

**Antimikrobiális hatású peptidok az *Eisenia andrei* gilisztafajban:  
szerepük az immunválaszban, a regeneráció folyamatában és fém  
nanorészecskékkel történő interakciókban**

Doktori (PhD) értekezés

**Bodó Kornélia**

Témavezető:

Dr. Engelmann Péter, egyetemi docens

Programvezető:

Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ,  
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet



Pécs, 2020

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	5
Összefoglalás.....	7
1. Általános bevezetés.....	8
1.1. Az immunrendszer törzsfajlódása, röviden.....	8
1.2. A gerinctelenek élőlények, mint immunológiai modellszervezetek.....	10
1.3. Az <i>Oligochaeta</i> gyűrűsférgék immunrendszere.....	10
1.4. A coelomasejtek alcsoportjai és a mintázatfelismerés.....	11
1.5. A humorális komponensek csoportosítása.....	15
2. Célkitűzések.....	16
<i>Eredmények I.</i> .....	17
3. Új, lumbricin-homológok azonosítása <i>Eisenia andrei</i> gilisztafajban.....	17
3.1.1. Az antimikrobiális peptidekről általában.....	18
3.1.2. A lumbricin mint potenciális antimikrobiális peptid.....	18
3.2. Anyagok és módszerek.....	19
3.2.1. Kísérleti állatok tartása.....	19
3.2.2. RNS izolálás, cDNS szintézis és RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA ends).....	19
3.2.3. Szekvencia- és filogenetikai analízis.....	20
3.2.4. Coelomasejtek izolálása.....	21
3.2.5. A coelomasejtek szeparálása és áramlási citometria.....	21
3.2.6. Hematoxylin-eozin festés.....	21
3.2.7. RNS-izolálás, cDNS-szintézis és szemikvantitatív RT-PCR.....	21
3.2.8. Valós-idejű PCR különböző szöveti és embrionális mintákból.....	22
3.2.9. In vivo bakteriális és zymosan kezelés.....	22
3.2.10. Statisztikai analízis.....	23
3.3. Eredmények és megbeszélés.....	23
3.3.1. A Lumbr és LuRP szekvencia analízise, illesztése és filogenetikája.....	23
3.3.2. A Lumbr és LuRP mRNS szöveti expressziója és ontogenetikai kifejeződése.....	27
3.3.3. Eltérő mRNS expressziós mintázat az amoebocyta és eleocyta alpopulációk között.....	29
3.3.4. A Lumbr és LuRP mRNS indukciója in vivo bakteriális kezelés hatására.....	32

3.4. Konklúzió.....	33
Eredmények II. ....	34
4. A celluláris és humorális immunkomponensek szerepe az <i>Eisenia andrei</i> szöveti regenerációjában.....	34
4.1. Bevezetés.....	35
4.1.1. A regenerációs képesség filogenezise .....	35
4.1.2. A gyűrűsférgék regenerációja .....	36
4.1.3. A regeneráció és az immunrendszer kapcsolata .....	38
4.2. Anyagok és módszerek.....	39
4.2.1. A regenerációs kísérletek kivitelezése.....	39
4.2.2. Hisztokémia .....	40
4.2.3. Enzim hisztokémia .....	40
4.2.4. Sejtsztódás és sejthalál detektálása, immunfluoreszcencia.....	40
4.2.5. RNS-izolálás, reverz-transzkripció és valós-idejű PCR.....	41
4.2.6. Statisztikai analízis .....	41
4.3. Eredmények és megbeszélésük.....	42
4.3.1. Az anterior és posterior-vég regenerációs folyamatának morfológiai változásai ..	42
4.3.2. Az eleocyták és granuláris amoebocyták blastemába vándorlása az anterior és posterior-vég regenerációja során.....	43
4.3.3. A programozott sejthalál kinetikája és effektor coelomasejtek megjelenése a regenerációs blastémában .....	47
4.3.4. Az immunválaszban szerepet játszó gének mRNS expressziós változásai az anterior és posterior regeneráció folyamata során.....	49
4.4. Konklúzió .....	52
Eredmények III. ....	53
5. Evolúciósan konzervált stressz és immuntoxikológiai folyamatok: ezüst és arany nanopartikulumok <i>in vitro</i> kölcsönhatásának vizsgálata gerinctelen immunsejteken.....	53
5.1. Bevezetés.....	54
5.1.1. A nanorészecskék definíciója, és jellemzői.....	54
5.1.2. A nanopartikulumok, mint potenciálisan káros anyagok.....	54
5.1.3. Az arany és ezüst nanopartikulumok: általános jellemzők, kölcsönhatásuk biológiai rendszerekkel.....	55
5.1.4. Nanorészecskék és coelomasejtek interakciója <i>in vitro</i> .....	56
5.2. Anyagok és módszerek.....	57
5.2.1. Nanopartikulumok .....	57

5.2.2. Coelomasejtek izolálása és az <i>in vitro</i> kezelés körülményei .....	57
5.2.3. A dózis-hatás görbék alkalmazása és a további kísérletekben alkalmazott koncentrációk kiválasztása .....	58
5.2.4. Génexpressziós profil.....	58
5.2.5. A NP-ok körül kialakuló <i>ex-situ</i> protein korona összetételének vizsgálata .....	59
5.2.6. Fehérje szekréción mintázat .....	60
5.3. Eredmények és értékelésük .....	61
5.3.1. A koncentráció-függő citotoxicitást csak az AgNP-ok idézik elő, az AuNP nem ....	61
5.3.2. Az AgNP-ok hatása fajtól független és függő hatása a génexpresszióra.....	63
5.3.3. Idő- és kezelés-specifikus génexpressziós mintázatok vizsgálata .....	65
5.3.4. Az AgNP-ok kölcsönhatásba lépnek a lyseninekkal, és az expozíciós körülmények között szabályozzák ezek szekréciónját.....	68
5.4. Konklúzió.....	73
Új eredmények összefoglalása .....	75
Irodalomjegyzék.....	77
Publikációs lista.....	88
Köszönetnyilvánítás .....	93

## Rövidítések jegyzéke

AgNP: ezüst nanopartikulum

AMP: antimikrobiális peptid

A.U.: arbitrary unit (tetszőleges egység)

AuNP: arany nanopartikulum

BCR: B-sejt receptor

BrdU: 5-bromo-deoxyuridine

BSA: Bovine Serum Albumin (borjú szérum albumin)

CA: Korrespondencia-elemzés (Correspondence analysis)

CCF: Coeloma Citolitikus Faktor

CP: coeloma protein

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats (halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések)

DAPI: 4',6- diamino-2-phenylindoline (4',6- diamino-2-fenilindolin)

EC: effektív koncentráció

EFCC: *Eisenia* coelomocytes cluster

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid (etiléndiamin-tetraecetsav)

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

EGTA: Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (etilénglikol-tetraecetsav)

FBS: Fetal Bovine Serum (magzati szarvasmarha szérum)

FITC: Fluorescein isothiocyanate (fluoreszcein izothiociánát)

FSC: forward scatter (előre irányuló szóródás)

GMP: Guanine Monophosphate (guanin-monofoszfát)

IL: interleukin

LBSS: *Lumbricus* Balanced Salt Solution

LC: lethális koncentráció

LC-MS/MS: kombinált folyadékkromatográfiás tandem tömegspektrometria

LMA: Low Melting Agarose (alacsony olvadáspontú agaróz gél)

LPS: Lipopolysaccharide (lipopoliszacharid)

Lumbr: *Eisenia andrei* lumbricin

LuRP: *Eisenia andrei* lumbricin-rokon fehérje

mAb: monoclonal antibody (monoklonális antitest)

MAPK: Mitogen-activated protein kinase (mitogén aktivált protein kináz)

MyD88: Myeloid differentiation primary response 88

NMA: Normal Melting Agarose (normál olvadáspontú agaróz gél)

NOD: nukleotid-kötő és oligomerizációs domén

NP: nanopartikulum

PBS: Phosphate Buffered Saline (foszfát pufferolt sóoldat)

PCA: főkomponens-analízis (principal component analysis)

PCR: polimeráz-láncreakció

PRR: pattern recognition receptor (mintázat felismerő receptor)

RAG: rekombináció aktiváló gén

ROI: reaktív oxigén intermedierek

RPMI: Roswell Park Memorial Institute (médium)

RT: room temperature (szobahőmérséklet)

RT-PCR: reverz-transzkripció polimeráz-láncreakció

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (nátrium-dodecil-szulfát)

SOD: szuperoxid-dizmutáz

SSC: side scatter (oldalra irányuló szóródás)

TCR: T-cell receptor (T-sejt receptor)

TGF $\beta$ : Transforming Growth Factor Beta

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

7-AAD: 7-amino actinomycin D

## Összefoglalás

Az *Eisenia* gyűrűsféreg fajokat a toxikológiai kísérletek mellett az összehasonlító immunológiai és fejlődésbiológiai kutatásokban is alkalmazzák. Dolgozatom során ezt a három területet érintettük, de az evolúciósan konzervált, ősbibb, immunbiológiai folyamatokra fókuszáltunk egy gerinctelen modellorganizmus, *E. andrei* gilisztafaj alkalmazásával.

A munka első részében szerepel, hogy mRNS szinten azonosítottuk a *Lumbricus rubellus* gilisztafajban leírt lumbricin (antimikrobiális fehérje) két homológját *E. andrei*-ben, amelyek a prolin-gazdag aminosavak családjába tartozva nagyfokú szekvencia azonosságot mutatnak a rokon fajokban leírt lumbricinekkel. Szöveti szinten a legnagyobb mértékű mRNS-expressziós mintázatuk az előbélben volt megfigyelhető. Ellentétben az előzetes tanulmányokkal mindkét *lumbricin* homológ expressziója kimutatható volt a coelomasejtekben és az embrionális fejlődés során, illetve indukálhatónak bizonyultak a 48 órás *in vivo* Gram-pozitív bakteriális kezelést követően. Eredményeink alátámasztják a lumbricin fehérjék konzerváltságát az *Annelida* csoporton belül, illetve fontos szerepüket a homeosztázis fenntartásában.

A dolgozat második részében az *E. andrei* anterior és posterior regenerációja során a morfológiai változások mellett az immunbiológiai folyamatokat vizsgáltuk. Eredményeink alapján a coelomasejtek az újonnan képződő szegmensekbe vándorolnak és szerepük van a sikeres regenerációs folyamatban. Az immunválaszban résztvevő gének (mintázatfelismerő-receptorok és antimikrobiális fehérjék) túlnyomórészt csökkent mértékű mRNS-expressziós mintázatot mutattak az intakt állatokhoz viszonyítva. Az anterior/posterior regeneráció jellemzése során számos, karakterisztikus sejt,- és génszintű változást figyeltünk meg a gyűrűsférgek veleszületett immunválaszában, mely párhuzamba állítható más gerinctelenek regenerációjakor megfigyelt immunológiai változásokkal.

Végül a harmadik részben, a toxikológiai vonatkozásban két közeli rokon faj (*E. andrei* és *E. fetida*) coelomasejtjeinek érzékenységét tanulmányoztuk *in vitro*, eltérő biológiai szinteken ezüst (Ag) és arany (Au) nanopartikulum (NP) kezelést követően. Eredményeink alapján az AgNP már alacsony koncentrációban toxikus a sejtekre, és apoptózist indukáló tulajdonsággal rendelkezik, mely az AuNP-nál nem volt megfigyelhető. Emellett különbségeket figyeltünk meg a fajok között a génexpresszió szintjén és a NP-ok körül kialakuló biomolekuláris korona összetételében, melyek magyarázzák a kialakuló érzékenységbeli különbségeket. Eredményeink rávilágíthatnak arra, hogy milyen hatással lehetnek ezek a részecskék a magasabb rendű szervezetek immunrendszerére.

# 1. Általános bevezetés

## 1.1. Az immunrendszer törzspejlődése, röviden

A védekező mechanizmusok megjelenése, azaz az élő szervezetek integritásának megőrzése erősen összefügg a multicellularitás kialakulásával. A veleszületett immunrendszer ősi elemei és funkciói körülbelül 700 millió éve a szivacsoktól kezdve megfigyelhetők. A mintázatfelismerő receptorok, fagocitózis, RNS interferencia (RNAi) és az antimikrobiális fehérjék erős konzerváltságot mutatnak az evolúció során. Ezek az alapvető funkciók, nagyobb részt változatlanul maradtak fenn a filogenezis folyamán (Kvell és mtsai., 2007). Figyelemre méltó, hogy a prokarióta egysejtűk már kifejlesztettek egy adaptív mechanizmust (CRISPR/Cas rendszer), mellyel képesek védekezni virális kórokozókkal szemben (Barrangou és mtsai., 2007). A csalánozók törzsénél a mintázatfelismerő receptorok (Toll,- és NOD-szerű) és antimikrobiális fehérjék (pl. periculin-1, aurelin) mellett néhány fajban az ősi komplementrendszer (C3-komplement komponenshez hasonló molekulák) elemei is megtalálhatóak (Bosch, 2013). A hengeresférgek törzsénél (ebben a csoportban még nem alakult ki a valódi testüreg) a veleszületett immunrendszer hatékony védelmet biztosít a virális, bakteriális, és gombás fertőzésekkel szemben. Ebben az állatörzsből az RNAi komponensei reagálnak a vírusfertőzésekre, -az immunvédekezésben szerepet játszó-, konzervált jelátviteli útvonalak is ismertek (TGF $\beta$  és MAPK jelátvitel) (Ermolaeva és mtsai., 2014). A humorális és celluláris immunfolyamatok elsőként a gyűrűsférgek törzsében különülnek el (Engelmann és mtsai., 2004, részletezve ld. később). A puhatestűek esetében a sejtes és humorális komponensek mellett bizonyos fajokban már lokalizált immunszerveket találunk, emellett az egyedi variabilitású receptorok is megjelennek (Allam és Raftos, 2015; Castillo és mtsai., 2015). Az ízeltlábúak törzsében a rovarok (*Drosophila melanogaster*) immunválasza a legismertebb. Ebben a fajban kifejezett immunszerveket figyelhetünk meg, a funkcionálisan elkülönült hemocita altípusok (fagocitózis: plasmatocyták, melanizáció: kristály sejtek, enkapszuláció: lamellocyták) hematopoezise, leszármazási vonalai is jól ismertek, illetve ősi komplement-komponensek (opszoninok) is megfigyelhetők (Honti és mtsai., 2014; Nonaka, 2014). Az egyedi variabilitású felismerő receptorok a rovaroknál is megtalálhatóak. Nevezetesen, a humán Down-szindróma sejtadhéziós molekula (Dscam) *Drosophila* homológ cDNS és genomiális elemzésének során többféle immunglobulin (Ig) és transzmembrán doméneket tartalmazó variánsát tárták fel. Alternatív-splicing révén több mint 38000 Dscam izoforma jöhet létre, ezáltal a molekuláris sokféleség hozzájárulhat a neuronális kapcsolat



specifikusságához, illetve a hemocyták részéről a mikrobák megkötéséhez (Schmucker és mtsai., 2000, Watson és mtsai., 2005).

