiai (Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok), mind a mesterséges (AgNP) partikulumok internalizálására. Továbbá, az AgNP-k eltérő hatást fejtenek ki a gerinctelen és gerinces immunsejtek immunválaszában szerepet játszó receptor génekre és a sejlégzés metabolizmusára.

#### 6. Az új eredmények összefoglalása

1. A vizsgált endocitózis gátló szerek közül a cytochalasin B lecsökkentette a *S. aureus* felvételét, míg a cytochalasin D mind az *E. coli*, mind a *S. aureus* felvételét gátolja a THP-1, és a diff. THP-1 sejtekben.
2. A cytochalasin B és D hatékonyan gátolták mind az *E. coli*, mind a *S. aureus* felvételét coelomasejtekben. Ezek az eredmények az aktin-függő fagocitózis ősi szerepére utalnak a coelomasejtek és humán immunsejtek bakteriális felvételében.
3. Az bekebelezett baktériumok a lizoszómákba kerülnek, de az aktin polimerizációjának gátlása csökkenti a lizoszómákkal ko-lokalizált baktériumok számát mindhárom sejtípusban.
4. A THP-1 sejtekben a *TLR* expressziója megnövekedett a cytochalasin D-vel végzett előkezelés után, ugyanakkor a *LBP/BPI* expresszió lecsökkent a diff. THP-1 sejtekben és a coelomasejtekben.
5. Áramlási citometria mérések alapján az endocitózis-gátlószerek (colchicin, a poli(I) és a wortmannin) alkalmazásakor a THP-1-ben és diff. THP-1 sejtekben, lecsökkent AgNP-felvételt tapasztaltunk. Ez az eredmény jelzi a humán immunsejtekben a mikrotubulusok, a scavenger receptorok és a PI3K jelátvitel fontosságát az AgNP-ok sejt felvételében.

7. A coelomasejtekben a cytochalasin B és D gátolták az AgNP-ok felvételét, ami az aktin-dependens fagocitózis részvételére utal.
8. Ultrastruktúrálisan kimutattuk, hogy az AgNP-ok a sejtek citoplazmájában (endo/lizoszómáiban) lokalizálódnak, közel a sejtmembránhoz, és nem jutnak be a sejtmagba.
9. Az ICP-MS mérések az ezüst mennyiségének csökkenését mutatták a kolchicinnel, poli(I)-vel és wortmanninnal előkelezt THP-1 és a diff. THP-1 sejtekben.
10. A génexpressziós eredmények arra utalnak, hogy a THP-1 és diff. THP-1 sejtekben az AgNP felvételét BPI/TLR/MyD88 jelátvitel közvetíti, míg coelomasejtekben az LBP/BPI nem vesz részt a folyamatban.
11. Az AgNP kezelés csökkenti a sejtlegzés jellemzőit (OCR és az ECAR) humán immunsejtekben, míg a coelomasejtek fokozott légzési paramétereket mutatnak az AgNP-ok felvételekor.

## 7. Hivatkozások

1. Bodó, K. *et al.* Nanomaterials and annelid immunity: a comparative survey to reveal the common stress and defense responses of two sentinel species to nanomaterials in the environment. *Biology* **9**, 307 (2020).
2. Bodó, K. *et al.* Species-specific sensitivity of *Eisenia* earthworms towards noble metal nanoparticles: a multiparametric in vitro study. *Environ. Sci.: Nano* **7**, 3509–3525 (2020).
3. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37–44 (2003).
4. Dang, F., Huang, Y., Wang, Y., Zhou, D. & Xing, B. Transfer and toxicity of silver nanoparticles in the food chain. *Environ. Sci.: Nano* **8**, 1519–1535 (2021).
5. DeDuve, C. *Blueprint for a Cell: The Nature and Origin of Life*. (Carolina Biological Supply Co, 1991).
6. Engelmann, P., Bodó, K., Najbauer, J. & Németh, P. Annelida: Oligochaetes (segmented worms): earthworm immunity, quo vadis? Advances and new paradigms in the omics era. in *Advances in Comparative Immunology* (ed. Cooper, E. L.) 135–159 (Springer International Publishing, 2018).
7. Engelmann, P. *et al.* Phenotypic and functional characterization of earthworm coelomocyte subsets: Linking light scatter-based cell typing and imaging of the sorted populations. *Dev. Comp. Immunol.* **65**, 41–52 (2016).
8. Foroozandeh, P. & Aziz, A. A. Insight into cellular uptake and intracellular trafficking of nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* **13**, 339 (2018).
9. Fujimoto, L. M., Roth, R., Heuser, J. E. & Schmid, S. L. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis: actin and receptor mediated endocytosis. *Traffic* **1**, 161–171 (2000).
10. Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W. & Nowack, B. Possibilities and limitations of modeling environmental exposure to engineered nanomaterials by probabilistic material flow analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**, 1036–1048 (2010).
11. Hayashi, Y. *et al.* Earthworms and humans in vitro: characterizing evolutionarily conserved stress and immune responses to silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 4166–4173 (2012).