Az újszájúak fő törzsébe tartozó tüskésbőrűekben (*Echinodermata*) a celluláris immunitás fő alkotói a coelomasejtek különböző alpopulációi, míg a humorális immunfolyamatok részeként az antimikrobiális fehérjék mellett a komplementrendszer alternatív és mannóz-kötő lektin (MBL)-útvonalainak bizonyos komponensei is már ismertek (Smith és mtsai., 2001; Xue és mtsai., 2015). Az adaptív immunrendszer evolúciója szempontjából az előgerinchúrosok (*Urochordata*) altörzsének tagjai kiváló modellt biztosítanak. A csoportnál még nincs jelen a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC), de már leírták a „saját” és „nem saját” szövetek/egyedek felismerését. A telepeket képző, előgerinchúros fajokban kifejlődött egy egyszerű, de erősen változékony „hisztokompatibilitási/fúziobilitási” (Fu/HC) génlókusz, mely haplotípusának szövetekben történő expressziója lehetővé teszi az „egyedi idegenség” (allorecognition) elkülönítését (Petrányi és Gyódi, 2005). A sejtes immunitást a hemocyták különböző alpopulációi képviselik (szerepük a fagocitózisban és citotoxicitásban nyilvánul meg), míg a humorális immunfolyamatok magukban foglalják a komplementrendszer két útvonalának, az antimikrobiális fehérjéknek és az ősi citokineknek (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) az összehangolt működését (Nonaka és Satake, 2010; Dishaw és mtsai., 2016).

Megemlítendő még az állkapocs nélküliek vagy körszájúak (*Agnatha*) csoportja, melyek a legősibb gerincesek. Lymphocyta-szerű sejtek vannak jelen, melyek egyedi variábilis receptorokat expresszálnak (VLR: variábilis limfocyta receptor). Azonban nincsenek másodlagos nyirokszervek, nem ismert az Ig/BCR/TCR és MHC, ezért egy alternatív adaptív immunitás jelenlétéről beszélhetünk ezekben a fajokban (Kvell és mtsai., 2007; Flajnik, 2014).

Az antitest, TCR és MHC „szentháromságán” alapuló adaptív immunrendszer csak a gerincesekre (porcos halaktól – emlősökig) jellemzőek. Az adaptív immunrendszer legtöbb komponense, beleértve a diverz antigén-receptorokkal rendelkező limfocytákat, antitesteket és specializált limfoid szöveteket viszonylag rövid idő alatt fejlődtek ki az evolúció során (kb. 400 millió éve), és ezt a jelenséget nevezik az immunológiai „Big Bang”-nek. A folyamatban nagy szerepe volt a RAG-transzpozonnak, mert a BCR és TCR génátrendezés folyamatait szabályozó enzimeket kódoló RAG korai alakja, transzpozonként beépült az akkori állkapocsos gerincesek csírvonalába, így a porcos halaktól kezdve folyamatosan nő az adaptív immunreceptorok diverzitása (Flajnik, 2014).

## 1.2. A gerinctelenek élőlények, mint immunológiai modellszervezetek

Egy gerinctelen állat testfelépítését és élettanát vizsgálva módunkban áll megismerni a filogenezis folyamatait, általánosan előforduló, evolúciósan ősből jelenségek alapjait tárhatjuk fel, amelyek különböző fejlettségi szinten lévő állatcsoportokban is előfordulnak.

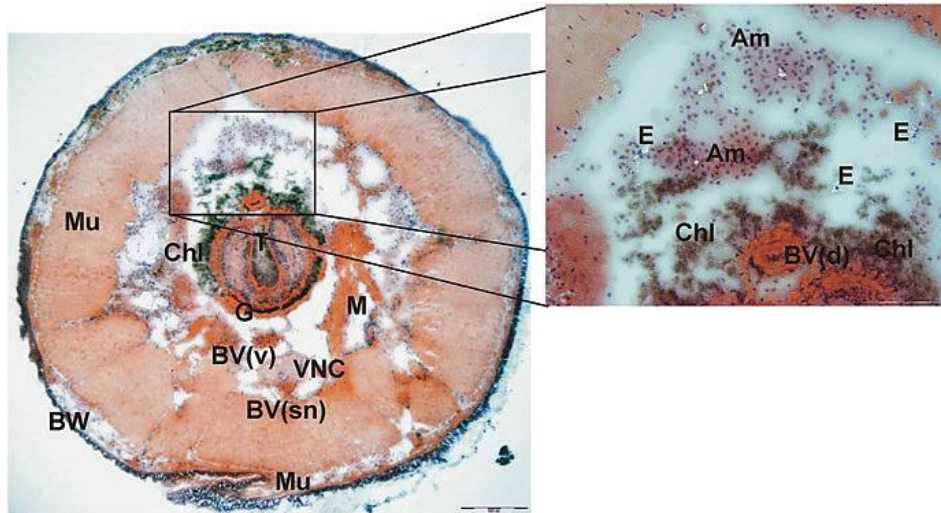
Számos gerinctelen modellállatot alkalmaznak a veleszületett immunitás elemzésekor, remélve, hogy részletesebben megismerik a gerincesek komplex immunválaszának kezdeti lépéseit. A gerinctelen állatokkal való kísérletes munkában előnyt jelent, hogy relatíve könnyen szaporíthatóak, a laboratóriumi tartásuk viszonylag egyszerű, és felhasználásuk – egyelőre – nem ütközik szigorú etikai akadályokba. Továbbá, a gerincteleneknél felfedezett aktív immunmechanizmusok jóval összetettebbek, mint azt korábban feltételezték (pl. az antimikrobiális peptidok termelése, koaguláció, fagocitózis és az enkapszulációs reakciók összehangolt működése) (Cooper és mtsai., 2002). Szintén nem régen vált ismertté, hogy a gerinctelen állatokban felfedezett mintázatfelismerő receptorok konzervált és speciális (gerinceseknél kevésbé ismert) jelátviteli útvonalakat is működésbe hozhatnak (Engelmann és mtsai., 2011, Ganesan és mtsai., 2011; Kuo és mtsai., 2018; Prochazková és mtsai., 2020).

## 1.3. Az *Oligochaeta* gyűrűsféreg immunrendszere

A kevésértéjű gyűrűsféreg (osztály: *Clitellata*; alosztály: *Oligochaeta*) elsősorban a környezeti toxikológiai kísérletekben alkalmazzák. A kísérletes felhasználás magyarázható azzal, hogy a talajlakó giliszták magas nehézfém-rezisztenciával rendelkeznek, illetve a nehéz-fémionok időleges tárolására és inaktíválására is képesek (Demuyneck és mtsai., 2007; Calisi és mtsai., 2009).

Az első, passzív védelmi réteget a bőrizomtömlő képezi, amely elhatárolja az állat szervezetét a külvilágtól. Felépítését tekintve egy epidermisz és egy vékony, mukopoliszacharidokat tartalmazó kutikula rétegből áll, emellett fehérjéket is tartalmaz, ezáltal antimikrobiális barrierként funkcionál. Az epidermisz egy egyrétegű, csillós hengerhámból, pontosabban támasztósejtekből, bazális és szekrécios mirigysejtekből épül fel. A bazális sejtek fontos szerepet játszanak a sérülések gyógyulása mellett a fagocitózisban is (Bilej és mtsai., 2010) (**1.3. ábra**). A törzsfajlás során ebben a gerinctelen állatcsoportban figyelhetjük meg először a celluláris és a humorális immunfolyamatok együttes működését (Cooper és mtsai., 2002; Engelmann és mtsai., 2004; Kvell és mtsai., 2007). A humorális immunfolyamatok nagy része a coelomafolyadékban zajlik, amely bizonyítottan proteolitikus, haemolitikus, antibakteriális, és citolitikus tulajdonságokkal (**1.5. táblázat**) rendelkezik (Bilej

és mtsai., 2000; Cooper és mtsai., 2002; Bodó és mtsai., 2019). Az *Oligochaeta* gyűrűsférgek coelomafolyadéka a molekuláris összetevők mellett celluláris komponenseket is tartalmaz, az ún. coelomasejteket. Ezek a sejtek morfológiailag és funkcionális szempontból is analógiát mutatnak a gerincesek fehérvérsejtjeivel (Engelmann és mtsai., 2016a).

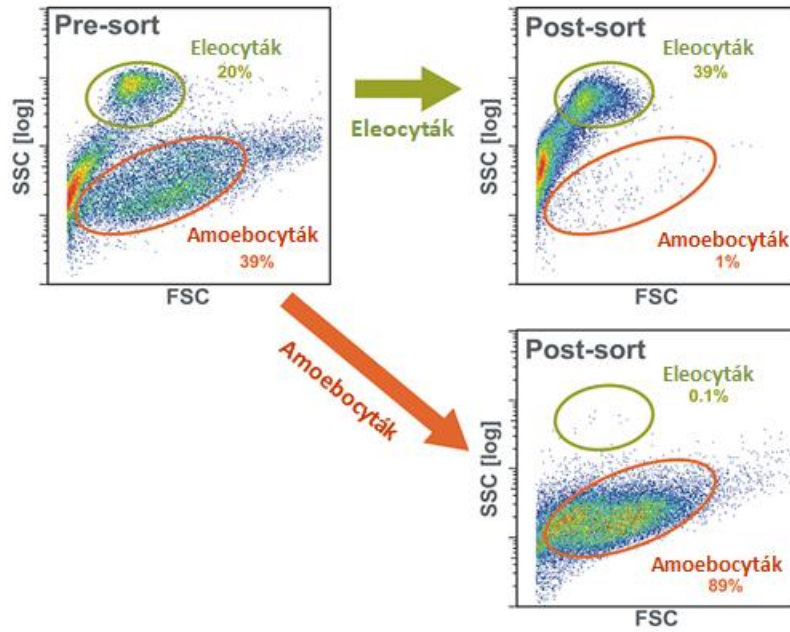


**1.3. ábra.** Az *E. andrei* földigiliszta keresztmetszete. A képen fő szervek és szövetek elhelyezkedése lett jelölve. A nagyított kép a coelomaüregben elhelyezkedő coelomasejtek különböző populációit (amoebocyták és eleocyták) mutatja. Méretarány: 500  $\mu\text{m}$  (fő kép) és 200  $\mu\text{m}$  (nagyított kép). Am amoebocyták, BW testfal, BV (d) dorzális vérér, BV (sn) szubneurális vérér, BV (v) ventrális vérér, Chl chloragocyták, E eleocyták, G bél, M metanephridium, Mu izomréteg, VNC ventrális idegkötég (Engelmann és mtsai., 2018).

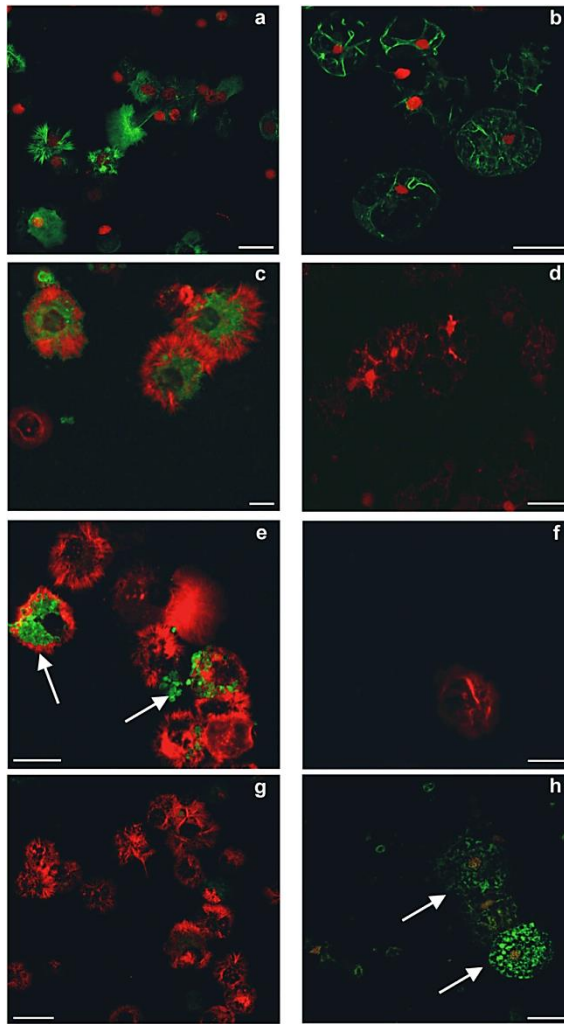
#### 1.4. A coelomasejtek alcsoportjai és a mintázatfelismerés

A coelomasejtek különböző alcsoportjai számos funkcióval rendelkeznek, amelyek közül a legfontosabbak a fagocitózis, enkapszuláció és a celluláris citotoxicitás. A sejtek leszármazási vonalai részleteiben nem tisztázottak, több kutató úgy véli, hogy a sejtek a coelomaüreg epitheliális vonalából, a splanchnopleurából származnak (Biliej és mtsai., 2010).

Számos, az *Oligochaeta* alosztályba tartozó fajnak (pl: *Dendrobaena veneta*, *Allolobophora chlorotica*) vizsgálták már a coelomasejtjeit, azonban tényleges szerepükre vonatkozó legtöbb adat a földigilisztából (*L. terrestris*) és az *Eisenia* fajokból (*E. andrei* és *E. fetida*) (Adamowicz, 2005, Kurek és mtsai., 2007, Engelmann és mtsai., 2016a) származik. A coelomasejtek jellemzése kezdetben klasszikus fény és elektronmikroszkópos módszerekkel történt (Valembos és mtsai., 1992), a ma használatos, egyszerűbb csoportosítás alapján (áramlási citometria és monoklonális ellenanyagok alkalmazása) a coelomasejteknek-eredetük és morfológiájuk alapján- két nagyobb alpopulációja különíthető el (1.4.1. és 1.4.2. ábra). Ezek az amoebocyták (ezen belül hyalin és granuláris sejtek) és az eleocyták.



**1.4.1. ábra.** A coelomasejt-alcsoportok szortolás előtti (pre-sort),- és szortolás utáni (post-sort) eloszlása. Áramlási citometriával jól elkülöníthető a coelomasejtek két fő populációja (amoebocyták és eleocyták) nagyság (FSC) és granularitás (SSC) alapján. A szortolt alpopulációk tisztasága hagyományos áramlási citometriás méréssel lett ellenőrizve. Az intakt eleocyták alacsony százalékos aránya valószínűleg a chloragoszómák felszabadulása miatt alakul ki, amelyek megjelennek az alacsonyabb FSC és SSC értékekben is (Engelmann és mtsai., 2016a).



**1.4.2. ábra.** Phalloidin-jelölt és anti-EFCC monoklonális antitesttel (mAb) festett coelomasejt alcsoportok konfokális képalkotás alapján. Először a szeparált amoebocyták (**a**) és eleocyták (**b**) csak Phalloidin-Alexa 488 konjugátummal lettek jelölve (propidium-jodid nukleáris festés). A kettős jelölés esetén a Phalloidin-Alexa 568 festést a FITC-konjugált anti-EFCC3 mAb követte a szeparált amoebocytákon (**c**) és eleocytákon (**d**). Az amoebocyták (hyalin alcsoport) mutattak pozitív reakciót. A következőkben a szeparált amoebocyták (**e**) és eleocyták (**f**) frakciói Phalloidin-Alexa 568 jelöléssel illetve anti-EFCC4 mAb-tel lettek vizsgálva. A jelölt granulás amoebocyták (nyilak) megkülönböztethetőek a festetlen hyalin amoebocytáktól. Egy másik lépésben az amoebocyták (**e**) és eleocyták (**f**) a Phalloidin-Alexa 568 festést követően anti-EFCC5-FITC (lysenin specifikus) mAb-tel lettek jelölve. Méretarány: 10  $\mu\text{m}$  (**c**) and 20  $\mu\text{m}$  (**a, b, d-h**) (Engelmann és mtsai., 2016a).

Korábban vizsgáltuk az amoebocyták és eleocyták kölcsönhatásait FITC-konjugált *Escherichia coli* és *Staphylococcus aureus* baktériumok 24 órás *in vitro* inkubációját követően, amely alapján megállapítottuk, hogy az amoebocyták szignifikánsan több baktérium bekebelezésére voltak képesek, mint az eleocyták (Engelmann és mtsai., 2016a). Ezek alapján a granulás és hyalin amoebocyták a celluláris immunmechanizmusok (fagocitózis és enkapszuláció) résztvevői. Ezek az effektor sejtek különböző mintázatfelismerő receptorokat (PRR) is expresszálnak (Prochazková és mtsai., 2020). Jellegzetes egyedi mintázatfelismerő receptor a coeloma cytolitikus faktor (CCF) (Beschin és

mtsai., 1998), a lipopoliszacharid-kötő fehérje (LBP) és a bakteriális permeabilitást fokozó protein (BPI) *Eisenia* gilisztákban leírt homológja (*Ea* LBP/BPI) (Škanta és mtsai., 2016). Nemrég sikerült azonosítani a TLR *Eisenia* illetve *Lumbicus* fajokban leírt homológjait is (Škanta és mtsai., 2013, Fjøsne és mtsai., 2015, Procházková és mtsai., 2020). Korábbi vizsgálataink bizonyították, hogy számos gén expressziója eltér a két alpopuláció között. Több PRR, immunológiai, - és oxidatív-stressz rokon gén expressziója (*CCF*, *TLR*, *lumbricin*, *LuRP*, *MyD88*, *Cu/Zn SOD*, *MnSOD*) csak az amoebocyta populációban nyilvánult meg. Más immunológiai folyamatokban résztvevő, antimikrobiális hatású vagy bioaktív molekula (*lizozim*, *lysenin*), illetve lizoszómális hidrolázok (*cathepsin L* és *cathepsin C*) mRNS expressziója az eleocytákban is kimutatható volt (Bodó és mtsai., 2018, ld. az eredmények I. fejezetében).

A chlorogogén sejtek jellegzetesen a középbél felszínén képeznek egy kiterjedt, sárgás pigmentű sejtréteget. Endogén (pl.: glikogén és lipidek) illetve exogén (pl.: pigmentek (pl.: riboflavin) vagy fémek) anyagok tárolására is alkalmasak. A typhlosolis redőben is jelen vannak, de a coelomaüregben már előregedett formában fordulnak elő, ezek az ún. eleocyták (amelyek szabadbá vált chlorogogén sejtek) (Jamieson és mtsai., 1981). A riboflavin tartalom miatt az egyes fajokban a chlorogogén sejtek/eleocyták erős autofluoreszcenciát mutatnak (pl.: *D. veneta*, *E. fetida*) de az autofluoreszcencia a *Lumbricus* fajokra kevésbé jellemző (Rorat és mtsai., 2014). A chlorogogén sejtek/eleocyták lizoszómális rendszerük révén detoxifikáló szereppel bírnak, továbbá ezeknek a testüregi sejteknek tulajdonítják a haemoglobin szintézisét, a pH egyensúly és az isohydria állapotának fenntartását és számos, immunfolyamatokban is hatékony szereppel bíró fehérje termelését (Homa, 2018). Enzim aktivitásuk széleskörűnek mondható, nem specifikus észteráz, foszforiláz, alkalikus foszfatáz, peroxidáz, kataláz termelésére és lítikus reakciókra is képesek (Stein és mtsai., 1977; Stein és Cooper 1978; Engelmann és mtsai., 2016a). Az eleocyták legfontosabb feladata, hogy hozzájárulnak a homeosztázis fenntartásához és lysenin-szekréciónak révén résztvesznek a humorális immunológiai folyamatokban (Engelmann és mtsai., 2004; Engelmann és mtsai., 2011; Engelmann és mtsai., 2016ab).

A coelomasejteket a veleszületett immunválaszban meghatározott szerepük révén tekintjük fontos komponenseknek. Változatos funkciójuk, a fagocitózisban betöltött szerepük miatt makrofág-szerű sejteknek mondhatók, emellett funkciójukat tekintve antimikrobiális peptid szekréciónak és célsejtekkel szembeni lítikus reakciókra képesek (Engelmann és mtsai., 2016b).

## 1.5. A humorális komponensek csoportosítása

A gyűrűsféreg humorális immunválaszának jellegzetes komponensei a szekretált citolítikus molekulák. A coelomafolyadék citolítikus hatása általánosan bizonyított különböző célsejteken: pl. erythrocytákon ill. sejtvonalakon is (Bilej és mtsai., 2000, Engelmann és mtsai., 2004). A haemolizinek többsége haemagglutinációs tulajdonsággal bír, azonban bakteriosztatikus hatással is rendelkeznek (Valembois és mtsai., 1982). A humorális immunválasz többnyire a fenoloxidázok/peroxidázok (Valembois és mtsai., 1991), lizozim (Lassalle és mtsai., 1988), agglutinin (Stein és Cooper, 1988), lumbricin (Cho és mtsai., 1998) és a fetidin/lysenin szintézisével zajlik (Roch és mtsai., 1981; Milochau és mtsai., 1997).

Molekula neve	Funkció	Molekula súly	Termelőds	Előfordulás helye
<i>Fetidin/ Lysenin fehérje család</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- haemolítikus peroxidáz aktivitás</li> <li>- kötődés a sphingomyelinhez, lízist indukál</li> <li>- bakteriosztatikus, mennyiségük nő a patogén baktériumok beinjektálása után</li> <li>- simaizom összehúzódás patkányoknál</li> <li>- membránkárosítás</li> </ul>	40 kDa 41 kDa 45 kDa	chloragocyták	coelomafolyadék
<i>Eiseniapore (EP)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- citolítikus aktivitás</li> <li>- kötődés a sphingomyelinhez (vörösvértestek galaktosyl-ceramidjához kötődik, lízist indukál)</li> </ul>	38 kDa	coelomasejtek	coelomafolyadék
<i>Haemolizinek (H1, H2, H3)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- lízis és agglutináció (haemolízis)</li> </ul>	46 kDa 43kDa 40 kDa	coelomasejtek	egész állatban
<i>Lumbricin</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prolin gazdag antimikrobiális fehérje, széles hatásspektrummal</li> </ul>	-7-8 kDa	egész állat	egész állat

1.5. táblázat. A humorális immunkomponensek tulajdonságai

## 2. Célkitűzések

A kevésértéjű gyűrűsféregek közé tartozó *E. andrei* gilisztafaj viszonylag gyakran alkalmazott modellszervezet az összehasonlító immunológiai, fejlődés- és regeneratív-biológiai illetve toxikológiai tanulmányokban. Dolgozatomban, három külön fejezetben ismertetve ezen fő területek kerültek a középpontba, részben, vagy teljesen új célkitűzéseket megfogalmazva. Közös mindegyik fejezetben, hogy a hangsúly az evolúciósan konzervált, immunbiológiai folyamatokra koncentrálódik.

1. A lumbricin nevű antimikrobiális peptidet először *L. rubellus* gilisztafajban azonosították, azóta a lumbricin homológjait már számos gyűrűsféreg fajban leírták (pl. *Hirudo medicinalis*). A közeli rokonság miatt feltételeztük a gén expresszióját *E. andrei* fajban, ezért **fő célunk volt a lumbricin homológjának azonosítása, filogenetikai elhelyezése, és mRNS expressziójának meghatározása** felnőtt állatok **különböző szöveteiben** és az **ontogenezis** során. Emellett vizsgáltuk a **lumbricin mRNS expressziójának kinetikáját eltérő *in vivo* patogén (bakteriális, gomba) kezelésekre hatására.**

2. A regenerációs képesség egy evolúciósan ősi tulajdonságnak számít. A regeneráció morfológiai lépései ma már jól ismertek, azonban az immunválasz szerepe a folyamatban, részleteiben még nem tisztázott. Az *E. andrei* giliszták intenzív regenerációs képességgel rendelkeznek, de napjainkig az alapvető, embrionális fejlődés mechanizmusában is nélkülözhetetlen folyamatok (pl. sejtosztódás és sejthalál) pontos leírása sem történt meg. Ezért **célunk volt a regeneráció folyamatában a sejtosztódás és sejthalál együttes kimutatása, illetve a veleszületett immunrendszer celluláris (coelomasejt alcsoportok) elemeinek vizsgálata és a humorális folyamatokban részt vevő faktorok (pl. lumbricin, lysenin) mRNS expressziójának vizsgálata.**

3. A toxikológiai vonatkozásban két közeli rokon (*E. andrei* és *E. fetida*) faj coelomasejtjeinek érzékenységet vizsgáltuk eltérő biológiai szinteken nemesfém (Ag és Au) NP kezelést követően. **Céljaink között szerepelt eltérő módszerek alkalmazásával a lethális NP-kezelésekre adott oxidatív stressz, apoptotikus válasz és DNS-károsodás kimutatása. A szublethális koncentrációk alkalmazásával vizsgálni kívántuk a két faj közötti a gén,- és fehérje expresszió szintjén, ill. a protein korona összetételében megnyilvánuló különbségeket.** A dolgozatomban a szublethális koncentrációkhoz tartozó, az antimikrobiális fehérjékkel kapcsolatban lévő eredmények kerültek részletes ismertetésre.



## *Eredmények I.*

### **3. Új, lumbricin-homológok azonosítása *Eisenia andrei* gilisztafajban**

A téma alapjául szolgáló publikációk:

Engelmann P., Hayashi Y., **Bodó K.**, Ernszt D., Somogyi I., Steib A., Orbán J., Pollák E., Nyitrai M., Németh P., Molnár L.(2016a). 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.

Engelmann P., Hayashi Y., **Bodó K.**, Molnár L. (2016b). New aspects of earthworm innate immunity: novel molecules and old proteins with unexpected functions. In: Ballarin L, Cammarata M (eds.) Lessons in immunity: from single cell organisms to mammals. Elsevier-Academic Press, New York Amsterdam, pp. 53-66.

**K. Bodó**, D. Ernszt, P. Németh, P. Engelmann. (2018). Distinct immune- and defense-related molecular fingerprints in separated coelomocyte subsets in *Eisenia andrei* earthworms. *ISJ*.**15**, 338-345.

**K. Bodo**, A. Boros, E. Rumpler, L. Molnar, K. Borocz, P. Nemeth, P. Engelmann. (2019). Identification of novel lumbricin homologues in *Eisenia andrei* earthworms. *Dev. Comp. Immunol.* **90**, 41-46.

### 3.1. Bevezetés

#### 3.1.1. Az antimikrobiális peptidekről általában

A veleszületett immunrendszer humorális elemei közé tartozó, evolúciósan konzervált antimikrobiális peptidek (AMP) termelődése már a törzsfajlás korai szakaszában megfigyelhető. Mostanáig több ezer AMP-et azonosítottak az egysejtűektől az emlősök osztályáig (Zasloff, 2002). Kationos (pozitívan töltött) szerkezetük révén ezen peptidek széles körű antimikrobiális hatást mutatnak a Gram-pozitív-, és negatív baktériumok, gombák, egysejtűek és vírusok ellen, emellett néhány AMP az immunmodulátor hatásáról is ismert (Nguyen és mtsai., 2011). Az AMP gének az evolúció során rendkívül gyorsan evolválódtak, és általánosságban kevesebb, mint 150 aminosavból épülnek fel. Másodlagos szerkezetük alapján 4 csoportba oszthatók ( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -lemez, hurokba rendeződő és kiterjedt peptidek) (Zasloff, 2002; Bulet és mtsai., 2004; Nguyen és mtsai., 2011). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy antimikrobiális aktivitásuk nagymértékben függ az aminosav-összetételtől és a fizikai-kémiai tulajdonságaiktól: a kationos felületüktől, a pozitív nettó töltésüktől és az amfipaticitástól, valamint a mikroorganizmusok membrán lipid elrendezésétől (Cunha és mtsai., 2017), emellett hatásmechanizmusuk nem csak a pórus formációra és membrán permeabilizációra korlátozódik. Számos AMP rendelkezik sejten belüli célmolekulákkal, emellett képesek befolyásolni a legfontosabb metabolikus folyamatokat is, amely végül a sejt halálához vezet (Hale és Hancock, 2007, Nicolas, 2009).