12. Kim, B. Y. S., Rutka, J. T. & Chan, W. C. W. Nanomedicine. *N Engl J Med* **363**, 2434–2443 (2010).
13. OECD. OECD guideline for testing chemicals. Section 2: effects on biotic systems. Method, 207. Earthworm, acute toxicity tests. (1984).
14. Oppert, B., Bognár, A., Heidt, D., Németh, P. & Engelmann, P. Revising lysenin expression of earthworm coelomocytes. *Developmental & Comparative Immunology* **39**, 214–218 (2013).
15. Prochazkova, P., Roubalova, R., Dvorak, J., Navarro Pacheco, N. I. & Bilej, M. Pattern recognition receptors in annelids. *Developmental & Comparative Immunology* **102**, 103493 (2020).
16. Škanta, F., Roubalová, R., Dvořák, J., Procházková, P. & Bilej, M. Molecular cloning and expression of TLR in the *Eisenia andrei* earthworm. *Developmental & Comparative Immunology* **41**, 694–702 (2013).
17. Veiga, E. & Cossart, P. The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends in Cell Biology* **16**, 499–504 (2006).
18. Yang, Y., Zhang, C. & Hu, Z. Impact of metallic and metal oxide nanoparticles on wastewater treatment and anaerobic digestion. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **15**, 39–48 (2012).

## 8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Engelmann Péternek, hogy megosztotta velem szakmai tapasztalatait, hasznos tanácsait, ötleteit. Köszönettel tartozom a kutatócsoportunkhoz tartozó, illetve a kutatócsoportunkban korábban részt vevő kollégáknak (Nagy Rebeka, Pegah Pourzargham) és -különösen- Bodó Kornéliának a kutatói utam elindításához nyújtott segítségéért. Köszönettel tartozom Immunológiai és Biotechnológiai Intézetünk vezetőjének Prof. Berki Tímeának, valamint Prof. Németh Péternek, hogy támogattak tanulmányaim során, és hálás vagyok minden lehetőségért, amelyet kaptam.

Ezúton is köszönetet mondok Intézetünk dolgozóinak, PhD munkatársaimnak és mindenkinek, aki kényelmessé tette a munkámat ezekben az években.

Köszönettel tartozom Dr. Molnár Lászlónak és Dunai Dánielnek a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Karáról, akik mindig rendelkezésünkre bocsátották a kísérleti állatokat.

Szintén nagyra értékelem Yuya Hayashi kollégánk tanácsait az Aarhusi Egyetemről (Dánia), valamint Dr. Ifj. Sétáló Györgynek (PTE ÁOK, Orvosi Biológiai Intézet) gyakorlati és tudományos segítségét.

Köszönetet mondok mindenkinek, aki a kísérletek kivitelésében és tervezésében segített, különösen Dr. Bagóné Vántus Violának, Dr. Radnai Balázsnak, Vámos Eszternek (Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) a Seahorse kísérletekért; Dr. Telek Elek (Biofizikai Intézet) az NP-ok jellemzéséért; Béltéki Ádám és Dr. Galbács Gábor (Szegedi

Tudományegyetem) ICP-MS kísérletekért; Dr. Mészáros Mária és Dr. Deli Mária (Biológiai Kutatóközpont, Szeged) a DLS mérésekért; Dr. Ábrahám Hajnalka és Faragó Tünde (Elektron Mikroszkopia Labor) a TEM-ért; Dr. Szabó-Meleg Edinának (Biofizikai Intézet) a reagensekért.

Köszönöm a Tempus Közalapítványnak, hogy Stipendium Hungaricum Ösztöndíjat adományozott nekem, amely nélkül nem lenne lehetőségem Magyarországon tanulni.

Végül, de nem utolsósorban nagyon hálás vagyok Istennek, a szüleimnek és a családomnak, valamint a páromnak és a barátaimnak, hogy velem voltak ennyi éven át és erkölcsi támogatásukért.

A kutatás támogatása: TKP2020-IKA-08; KA-2022-03-304546; TKP2021-EGA.