#### 3.1.2. A lumbricin mint potenciális antimikrobiális peptid

A gerinctelen organizmusok, mint például a giliszták összehangolt, veleszületett sejtes és humorális immunkomponensekkel őrzik meg integritásukat. A lumbricint elsőként a *Lumbricus rubellus* gilisztafajban azonosították (Cho és mtsai., 1998), azóta homológjait már számos gyűrűsféreg fajban megtalálták (*Metaphire tschilliensis*, *M. guillelmi*, *Hirudo medicinalis*). Több tanulmány alátámasztotta, hogy a lumbricin és ortológjai széleskörű antimikrobiális hatással rendelkeznek a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, illetve gombákkal szemben, de haemolitikus aktivitásukat nem jegyezték fel. Előzetes munkák alapján a *lumbricin* gén számos szövetben mutatott, nem indukálható mRNS expressziót (azonban coelomasejtekből nem azonosították). A *L. rubellus* gilisztafaj embrionális fejlődése során a lumbricin mRNS expresszióját nem figyelték meg (Wang és mtsai., 2003; Schikorski és mtsai., 2008; Li és mtsai., 2011).

Ezek a tanulmányok alátámasztották a peptid parallel előfordulását az *Annelida* csoport számos fajánál. Mostanáig három, széles hatás spektrumú biológiai aktivitással járó antimikrobiális faktort, köztük a lizozimet (Josková és mtsai., 2009), a lysenin/fetidin molekulacsaládot (Bilej és mtsai., 2000; Engelmann és mtsai., 2004) írták le *E. andrei* földgilisztában, és az antimikrobiális hatást főleg ezeknek a fehérjéknek tulajdonították, azonban *E. andrei* gilisztánál a *lumbricin* expressziója még nem bizonyított. Munkánk célja volt a lumbricin homológjának azonosítása és karakterizálása, szöveti és ontogenetikai megoszlása, illetve *in vivo* patogén indukció hatásának vizsgálata coelomasejteken, *E. andrei* gilisztafajban.

## **3.2. Anyagok és módszerek**

### **3.2.1. Kísérleti állatok tartása**

Kísérleteink során ivarérett *E. andrei* (*Lumbricidae*, *Annelida*) gilisztákat használtunk. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Állatszervezettani és Fejlődésbiológiai Tanszékének tenyészetéből szereztük be, a tartásuk standard laboratóriumi körülmények között történt (Molnár és mtsai., 2012). A kísérletek megkezdése előtt 24 órával a kiválogatott állatokat csapvízzel nedvesített papírvattára helyeztük át, hogy bélcatornájukból a talajszemcsék kiürüljenek. A kísérletek kezdete előtt az állatokat vízzel öblítettük le, hogy semmilyen szennyeződés ne kerüljön az izoláló pufferbe.

### **3.2.2. RNS izolálás, cDNS szintézis és RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA ends)**

Elsőként a totál RNS izolálása (NucleoSpin® RNA isolation kit, Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) a coelomasejtekből és az idegrendszerből történt meg a gyártó által megadott protokoll alapján. A későbbiekben a totál RNS izolálása a különböző giliszta szövetekből és az eltérő stádiumú embriókból– Potter homogenizálást követően- hasonló módon történt. Az RNS NucleoSpin-membránról való eluálását követően a minták tisztaságát és az RNS-koncentrációját NanoDrop készülékkel és 1 %-os agaróz gélen való futtatás során ellenőriztük. Az RNS minták tárolása -80 °C-on történt.

A cDNS készítés előtt a RNS nagyobb tisztaságára törekedve DNáz emésztést (Amplification Grade DNase I; Sigma-Aldrich) végeztünk (paraméterek: 25 °C, 15 perc és 72 °C10 perc) a megadott protokoll alapján. A következő lépésben a DNáz emésztésen átesett totál RNS-t használtuk fel a cDNS készítéshez, amelyhez High Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit-et (Thermo Scientific) alkalmaztunk a megadott protokoll alapján. A reakció végtérfogata összesen 20  $\mu$ l volt. A cDNS minták tárolása  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt.

A 3'RACE PCR-hoz a reverz transzkripció során kapott cDNS-eket és Adapter-oligo-dT-anchor primert alkalmaztunk (lásd a „Mellékletekben”, a releváns publikációban: Bodó és mtsai., 2019; S1 Táblázat). Az RNase-H emésztést követően 3'RACE PCR reakciót végeztünk adapter primer és generikus forward primer alkalmazásával (Bodó és mtsai., 2019), amelyek az ismert lumbricin szekvenciák (*L. rubellus*: AF060552; *H. medicinalis*: EU156756) konzervált régióira lettek tervezve. Az 5'RACE PCR-hoz szekvencia specifikus reverz primereket (R1) terveztünk az adatbázisban elérhető lumbricin szekvenciák alapján (Bodó és mtsai., 2019). A reverz transzkripciót és RNase-H emésztést követően a cDNS 3'-végére poly-A véget állítottunk elő terminális deoxinukleotidil-transzferáz enzim és dATP alkalmazásával (Boros és mtsai., 2011). Ezt követően, a már poly-A véget tartalmazó cDNS-t tisztítottuk (GeneJet PCR tisztító kit, Thermo Scientific), majd semi-nested PCR reakciókat végeztünk szekvencia specifikus R2 (PCR1) és R3 (PCR2) reverz primerek, illetve oligo-dT anchor (PCR1) és adapter (PCR2) forward primerek alkalmazásával (Bodó és mtsai., 2019). Az 5' és 3' RACE PCR reakciók során a termális profil paraméterei a következők voltak: 1 ciklus  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 30 sec, amelyet 35 ciklus követett  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 35 másodperc,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 1 perc,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 2 perc, illetve a termináció a végső elongációs lépéssel  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (5 perc) fejeződött be. A PCR amplikonok visszanyerése GeneJet PCR tisztító kit vagy GeneJet PCR extrakciós kit (Thermo Scientific) alkalmazásával történt, majd az amplikonokat direkt szekvenáltuk a megadott protokoll alapján (Sanger és mtsai. 1977) (ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems) BigDye Terminator szekvenáló kit (Applied Biosystems) segítségével. A kapott szekvenciák (Ea-lumbricin (Lumbr): KX816866 és Ea-Lumbricin-related peptide (LuRP): KX816867) megtalálhatóak az NCBI Genbank adatbázisban.

### **3.2.3. Szekvencia- és filogenetikai analízis**

A szekvencia homológiák kimutatása céljából BLAST analízist végeztünk. A különböző fajokból származó lumbricin-homológ aminosav szekvenciák illesztését a Clustal Omega programmal hajtottuk végre (Sievers és Higgins, 2014). A Lumbr és LuRP aminosav összetétele, becslt molekulásúly,- és a teoretikus izoelektromos pontjainak megállapítása a ProtParam és a Compute pI/Mw tool (ExPASy) programok segítségével történt. Az aminosavak rendezetlenségének becslése és a másodlagos szerkezetek létezésének megállapítása céljából a PrDOS és CFSSP programokat alkalmaztuk (ExPASy). A szignál

peptid analízist a SignalP program segítségével hajtottuk végre. A filogenetikai analízist a „legnagyobb valószínűség” módszer és a Poisson model alapján végeztük el (Kumar és mtsai., 2016) (maximum lépték: 1000).

#### **3.2.4. Coelomasejtek izolálása**

A coelomasejtek kinyerésére izoláló puffert (71,2 mM NaCl; 5 mM EGTA; 50,4 mM guaiacol glycerylether; 5 %-os ethanol; pH: 7,3) alkalmaztunk (Engelmann és mtsai., 2005). Az alkoholtartalmú izoláló puffer hatására a giliszták a dorzális pórusokon kibocsájtják a coelomasejteket tartalmazó coelomafolyadékot. Ezek után a mintákat LBSS pufferrel (71,5 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,1mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4,2mM NaHCO<sub>3</sub>; pH:7,3) kétszeres térfogatra hígítottuk, és centrifugáltuk (100 RCF, 5perc), majd a felülúszót leöntöttük. Az élő coelomasejtek számát tripánkék festékkizárási módszerrel határoztuk meg.

#### **3.2.5. A coelomasejtek szeparálása és áramlási citometria**

Az izolált coelomasejteket LBSS-ben reszuszpendáltuk, majd az aggregáció elkerülésének céljából 1 % FBS-t (Biowest, Nuaille, France) és 5 mM EDTA-t (Sigma-Aldrich) adtunk a szuszpenzióhoz. A coelomasejteket fizikai paramétereik, a nagyság és granularitás (FSC/SSC) figyelembe vételével szeparáltuk. A szortolást FACS Aria III (BD Biosciences) készüléssel végeztük a már korábban alkalmazott módszer alapján (Engelmann és mtsai., 2016a; Bodó és mtsai., 2018). A szeparálás hatékonyságát és a coelomasejtek életképességét 7-amino-actinomycin D (7-AAD) fluoreszcens festékkal ellenőriztük FACSCalibur áramlási citométeren.

#### **3.2.6. Hematoxylin-eozin festés**

A szortolt coelomasejt alcsoportokat (80 µl of 5 x 10<sup>5</sup>/mL) tárgylemezre ülepítettük Cytospin 3 (SHANDON, Thermo Scientific) készülék alkalmazásával. Száradást követően hematoxylin-eozin festést alkalmaztunk standard protokoll alapján.

#### **3.2.7. RNS-izolálás, cDNS-szintézis és szemikvantitatív RT-PCR**

A totál RNS izolálása a szeparálatlan coelomasejtekből, illetve szortolt amoebocytá és eleocytá alcsoportokból a már említett NucleoSpin® RNS izoláló kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) alkalmazásával történt a megadott instrukciók alapján. Az RNS-mennyiséget NanoDrop készülékkel 260 nm-en határoztuk meg, az RNS mintákat -80 °C-on

tároltuk. Közvetlenül a DNáz-emésztést (Sigma-Aldrich) követően a reverz-transzkripciót 20 µL végtérfogatban végeztük el High Capacity cDNS Reverz Transzkripció Kit (Thermo Scientific) segítségével. Ezt követően az elkészült cDNS-eket használtuk fel templátként a PCR reakciókban. A gén specifikus primerek tervezése a Primer Express Software (Thermo Fisher Scientific) segítségével (lásd a „Mellékletekben”, a releváns publikációban: Bodó és mtsai., 2018) történt. A PCR során a következő paramétereket alkalmaztuk: elődenaturációs lépés 95 °C-on 10 percig, amit 35 ciklusban követett a denaturációs lépés 95 °C-on 35 másodpercig, annealing vagy kapcsolódás 54 °C-on 30 másodpercig és elongáció vagy meghosszabbítás 72 °C-on 30 másodpercig. Az amplifikációs ciklusokat egy végső extenzióval fejeztük be (72 °C-on 10 perc). Végül a PCR-termékeket 1 % (w/v) agaróz-gélen futtattuk és vizualizáltuk GelRed (Biotium, CA, USA) festék alkalmazásával. A képek készítése a GelDoc XR rendszer (BioRad, Hercules, CA, USA) segítségével történt.

### **3.2.8. Valós-idejű PCR különböző szöveti és embrionális mintákból**

A totál RNS izolálása a különböző giliszta (10 egyed) szövetekből (bőrizomtömlő, gyomor, garat, középbél, metanephridium, petefészek, ondóhólyag, idegrendszer, coelomasejtek) történt. A giliszta embriókat a kokonokból gyűjtöttük. A különböző fejlődési stádiumokat (E1-E4) a morfológiai jellegzetességek alapján határoztuk meg (Boros és mtsai., 2010). A totál RNS kinyerése és a cDNS-szintézis az összegyűjtött szövetekből és a 10 embrióból (mindegyik fejlődési stádium) a már említett NucleoSpin® RNS izoláló kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) és HighCapacity cDNS Reverz Transzkripció Kit (Thermo Scientific) segítségével zajlott. Az elkészült cDNS-t közvetlenül használtuk templátként a valós-idejű PCR (qPCR) reakciókban. A génspecifikus primerek tervezése a Primer Express Software (Thermo Fisher Scientific) segítségével (Bodó és mtsai., 2019) történt.

A valós-idejű gén expressziós változások mérése Maxima SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) használatával, egy ABI Prism 7500 készüléken (Applied Biosystems) zajlott. Az amplifikációs profil elő-denaturálás lépése 95 °C-on kezdődött, amely 10 percig tartott. Ezt 40 cikluson keresztül követte: a denaturáció (95 °C-on 35 másodperc), a primerek hibridizálása (58 °C-on 35 másodperc), és az elongáció (72 °C-on 1 perc). A kvantitatív méréseket az *RPL17* gén (Bodó és mtsai., 2019) mRNS-szintjéhez normalizáltuk. Három független mérést végeztünk, duplikált technikai ismétléssel.

### **3.2.9. *In vivo* bakteriális és zymosan kezelés**

Az *in vivo* kezelések során az *E. andrei* gilisztákat (3 példány/kondíció) több különböző időtartamban (12, 24, 36 és 48 óra) tartottuk szűrőpapíron (RT, sötétben) (Homa és mtsai., 2004; Cang és mtsai., 2017), melyeket Gram-negatív (*Escherichia coli* ATCC 25922), Gram-pozitív (*Staphylococcus aureus* OKI 112001) baktériummal ( $1 \times 10^8$  CFU) (Liu és mtsai., 2009) vagy zymosan-nal (*Saccharomyces cerevisiae* sejtalkivonat 1 mg/mL végső koncentráció, Sigma-Aldrich) (Schikorski és mtsai., 2008; Liu és mtsai., 2009) kezeltünk. A mikroorganizmus-szuspenziót és a zymosan-t LBSS-ben hígítottuk. A kontroll állatokat csak LBSS-sel átitatott szűrőpapíron tartottuk. A kezelés végeztével a coelomasejteket a már korábban leírt módon nyertük ki az állatokból (Engelmann és mtsai., 2005), majd a totál RNS-extrakciót és reverz-transzkripciót követően az *Lumbr* és *LuRP* mRNS expresszióját valós- idejű PCR segítségével detektáltuk.