## 9. Publikációk listája

### *A kutatási témához kapcsolódó első szerzői publikációk:*

**Kokhanyuk, B.**, Bodó, K., Sétáló Jr, G., Németh, P., Engelmann, P., 2021. Bacterial Engulfment Mechanism Is Strongly Conserved in Evolution Between Earthworm and Human Immune Cells. *Front. Immunol.* 12:733541. *Independent citations: 0; IF: 7.56*

**Kokhanyuk, B.**, Bagóné Vántus, V., Vámos, E., Radnai, B., Béltéki, A., Galbács, G., Telek, E., Mészáros, M., Deli, M.A., Németh, P., Engelmann, P. Earthworm and human immunocytes utilize different endocytosis mechanisms for AgNPs uptake (under preparation)

### *A kutatási témához kapcsolódó társszerzői publikációk:*

Bodó, K., Baranzini, N., Girardello, R., **Kokhanyuk, B.**, Németh, P., Hayashi, Y., Grimaldi, A., Engelmann, P., 2020. Nanomaterials and Annelid Immunity: A Comparative Survey to Reveal the Common Stress and Defense Responses of Two Sentinel Species to Nanomaterials in the Environment. *Biology* 9, 307. *Independent citations: 2; IF: 5.08*

Bodó, K., Hayashi, Y., Gerencsér, G., László, Z., Kéri, A., Galbács, G., Telek, E., Mészáros, M., Deli, M.A., **Kokhanyuk, B.**, Németh, P., Engelmann, P., 2020. Species-specific sensitivity of Eisenia earthworms towards noble metal nanoparticles: a multiparametric in vitro study. *Environ. Sci.: Nano* 7, 3509–3525. *Independent citations: 3; IF: 8.13*

### *A kutatási témához nem kapcsolódó társszerzői publikációk:*

Bodó, K., Kellermayer, Z., László, Z., Boros, Á., **Kokhanyuk, B.**, Németh, P., Engelmann, P., 2021. Injury-Induced Innate Immune Response During Segment Regeneration of the Earthworm, *Eisenia andrei*. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2363. *Independent citations: 4; IF: 5.92*

*Független hivatkozások száma összesen: 9*

*Összes IF: 26.69*

## 10. Részvétel konferenciákon

### *Előadások (első szerző):*

**Kokhanyuk B.,** Bodó K., Sétáló Jr. G., Németh P., Engelmann P. Evolutionary conserved uptake pathways are involved in bacterial engulfment mediated by invertebrate and vertebrate immunocytes. 2020. A Magyar Immunológiai Társaság 49. Vándorgyűlése

**Kokhanyuk B.,** Nagy R., Bodó K., Németh P., Engelmann P. Phylogenesis of phagocytes: comparative investigations on invertebrate and vertebrate immune cells. 2019. Tavasz Szél Konferencia fiatal magyar kutatók és PhD hallgatók számára, Debrecen

### *Poszter prezentációk (első szerző):*

**Kokhanyuk B.,** Bodó K., Radnai B., Bagóné Vántus V., Vámos E., Telek E., Mészáros M., Németh P., Engelmann P. Uptake routes of silver nanoparticles are different between invertebrate and vertebrate immunocytes. 2021. A Magyar Immunológiai Társaság 50. Vándorgyűlése

**Kokhanyuk B.,** Bodó K., Sétáló Jr. G., Németh P., Engelmann P. Evolutionary conserved uptake pathways are involved in the bacterial engulfment mediated by invertebrate and vertebrate immunocytes. 2020. 15<sup>th</sup> Immunológiai Tavasz Iskola, Ettal, Németország

**Kokhanyuk B.,** Bodó K., Németh P., Engelmann P. 2019. Untangling the bacterial uptake mechanisms in invertebrate and vertebrate immunocytes. A Magyar Immunológiai Társaság 48. Vándorgyűlése

**Kokhanyuk B.,** Nagy R., Bodó K., Németh P., Engelmann P. Built for engulfment: comparison of the phagocytic mechanisms in invertebrate and vertebrate macrophages cells. 2019. 49. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg

**Kokhanyuk B.,** Bodó K., Németh P., Engelmann P. Restoration kinetics of cellular immune components in earthworms following experimental depletion. 2019. 2-es Típusú Immunitás Homeosztázisban és Betegségekben, Bruges, Belgium

**Kokhanyuk B.,** Nagy R., Bodó K., Németh P., Engelmann P. Comparative analyses of phagocytic activity in invertebrate and vertebrate immunocytes. 2019. XVI. János Szentágothai Multidiszciplináris Konferencia és Diákverseny

**Kokhanyuk B.,** Bodó K., Gerencsér G., Telek E., Németh P., Engelmann P. Uncovering the intricate interactions of metal nanoparticles and *Eisenia andrei* immune cells. 2018. Orvosi Konferencia PhD hallgatók és klinikai kutatások szakértői számára