### 3.2.10. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket a Prism v5.0. (GraphPad szoftver, La Jolla, CA, USA) szoftver segítségével hajtottuk végre. Az adatokat három független mérés alapján határoztuk meg. Az analízisek előtt elsőként az adatok normál eloszlását ellenőriztük (Shapiro-Wilk normalitási test) és eredményeink átlagát ( $\pm$ SEM) ábráztuk. Az eredményeket egy,- vagy kétutas ANOVA-val, Bonferroni post-hoc teszt segítségével elemeztük. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 3.3. Eredmények és megbeszélés

### 3.3.1. A *Lumbr* és *LuRP* szekvencia analízise, illesztése és filogenetikája

A gyűrűsférgék hatékony védekező rendszerrel rendelkeznek a környezeti kórokozókkal szemben. A törzsfajlás során ennél az állatcsoportnál figyelhető meg elsőként a humorális és celluláris immunfolyamatok szoros együttműködése.

A veleszületett immunrendszer humorális elemei közé tartozó AMP-ek termelődése már az egysejtűektől kezdve számos állat- és növénycsoportra jellemző. Azonban a gyűrűsférgék esetében az AMP-kről kevés adattal rendelkezünk (Tasiemski, 2008; Bruno és mtsai., 2019). Cho és mtsai., (1998) azonosították elsőként a lumbricint (lumbricin-I) *L. rubellus* gilisztafajban, melynek már számos homológját írták le más giliszta fajokban (a PP-1 a *M. tschiliensis* fajból, és a lumbricin-PG a *M. guillelmi* fajból származik) és az orvosi piócából (*Hm-lumbricin*, *H. medicinalis*) (Wang és mtsai., 2003; Schikorski és mtsai., 2008; Li és mtsai., 2011). Munkánk során fő célul tűztük ki a lumbricin homológjának azonosítását *E. andrei* fajban. Az elérhető lumbricin szekvenciák alapján egy degenerált, forward primert

terveztünk, hogy detektálni tudjuk a lumbricin homológját *E. andrei*-ben 3'-RACE PCR segítségével (ld. a releváns publikációban, Bodó és mtsai., 2019), azonban meglepő módon nem egy, hanem két diszkrét sávot kaptunk a 3'-RACE PCR eredményeként (Bodó és mtsai., 2019, SI). A két PCR amplikonból meghatározott szekvenciák nukleotid (nt) azonossága csak 43 % volt. Ezt követően szekvencia-specifikus primerek és 5'-RACE PCR technika alkalmazásával meghatároztuk a két mRNS 466-nt és 549-nt hosszú szekvenciáit (a polyA-vég nélkül). A 466 nt hosszú mRNS egyetlen 192 nt hosszúságú nyitott leolvasási keretet (ORF-et) tartalmaz, amely egy 63 aminosav hosszú peptidet kódol (lumbricin, rövidítve: Lumbr) (átlagos számított molekulatömege: 7413,35 Da) **(3.3.1.1a ábra)**. Emellett, a lumbricin-rokon fehérje (rövidítve: LuRP) 575-nt hosszú mRNS, amely egyetlen, 180-nt hosszú ORF-et tartalmaz, így egy 59 aminosav hosszú peptidet kódol (átlagos számított molekulatömege: 7066,84 Da) **(3.3.1.1b ábra)**. Továbbá, meghatároztuk az új *E. andrei* lumbricin homológok teoretikus izoelektromos pontjait (Lumbr: 7,95; LuRP: 6,07). Az újonnan azonosított *E. andrei* Lumbr és LuRP prekursor peptidekben nem találtunk egyértelmű szignálpeptid-szekvenciát, amely a lumbricin-I-ben és a lumbricin-PG-ben jelen van, de hiányzik a *Hm*-lumbricin-ből és a PP-1-ből **(3.3.1.2a ábra)**. Érdekes módon ez a jelenség arra utal, hogy az érett lumbricin és a rokon (LuRP) fehérje nem szekretálódik, azonban a kísérleti bizonyítékok azt mutatják, hogy a *Hm*-lumbricin és a *P. tschiliensis*-ből származó PP-1 extracellulárisan is jelen van (Wang és mtsai., 2003; Schikorski és mtsai., 2008).



**a**

```

1 gacgaaagtcgacaagattcaggaacggttttgcggaacaccggctaaggttgagatgtac 60
                                     M Y
61 agcaagtacgagcgtcagaaggacaagaggccatactcggaacgcaagaaccaatacacg 120
  S K Y E R Q K D K R P Y S E R K N Q Y T
121 ggtccgcagttcctctatcctcctcggagcgcacatcccaccgcagaaggtcatcaaatggaac 180
  G P Q F L Y P P E R I P P Q K V I K W N
181 gaggagggtccttcccatctacgaaatccccggcgaaggaggtcacgcagaaccagctgcc 240
  E E G L P I Y E I P G E G G H A E P A A
241 gcctagggttagatttccagatgaaccgatgccaaccggagaggaagagaggttgatttoga 300
  A *
301 tggagcgtgtggactgaactatcagcgttctttttaccatcgtcgtataagtctatcac 360
361 tcttagaggatcaagtagattgctgtagacctagttaactaaacctaaatcaattgctgtc 420
421 ttggttttaaatgagtggagaggaaattaaacaaattacaaccctaaaaaaaaaaaaa 478

```

**b**

```

1 gacgctgtagacagaattcaaacacgcttcgctggagctccgtccaaggtggagatgtac 60
                                     M Y
61 agcaaatatcgagcgcagaaggacaagaggtcgtacgacgagcgcacacacgatctacacc 120
  S K Y E R Q K D K R S Y D E R H T I Y T
121 gggccccagtgggcccaccggctcgagagaaatcaaccactaaaatcgtccgatggaac 180
  G P Q W A H P V E R I N P T K I V R W N
181 gaggaggcctgcccctctacgaggaaccgggagcggagcaagtgcccgatgagcatca 240
  E E G L P I Y E E P G A E Q V A A *
241 catgccttcggggttaacgagcctgtactcgcaagctttcgttataaaactctctcaaat 300
301 ctcaactgacaggatatttttcggctgatttctaatcgagaacgctacgcactactccga 360
361 agcctactggcaacaccggcaacgaaacatttcagcatcgtcaagatcatattggacaac 420
421 tatcaacaactgatgtgcttagctgtcacgtctttacagcacacgccgaatctgtgcaag 480
481 gcaacaatctcggaatgttcttcttatgatgaccgaccttaattttagtcttcaactct 540
541 ataaaaacgctactacttaaaaaaaaaaaaaaaaaa 577

```

**3.3.1.1. ábra.** Az *E. andrei* lumbricin (a) és a lumbricin-rokon fehérje (LuRP: lumbricin-related peptide) (b) nukleotid és aminosav szekvenciái. A nyitott leolvasási keretek aminosavszekvenciái a nukleotidszekvenciák alatt kerülnek bemutatásra. A stopkodonok csillaggal jelöltek, a poliadenilációs szignál szekvenciák aláhúzottak. Mindkét fehérje a prolin gazdag antimikrobiális peptidek családjába tartozik, emellett nagyszámú, pozitívan töltött aminosav-maradékot tartalmaznak.

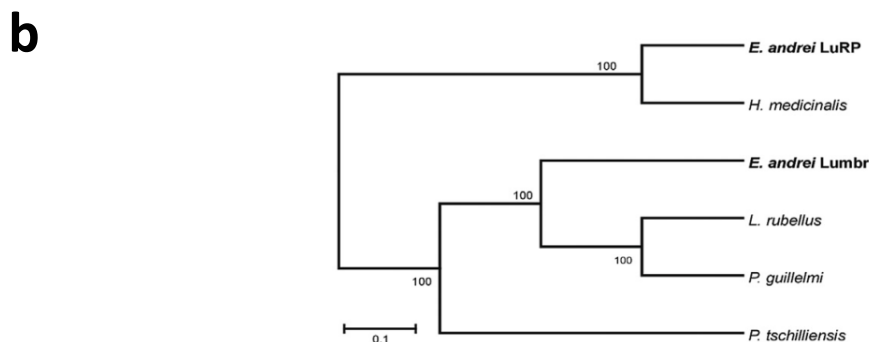
Mindkét mRNS 3' nem transzlálódó régiója tartalmazza az AUUAAA és AAUAAA poliadenilációs szignálszekvenciákat (Tian és Graber, 2012) (3.3.1.1a és 3.3.1.1b ábra). A szekvencia-analízis és BLAST-keresés (legközelebbi találat) alapján a prekursor peptidek 98% (Lumbr) és 66% (LuRP) azonosságot mutatnak az *L. rubellus* lumbricin-I peptiddel (AF06552), azonban a két *E. andrei* AMP mindössze 66 %-os azonosságot mutatott egymással (3.3.1.2a ábra).

**a**

<i>Hm-lumbricin</i>	EU156756	-----	---MFSKYER	QKDKRSYGER	FSMFTGPQFI	SPPERIKPNK	37
<i>Lumbricin-1</i>	AF06552	<i>MSLCISDYL</i>	<i>Y LTLTFSKYER</i>	QKDKRPYSER	KNQYTGPF	YPPERIPPQK	50
<i>Lumbricin-PG</i>	P86929	<i>MLLTISDFLF</i>	<i>L SLTFSRYAR</i>	MRDSRPWSDR	KNNYSGPQFT	YPPEKAPPEK	50
<i>PP-1</i>	AY167144	-----	---MYSKYER	QKDKRPYSER	KDQYTGPF	YPPDRIPPSK	37
<i>E. andrei Lumbr</i>	KX816866	-----	---MYSKYER	QKDKRPYSER	KNQYTGPF	YPPERIPPQK	37
<i>E. andrei LuRP</i>	KX816867	-----	---MYSKYER	QKDKRSYDER	HTIYTGQWA	HPVERINPTK	37
			:*: * *	:*. * . : : *	: : * * * :	* : : * *	

<i>Hm-lumbricin</i>	EU156756	ILQWDGEGMP	IYATSGAAA-	-----E	57
<i>Lumbricin-1</i>	AF06552	VIKWNEEGLP	IYEIPGEGGH	AEPA---A-A	76
<i>Lumbricin-PG</i>	P86929	LIKWNNEGSP	IFEMPAEGGH	IE-----P	73
<i>PP-1</i>	AY167144	AIKWNEEGLP	MYEVLDPGAG	AKTAVEAAAE	67
<i>E. andrei Lumbr</i>	KX816866	VIKWNEEGLP	IYEIPGEGGH	AEPA---A-A	63
<i>E. andrei LuRP</i>	KX816867	IVRWNEEGLP	IYEEPGA---	-EQV---A-A	59
		:*: * * *	: :		



**3.3.1.2. ábra.** Az *E. andrei* Lumbr (KX816866) és LuRP (KX816867) aminosav sorrendjének összehasonlítása más gyűrűsféreg fajokban azonosított homológ, lumbricin fehérjék aminosav szekvenciájával (*L. rubellus* - AF06552, *H. medicinalis* - EU156756, *P. guillelmi* - P86929, és *P. tschilliensis* - AY167144). A prediktált szignál szekvenciák dőlt betűvel vannak jelezve. A csillag jelölés (\*) az identikus aminosavak maradékokat, a kettős pont (: ) a konzervált, a pont (.) a szemikonzervált aminosavakat (a) jelöli.

A Lumbr és LuRP szekvenciák filogenetikai összehasonlítása a legközelebbi *Annelida* molekuláris rokonokkal, a legnagyobb valószínűség módszer alapján (b). Az „csomópontoknál” lévő számok reprezentálják a maximum lépték (1000) százalékos arányát.

Annak ellenére, hogy a Lumbr és a LuRP nagyfokú szekvencia azonosságot mutatnak, a prekursorok távolabb állnak egymástól. A Lumbr a *L. rubellus* lumbricin-I-gyel, míg a LuRP a *H. medicinalis* *Hm-lumbricin*-nel mutat nagyobb fokú homológiát (3.3.1.2b ábra). Érdekes módon a Lumbr N-terminális vége 13 aminosavval rövidebb, mint az *L. rubellus* lumbricin-I, azonban a két peptid szekvenciája azonos (3.3.1.2a ábra). Általánosságban elmondható, hogy a lumbricin-homológok tipikus hossza 57 - 76 aminosav (3.3.1.2a ábra). Szembetűnő tulajdonsága ezen AMP-családba tartozó fehérjéknek a magas prolin tartalmuk. A legtöbb prolin-gazdag AMP-et az ízeltlábúak törzséből (rákok és rovarok) írták le, pl. a drosocin, apidaecinek, pyrrococin és az arasin-1. Prolin-gazdag AMP-k ismertek a növényekben és az emlősökben is (PR-3, prophenin és BnPRP1) (Otvos, 2002). Az *E. andrei* Lumbr és a LuRP is számos prolint tartalmaz (14,3% és 6,8% molarányban) hasonlóan a lumbricin-I-hez és a többi lumbricin homológhoz (Cho és mtsai., 1998). Cho és mtsai., (1998) szerint a

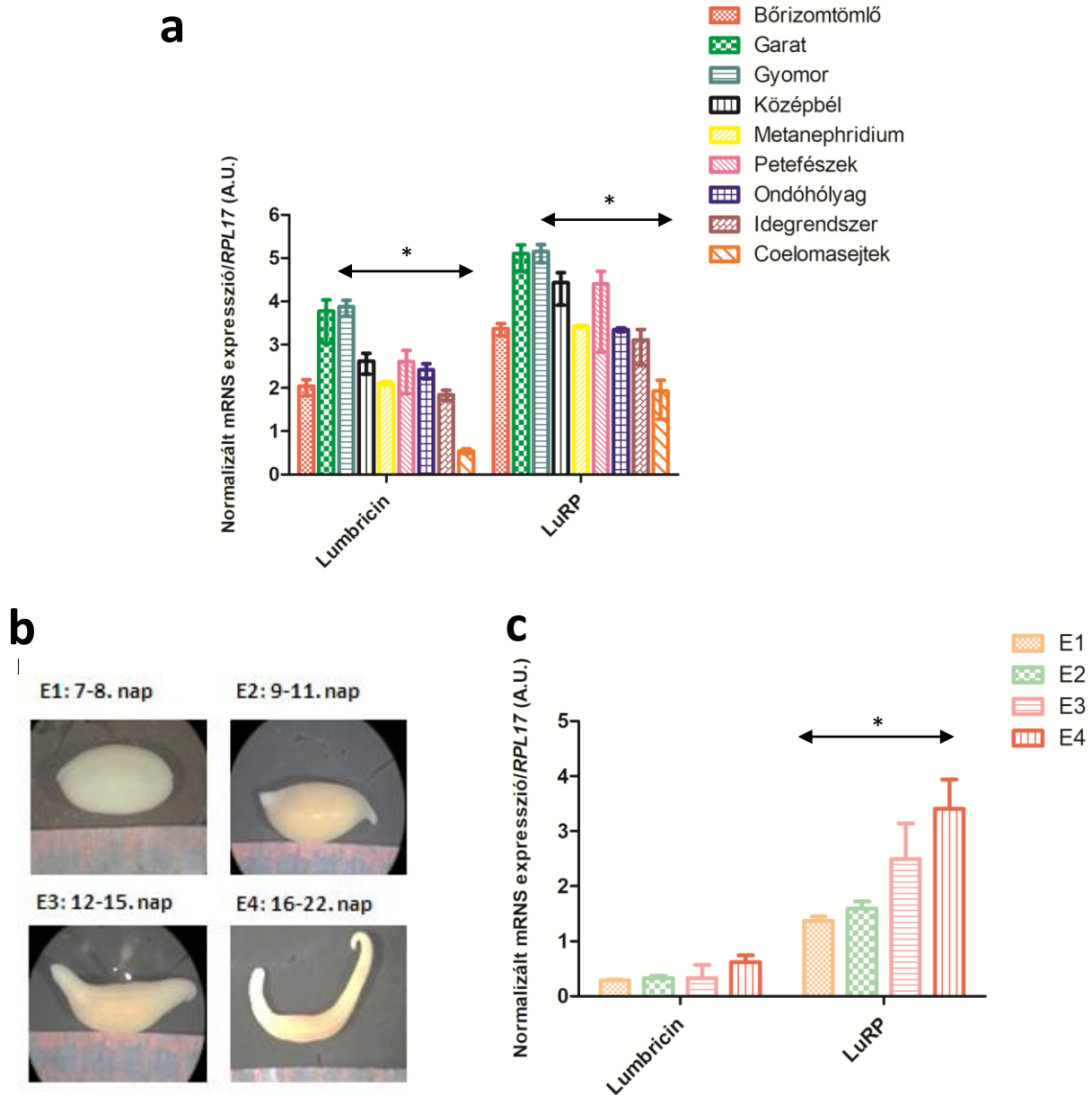
lumbricin-I bizonyos hasonlóságot mutat az emlős PR-39 és Bac5 AMP-ekkel, azonban ezt a megfigyelést más lumbricin rokonok esetében nem tárgyalták. A prolin egyedülálló tulajdonságokkal rendelkezik, például képes befolyásolni a proteinek konformációját és ciklizációját, ezáltal hatással van a másodlagos szerkezet kialakulására (Vanhoof és mtsai., 1995; Graf és mtsai., 2017). További érdekesség, hogy az *Eisenia* lumbricin homológok aromás aminosav-tartalma (His, Trp, Tyr) is viszonylag magas (15-16 % mólarányban), amely ezen peptidek antimikrobiális hatását fokozhatja (Muñoz és mtsai., 2007).

### 3.3.2. A *Lumbr* és *LuRP* mRNS szöveti expressziója és ontogenetikai kifejeződése

A korábbi tanulmányok (Wang és mtsai., 2003; Li és mtsai., 2011) nem vizsgálták kiterjedten a lumbricin lokalizációját (Tasiemski, 2008), ezért célul tűztük ki a *Lumbr* és a *LuRP* expressziós mintázatának vizsgálatát *E. andrei* giliszta különböző szerveiben és szöveteiben. Wang és mtsai., (2003) szerint a lumbricin jelenléte *P. tschiliensis* esetében csak a testfalra korlátozódik és nincs jelen a béltraktusban, illetve a coelomasejtekben. Schikorski és mtsai., (2008) kimutatták a *Hm-lumbricin* expresszióját a *H. medicinalis* mikroglia sejtekben, bár ebben a munkában csak neurális szöveteket vizsgáltak. Ezzel szemben a *Lumbr* és *LuRP* széles körű mRNS expresszióját figyeltük meg számos szövetben (3.3.2a ábra). Mindkét AMP mRNS expressziója az előbél proximális részén (garat, gyomor) bizonyult a legmagasabbnak, miközben a többi vizsgált szövetben nagyrészt közepes szintű kifejeződést tapasztaltunk (bőrízomtömlő, petefészek, ondóhólyag, metanephridium és idegrendszer), a legalacsonyabb mRNS szinteket a coelomasejtekben detektáltunk. Minden vizsgált szövetben a *LuRP* magasabb mRNS expressziós mintázatot mutatott, mint a *Lumbr*. Mindkét AMP esetében a középbélben volt a legmagasabb expresszió, mivel ez a szerv tekinthető a mikrobiális invázió szempontjából központi fontosságúnak. Fiołka és mtsai., (2012) *D. veneta* giliszta vizsgálata során kimutatták, hogy a lizozim expresszió főként a középbélben volt a legkifejezettebb. Kísérletünk bizonyította, hogy mindkét lumbricin izoforma expresszálódik a vizsgált szövetekben. Érdekes, hogy egy másik antibakteriális (és cytotoxikus) hatású molekula, a *lysenin* csak az amoebocytákban, és eleocytákban expresszálódik (Opper és mtsai., 2013; Bodó és mtsai., 2018). Korábban kizárólag a szesszilis chloragocytákban írták le a *lysenin* expressziót (Ohta és mtsai., 2000).

A lumbricin expressziójának ontogenezisét tekintve, Cho és mtsai., (1998) a *lumbricin-I* expresszióját csak felnőtt állatban figyelte meg (embriókban és a kokonokban nem). Kísérleteinkben mindkét *E. andrei* lumbricin-homológ kifejeződést mutatott az embrionális fejlődés stádiumai során, és a *LuRP* expressziója szignifikánsan magasabb volt

összehasonlítva *Lumbr*-vel (3.3.2c ábra). Az expresszió folyamatos növekedést mutatott a negyedik fejlődési stádiumig (E4), amikor is a test már teljesen szegmentált és a szervek differenciálódása is befejeződött (Boros és mtsai., 2010).



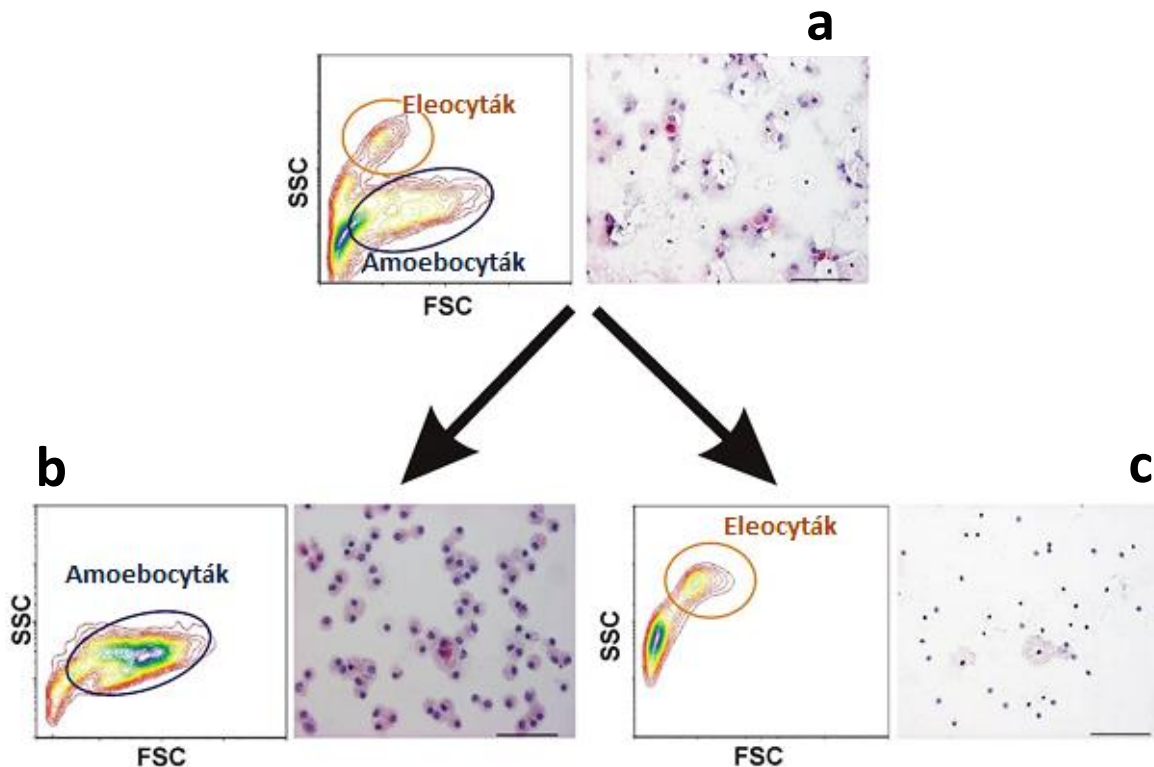
**3.3.2. ábra.** A *Lumbr* és *LuRP* expressziós mintázata különböző *E. andrei* szövetekben (n=3, átlag±SEM) (a). *E. andrei* gilisztafaj embrionális stádiumainak (E1-E4) morfológiai változásai a fejlődés folyamata során (b). A *Lumbr* és *LuRP* mRNA expressziós mintázata az *E. andrei* embrionális fejlődése során (c). A kvantitatív mérések az *RPL17* mRNA-szintjéhez lettek normalizálva. Három független kísérletet végeztünk duplikált technikai ismétléssel. Az eredmények az átlagokat mutatják, a hibaszávok az átlagok standard hibáját (SEM) jelentik. A csillagok a szignifikáns  $p$  ( $* < 0,05$ ) értékeket jelölik.

Az expresszió gradiens növekedésének egyik magyarázata lehet a testméret növekedése a fejlődés folyamata során. Másrészt ismert, hogy számos szimbiotikus baktérium kolonizálja a földgiliszták embrióit, és gyakoriságuk növekszik a korai embriogenezis során

(Zachmann és Molina, 1993; Davidson és mtsai., 2010). Valószínű, hogy a Lumbr és LuRP differenciált kifejeződése kontrollálhatja a kommenzális baktériumok szaporodását a földgiliszták embrióiban, mivel hasonló mechanizmus már más gerinctelen antimikrobiális peptidekről ismert (Roiff és Schmid-Hempel, 2016).

### 3.3.3. Eltérő mRNS expressziós mintázat az amoebocyta és eleocyta alpopulációk között

A coelomasejt alcsoportok közötti génexpressziós eltérések elemzéséhez szeparáltuk a coelomasejt alpopulációkat fizikai paramétereik (méretük és granularitásuk) alapján (3.3.3.1a ábra). A szeparálást követően vizsgáltuk a sejtek életképességét (7-AAD festés). A túlélési arány a szeparált amoebocytákban (82-85%) magasnak bizonyult, miközben a másik alpopulációnál a magas autofluoreszcencia (Rorat és mtsai. 2014; Engelmann és mtsai., 2016a) miatt nem tudtuk értékelni az élő/halott eleocyták arányát.

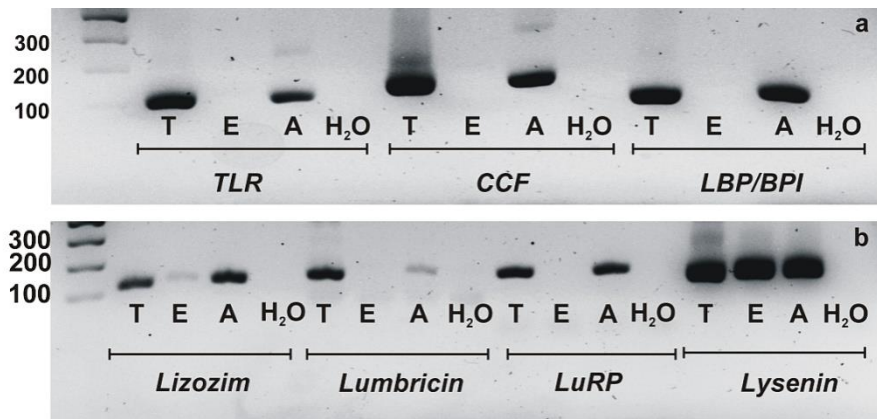


**3.3.3.1. ábra.** A coelomasejt alcsoportok szeparálás előtti (a) és szeparálás utáni (b, c) megoszlása. A teljes coelomasejt populációt (a) fizikai paraméterek alapján zömében homogén amoebocyta (b) és eleocyta (c) alpopulációkra választottuk el. A szeparálás utáni elemzések azt mutatták, hogy az amoebocyták nem sérültek, azonban az eleocyták esetében sejtörmelék is megfigyelhető volt. A hematoxylin-eozin festés alapján szeparálás előtt egy vegyes populációt láhattunk (a), míg az elválasztást követően homogén amoebocyta (b) és homogén eleocyta (c) populációkat figyeltünk meg. Méretarány: 100  $\mu$ m. A reprezentatív ábrákat három független kísérlet eredményeiből mutatjuk be.

A szeparálás hatékonyságának ellenőrzése céljából hematoxylin-eozin festést végeztünk. A szortolt populáció nagy részét hyalin amoebocyták alkották (3.3.3.1b ábra),

míg a granuláris amoebocyták kis százalékban fordultak elő. Az elkülönített eleocyták (**3.3.3.1c ábra**) könnyen felismerhetők a kis magjukról és a chloragoszómákkal kitöltött citoplazmáról.

A veleszületett immunrendszer számos PRR-receptorral operál, mely lehetővé teszi a saját és nem-saját struktúrák felismerését. Az elmúlt években több, evolúciósan konzervált PRR molekulát írtak le az *E. andrei* gilisztákban (Bilej és mtsai., 2010; Procházková és mtsai., 2020). Elsőként a *coeloma citolítikus faktort (CCF)* azonosították. A CCF egy LPS, peptidoglikán és  $\beta$ -1,3-glükán/N,N'-diacetylchitobióz-kötő doméneket tartalmazó fehérje (Beschin és mtsai., 1998). A coelomasejt alcsoportok esetében megfigyeltük, hogy a CCF csak az amoebocyta szubpopulációban expresszálódik, de a szortolt eleocytákban nem volt jelen (**3.3.3.2a ábra**). A *toll-szerű receptor (TLR)* molekulák *Annelida* fajokban való jelenlétére utaló első bizonyítékok a soksertéjű gyűrűsféreg és pióca fajok nukleotid adatbázisainak *in silico* elemzéséből származtak (Davidson és mtsai., 2008). Az orvosi pióca *Hm-TLR* molekulájának azonosítása jelentette az első tényleges kísérletes eredményt (Cuvillier-Hot és mtsai., 2011). Ezt követően sikerült kimutatni a TLR kódoló szekvenciáját *E. andrei*-ben (*EaTLR*) (Škanta és mtsai., 2013). Az *EaTLR* expressziós szintje viszonylag alacsony volt a coelomasejtékben (Škanta és mtsai., 2013), és - megfigyelésünk szerint - csak az amoebocytákban expresszálódik (**3.3.3.2a ábra**). Érdekes tény, hogy jelenléte nem korlátozódik kizárólag az immunkompetens szövetekre (Škanta és mtsai., 2013; Engelmann és mtsai., 2016b; Procházková és mtsai., 2020). További érdekesség, hogy újabb genomikai vizsgálatok kimutatták a TLR-ok viszonylagos változatosságát más giliszta fajokban (Fjøsne és mtsai., 2015). A harmadik leírt *Eisenia* PRR az evolúciósan konzervált *LPS-t kötő fehérje/baktérium-permeabilitást fokozó fehérje (LBP/BPI)* (Škanta és mtsai., 2016). Legmagasabb expressziója a coelomasejtékben és az ondóhólyagban volt jellemző, míg legalacsonyabb kifejeződése a béltraktusra korlátozódott. Megfigyeléseink alapján a *LBP/BPI* expresszió az amoebocytákhoz köthető, és nincs jelen az eleocytákban (**3.3.3.2a ábra**). Összehasonlítva a korábbi funkcionális vizsgálatokkal (Valembos és mtsai., 1985; Valembos és Lasségues, 1995), eredményeink megerősítették azt az elképzelést, hogy az elsődleges patogén-felismerés az amoebocyta alpopulációhoz köthető.



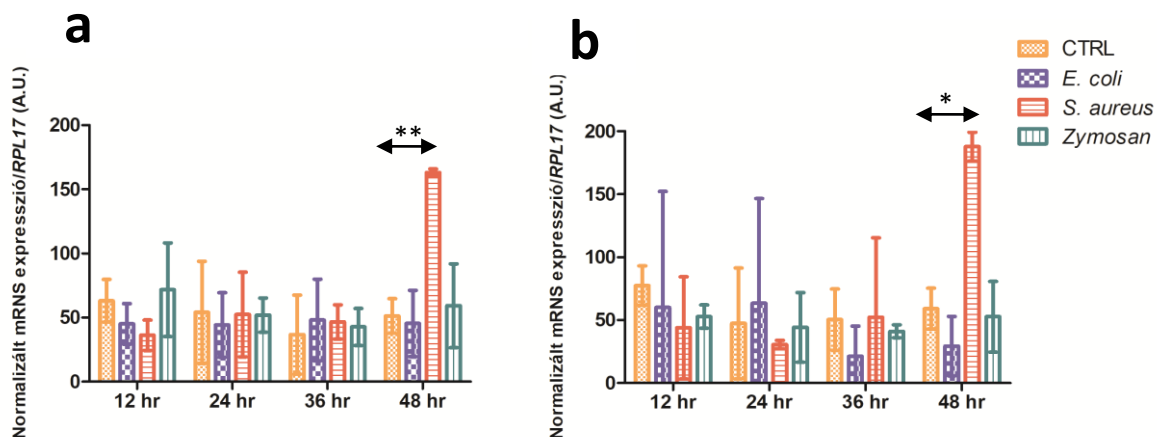
**3.3.3.2. ábra.** Mintázatfelismerő receptorok (PRRs) (a) és antimikrobiális/citotoxikus fehérjék (b) mRNS expressziós mintázatának vizsgálata *E. andrei* coelomasejtekben. (a) *tlr*, *ccf* és *lbp/bpi* (b) *lizozim*, *lumbricin*, *LuRP*, *lysenin*. A jelölések a teljes coelomasejt populációt (T), vagy szeparált eleocyta (E) illetve szeparált amoebocytá alpopulációt (A) jelentik. Három független kísérletet végeztünk, ezek közül egy reprezentatív eredményt mutatunk be.

A PPR-ok expressziója mellett (3.3.3.2a ábra) vizsgáltuk az AMP-ek expressziós mintázatát a két alpopulációban (3.3.3.2b ábra). A lizozim egy nagy konzerváltságot mutató AMP, amely számos különféle élőlényben megtalálható, a növényektől az emberig. A korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az *E. andrei* lizozim nagyfokú-hasonlóságot mutat más gerinctelen lizozimekkel (Josková és mtsai., 2009), ezenkívül expressziója fokozódik a coelomasejtekben a Gram-pozitív és a Gram-negatív bakteriális expozíció hatására. Eredményeink alapján mindkét elválasztott coelomasejt szubpopuláció expresszálja ezt az AMP-et (3.3.3.2b ábra), azonban a szeparált amoebocytá alpopulációban ez az expresszó jóval kifejezettebb, mint az eleocytáknál. A *Lumbr* és *LuRP* expresszió szempontjából csak az amoebocytá alpopuláció bizonyult pozitívnak, az eleocyta nem (3.3.3.2b ábra). A lysenin-fehérje család specifikus az *Eisenia* fajokra, sphingomyelint (és foszfokolint) kötő molekulákból áll és különféle biológiai aktivitással rendelkezik (citotoxicitás, antimikrobiális aktivitás és opszonizáció) (Bilej és mtsai., 2000; Josková és mtsai., 2009; Engelmann és mtsai., 2016ab). Korábbi immunhisztokémiai elemzések alapján többnyire az eleocyták a lysenint expresszáló sejtek (Oppér és mtsai., 2013). Eredményeink alapján a *lysenin* expresszió mindkét alpopulációban megnyilvánult (3.3.3.2b ábra), amely összhangban van korábbi áramlási citometrián alapuló megfigyelésekkel (Oppér és mtsai., 2013).

Dolgozatomban azért kerül együttes megemlítésre a PRR-ok és AMP-ek peptidek expressziója, mert más gerinctelen (pl. rovaroknál) szervezetek esetében már bizonyított, hogy a mintázatfelismerés folyamata az AMP-ek szekréciójához vezethet (Ganesan és mtsai., 2011; Hayashi és mtsai., 2016), azonban ez a tény *E. andrei* gilisztánál nem bizonyított.

### 3.3.4. A *Lumbr* és *LuRP* mRNS indukciója *in vivo* bakteriális kezelés hatására

A prolinban gazdag AMP-ek kiterjedt spektrumú antimikrobiális hatással rendelkeznek a mikroorganizmusokkal szemben (Otvos, 2002). Cho és mtsai., (1998) a lumbricin-I hatásspektrumának vizsgálatakor széleskörű antimikrobiális aktivitást figyeltek meg Gram-negatív, Gram-pozitív baktériumok és gombákkal szemben, haemolitikus tulajdonság nélkül. A lumbricin-homológokkal végzett kísérletek is igazolták ezeket a megfigyeléseket (Schikorski és mtsai., 2008; Li és mtsai., 2011). Azonban érdekes módon Northern blot analízis alapján a bakteriális expozíció nem indukálta a lumbricin-I expressziót a kontroll *L. rubellus* gilisztához képest, ezért úgy gondolták, hogy a *lumbricin-I* konstitutívan expresszálódik a felnőtt állatokban (Cho és mtsai., 1998). Ennek ellentmondó megfigyelés, hogy *H. medicinalis*-ban a mikrobiális kezelés az idő függvényében modulálja a *Hm-lumbricin* expresszióját. Különösen a Gram-pozitív baktériumok (*Micrococcus*) és a zymosan kezelések voltak nagyobb hatással a *Hm-lumbricin* mRNS expressziójára, szemben a Gram-negatív (*Aeromonas*) bakteriális expozícióval (Schikorski és mtsai., 2008). Li és mtsai., (2011) leírták, hogy a vizsgált mikroba törzsek közül a *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negatív) és az *S. aureus* (Gram-pozitív) a legérzékenyebb a *P. guillelmi* lumbricin-PG-re, míg az *E. coli* (Gram-negatív) törzsre kevésbé hatott a peptid.



**3.3.4.1. ábra.** A *Lumbr* (a) és *LuRP* (b) mRNS expressziós mintázatának változása a coelomasejtekben *in vivo* bakteriális és zymosan kezelést követően. A kvantitatív mérések az *RPL17* mRNS-szintjéhez lettek normalizálva. Duplikált technikai ismétléssel három független kísérletet végeztünk. Az eredmények az átlagokat reprezentálják, a hibasávok az átlagok standard hibáját (SEM) jelentik. A csillagok a szignifikáns  $p$  (\* < 0,05, \*\* < 0,01) értékeket képviselik.

A fent említett vizsgálatokhoz hasonlóan, az *E. andrei Lumbr* és *LuRP* mRNS expressziós szintje a coelomasejtekben szignifikáns emelkedést mutatott a 48 órás *S. aureus* baktérium-fertőzést követően, de az expresszió változatlan maradt az *E. coli* vagy zymosan kezelése után (3.3.4.1a és 3.3.4.1b ábra). Az AMP indukciós kinetikáját tekintve a *Hm-*



*lumbricin* 6 óra elteltével már emelkedést mutatott, amely a csúcspontját 24 órára érte el (Schikorski és mtsai., 2008).

Összehasonlításképp, eredményeink alapján a *Lumbr* és a *LuRP* lassú indukcióját (48 óra elteltével) figyeltük meg *in vivo* patogén kezelés hatására. Az irodalmi adatokkal szembeni részleges ellentmondás a következőkkel magyarázható: először, nagy különbségek lehetnek a fajok között az expressziós szintekben. Másodszor, az alkalmazott módszerek (Northern blot vs. valós-idejű PCR) eltérő érzékenységgel rendelkeznek. Harmadszor, a mikrobiális törzsekkel szembeni különféle hatások szerkezeti tulajdonságokon alapulnak: elsősorban a lumbricinek aminosav-összetételén és a mikrobiális sejtfal-összetevők közötti különbségeken (Tassanakajon és mtsai., 2015; Cunha és mtsai., 2017).

### **3.4. Konklúzió**

A földgiliszták evolúciósan ősbibb szervezetek, ezért alkalmazkodniuk kellett a talajban mindenütt jelenlévő kórokozókhoz. Ennek érdekében az integritásuk megőrzéséhez hatékony sejtes és humorális immunológiai mechanizmusokat fejlesztettek ki.

Jelen tanulmányunk feltárta a prolin gazdag AMP-ek családjába tartozó két új lumbricin-homológ jelenlétét *E. andrei* gilisztafajban, amelyek nagyfokú szekvencia-hasonlóságot mutattak a már korábban leírt lumbricinekkel. Mivel a korábbi munkák nem vizsgálták ilyen részletesen a *lumbricin* szöveti előfordulását, ezért elképzelhető, hogy a hasonló expressziós mintázat a többi rokon fajban is megfigyelhető lenne, emellett variánsok ott is előfordulhatnak. Ezen megállapítás mellett szól, hogy az előző tanulmányok más módszereket alkalmaztak a lumbricinek detektálására, amelyek érzékenysége meglehetősen különböző. A földgiliszták embrionális fejlődéséről molekuláris viszonylatban még hiányosak az ismereteink, az eredmények összevetése más immunológiailag-rokon gének expressziójával a jövőben hasznos lenne a területen.

Új eredményeink alátámasztják a lumbricin fehérjék konzerváltságát az *Annelida* csoporton belül, lehetséges szerepüket a giliszták immunhomeosztázisának fenntartásában, az ontogenezis és patogén fertőzések során.

## *Eredmények II.*

### **4. A celluláris és humorális immunkomponensek szerepe az *Eisenia andrei* szöveti regenerációjában**

A téma alapjául szolgáló publikációk:

Engelmann P., **Bodó K.**, Najbauer J., Németh P. (2018). Annelida: Oligochaetes (Segmented Worms): Earthworm Immunity, Quo Vadis? Advances and New Paradigms in the Omics Era In: Edwin, L Cooper (szerk.) Advances in Comparative Immunology Cham (Németország); Springer International Publishing, pp. 135-159.

**Bodó K.**, Kellermayer Z., László Z., Kokhanyuk B., Németh P., Engelmann P. Unravelling the evolutionary conserved cell- and immunobiological mechanisms of tissue renewal in a non-classical invertebrate model organism (előkészületben).

## 4.1. Bevezetés

### 4.1.1. A regenerációs képesség filogenezise

A regeneráció olyan morfogenetikus események összessége, amely során a részlegesen, vagy teljesen az elvesztett szerv vagy szöveti egység helyreállítása történik meg. Több hierarchikus szinten jelenhet meg növényekben, gerinctelenekben és gerincesekben, beleértve a szövetek, szervek, illetve az egész test regenerációját (Bely és Nyberg, 2010; Elliott és Alvarado, 2018). Thomas Hunt Morgan ismerte fel elsőként, hogy a regeneráció nem egy egységes folyamat és két főbb típusát különítette el (Elliott és Alvarado, 2018; Engelmann és mtsai., 2018). A szervek és szövetek helyreállítása főként az epimorfózis folyamata során megy végbe. A regenerációs folyamat e formájánál az őssejtek/progenitor sejtek (számos fajban neoblasztoknak nevezik őket) aktiválódnak, proliferálódnak, amelynek eredménye a regenerációs blastema. A későbbiekben ez a regenerációs blastema formálódik át az eredeti, elvesztett testrészzé. A regenerációs folyamat morphallaxis útján is végbemehet, ekkor az eredeti, sértetlen sejtek építik újjá az elvesztett szervet/vagy az egész szervezetet őssejtek részvétele és sejtproliferáció nélkül (Bely és Nyberg, 2010; Mainschein, 2011). A jelenlegi irodalmi adatok szerint a morphallaxist tekintjük az ősbibb folyamatnak és főként gerinctelen szervezetekre jellemző. Az epimorfózis gerincteleneknél és gerinceseknél is megfigyelhető és a kétoldalian szimmetrikus állatok (*Bilateria*) sajátos innovációjának tekinthető. A regenerációs blastemát főként proliferálódó, differenciálatlan sejtek építik fel, kezdetben pigmenteket sem tartalmaz (Bely és Nyberg 2010; Engelmann és mtsai., 2018).

A regenerációs képesség az evolúció során a korai multicellularitás szintjén jelenik meg (**4.1.2. ábra**), de a fő *Bilateria* kládok, mint a tapogató-csillókoszorús állatok (*Lophotrochozoa*), vedlő állatok (*Ecdysozoa*) és az újszájúak (*Deuterostomia*) főtörzsén belül variábilis a regenerációs képesség, van olyan taxon, ahol ez meglehetősen limitált. Ennek magyarázata a közös ősökre vezethető vissza. Az ősszájúak (*Protostomia*) között számos csoport képes az intenzív regenerációs képességre, így valószínűsíthető, hogy a többsejtű (*Metazoa*) ős is képes volt regenerációra (Bely és Nyberg, 2010). A klasszikus regenerációs modellorganizmusok közül meg kell említenünk a hidrát és a planáriát, amelyek már a valódi szövetes állatok közé tartoznak, de jóval egyszerűbb felépítésűek, 12-15 differenciált sejttypusból állnak (Elliot és Alvarado, 2018). Meglepő, de a regenerációs képesség eltérő a közeli rokon fajok között is. A legtöbb gyűrűsféreg faj (*Annelida*) hasonlóan a gerinctelenek többségéhez, képes az elvesztett testrészek (szelvények) regenerálására, de ez a képesség a piócák esetében nem figyelhető meg (Bely, 2006; Engelmann és mtsai., 2018). A rovarok

(*Drosophila*) esetében a regenerációs képesség csak lárva korban, az imaginális diszkuszokban figyelhető meg, a kifejlett rovarnál ez már csak a középbél-területére korlátozódik (Vriz és mtsai., 2014). A tüskésbőrűek (*Echinodermata*) egyes fajainál a külső testrészek (karok) és belső szervek regenerációja autotómia („öncsonkítás”) vagy predáció indukálta sérülés hatására is végbemegy (Khadra és mtsai., 2017; Khalacheva és mtsai., 2017). A gerinceseknél (*Chordata*) a regenerációs képesség tovább redukálódik, a halaknál (zebrahal) még megfigyelhető a végtagok (úszó), a szív, vagy az idegrendszer regenerációja. A kétéltűek egyik csoportjában (göte, szalamandra) a sebgyógyulás és a végtagok regenerációja teljes mértékű a felnőtt egyedekben is, míg a másik kétéltű csoportban (békák) ez a fajta regenerációs potenciál csak a metamorfózis előtti ebihal formáról mondható el (Tanaka és Reddien, 2011; Li és mtsai., 2015). A nagymértékű regenerációs képesség a melegvérűség kialakulásával (madarak, emlősök) teljesen elveszett, ontogenetikailag korlátozott a gerinceseknél. Sebgyógyulásról beszélhetünk, amely hegképződéssel jár és a kor előrehaladtával is csökken a sebgyógyulási kapacitás (**4.1.2. ábra**) (Bely és Nyberg, 2010; Engelmann és mtsai., 2018).

A filogenetikus mintázat jól szemlélteti hogyan veszett el a regenerációs képesség az evolúció során, ezért számos kulcskérdés fogalmazható meg:

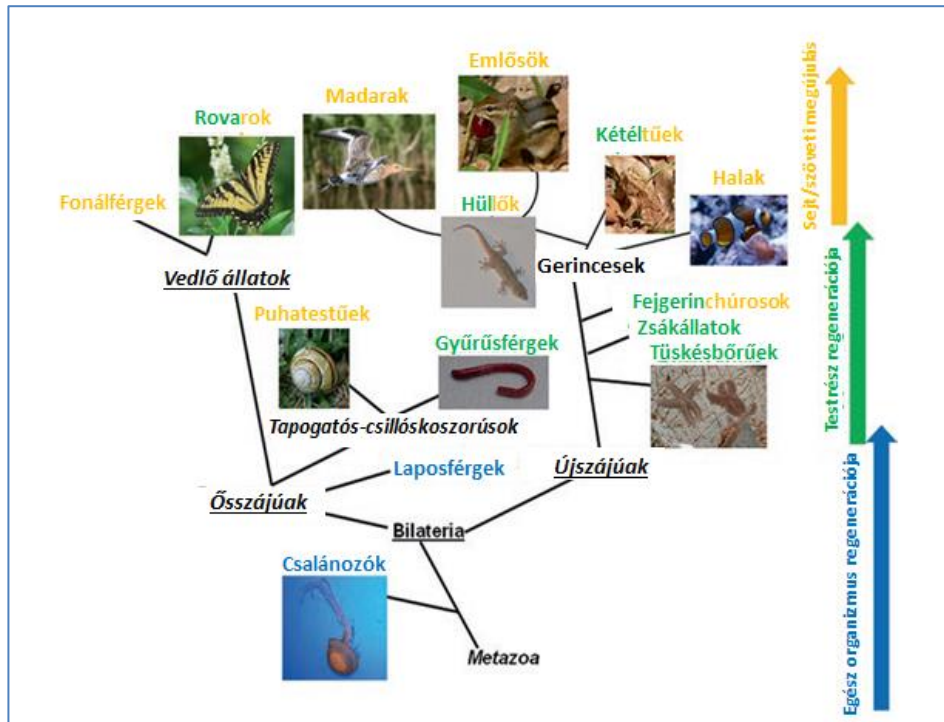
1. A regeneráció egy ősi karakterisztikus tulajdonság, vagy csak egy evolúciós újítás?
2. Rész-e a normál fejlődésnek?
3. Miért alakult ki a filogenezis során?
4. Hogyan egyeztethető össze az általános fejlődési folyamattal?

A kérdésekre nehéz pontos választ találni, azonban annyi bizonyos, hogy az evolúció során a regenerációs képességet ökológiai és evolúciós folyamatok sokasága formálta (Bely és Nyberg, 2010).

#### **4.1.2. A gyűrűsférgék regenerációja**

A gyűrűsférgék a hidrához és planáriához képest jóval komplexebb élőlények. Ennél a törzsnél jelent meg elsőként a középső csíralemez, azaz a mezoderma, amelyből származtatható a zárt keringési rendszer. Ebben az állatcsoportban fejlett idegrendszer és a szegmentáltság is megfigyelhető. A legtöbb *Oligochaeta* gyűrűsféreg faj esetén az anterior és posterior vég regenerációja végbemegy (**4.1.2. ábra**), bár a posterior vég regenerációja jóval elterjedtebb tulajdonságnak számít (Bely, 2006; Engelmann és mtsai., 2018). Az evolúció folyamata során a gyűrűsférgékben valószínűleg azért alakult ki a regeneráció képessége, mert gyakran érik őket ragadozók támadásai, amelyeknek következménye a sérülések és

szelvények elvesztése (Bely és Nyberg, 2010). A gyűrűsféreg fajok esetében a regeneráció folyamata számos faktortól függ, úgy, mint a környezeti tényezőktől, a tápláléktól, a fejlődési állapottól, és az eltávolított szelvények számától illetve a sérülés pozíciójától (Várhalmi és mtsai., 2008).



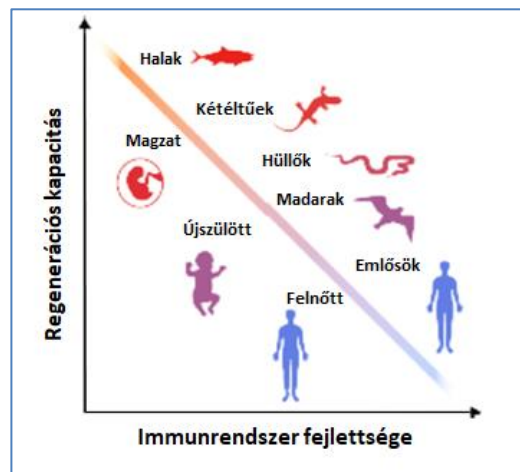
**4.1.2. ábra.** A regenerációs kapacitás sematikus ábrázolása a gerinctelen és gerinces állattörzsek esetén. A különböző fajok eltérő regenerációs képességgel rendelkeznek az egész test regenerációjától a sejtek és szövetek megújulásáig, amit a különböző színek szemléltetnek. A fényképeken a különböző állatcsoportok képviselői láthatóak: csalánozók (*Chrysaora fuscescens*), puhatestűek (*Cepea nemoralis*), gyűrűsférgek (*Eisenia andrei*), ízeltlábúak (*Papilio glaucus*), tüskésbőrűek (*Asterias vulgaris*), halak (*Amphiprion ocellaris*), kételtűek (*Bufo americanus*), hüllők (*Tarentola mauritanica*), madarak (*Limosa limosa*), és emlősök (*Tamias striatus*) (Engelmann és mtsai., (2018) alapján, módosítva).

Korábban már megfigyelték, hogy az anterior szegmensek regenerációja nagymértékben limitált és nem minden esetben valósul meg, továbbá a cerebrális ganglion eltávolításával a túlélési ráta jelentősen csökken az anterior vég regenerációja során (Várhalmi és mtsai., 2008; Xiao és mtsai., 2011). Ezzel szemben a posterior vég helyreállítása egy jóval univerzálisabb tulajdonsága a különféle *Annelida* csoportoknak és általában teljes mértékben megvalósul (Bely, 2006). Bizonyított, hogy a giliszták regenerációja epimorfózis (regenerációs blastema kialakulása) és morphallaxis (régis szelvények transzformációja) útján megy végbe. A helyreállítási folyamatban részt vesznek progenitor sejtek is, un. neoblasztok

(hasonlóan, mint a planáriáknál). Ezek a sejtek elszórtan vannak jelen minden szegmensben, a sérülés helyére vándorolnak és részt vesznek a regenerációs blastema kialakításában (Várhalmi és mtsai., 2008; Engelmann és mtsai., 2018). Az *Oligochaeta* gyűrűsféregben regeneráció molekuláris háttere kevésbé ismert. A legtöbb adat (fejlődést szabályozó gének, pl. *hox* és *hedghog*) a *Platynereis* soksertéjű gyűrűsféreg és *Pristina sp.* regenerációs folyamatának vizsgálatából származik (Tessmar-Raible és Arendt, 2003; Nyberg és mtsai., 2012).

#### 4.1.3. A regeneráció és az immunrendszer kapcsolata

A regeneráció molekuláris háttere mellett az immunológiai folyamatokkal kapcsolatban is rendkívül hiányosak az ismereteink. Számos tanulmány igazolta, hogy az immunrendszer szerepe alapvető a regenerációs folyamatban, illetve a regenerációs kapacitás növekedése fordítottan arányos az immunrendszer fejlettségével (**4.1.3. ábra**) (Julier és mtsai., 2017; Engelmann és mtsai., 2018).



**4.1.3. ábra.** Az immunrendszer fejlettsége és a regenerációs kapacitás között fennálló fordított kapcsolat az evolúció vagy fejlődés folyamata során. Az alacsonyabbrendű gerincesek esetén (pl. halak és kétélűek) még megvan a kapacitás, hogy teljes mértékben regenerálják a szöveteiket. Emlősöknél a regenerációs kapacitás függ a fejlődési stádiumtól (pl. magzat, újszülött és felnőtt). Emellett az evolúció,- és az emlősök életszakaszainak során az immunrendszer egyre bonyolultabbá válása figyelhető meg (Julier és mtsai., (2017) alapján, módosítva).

A szöveti gyógyulás és immunrendszer kapcsolata meglehetősen összetettnek mondható, amelyben az immunrendszer pozitív és negatív szereppel is bír, de ez nagyrészt függ a fejlődési stádiumtól (embrionális, újszülött vagy felnőtt). Az immunválasz típusa, időtartama és a sejttípusok részvétele drasztikusan megváltoztatja a sebgyógyulás eredményét (inkomplett gyógyulás: hegképződés vagy fibrózis; illetve komplett gyógyulás: regeneráció) (Julier és mtsai., 2017).

Már a filogenezis korai szakaszában megfigyelhető a gyulladás folyamatának kialakulása és a szöveti regenerációs képesség. Számos tanulmány alátámasztotta, hogy az eltérő organizmusokban a sérült szelvények/testrészek helyreállítása fordított korrelációt mutat az immunrendszer komplexitásával (Eming és mtsai., 2007; Godwin és mtsai., 2013). Az első adatok ezen megfigyelés alátámasztására góték szemlencse regenerációjának tanulmányozásából származnak (Godwin és Brockes, 2006). A szemlencse regenerációja speciális módon megy végbe (transzdifferenciáció). A dorzális írisz mediálja a sérült lencse helyreállítását, és a sérült lencse indukálja az immunválaszt (Godwin és Brockes, 2006). Sérülést követően az immunrendszer nem csak a fertőzések ellen nyújt védelmet, hanem a makrofágok részvételével megindul a sejtörmelék eltávolítása is a sérülés környezetében. A makrofágok a regeneráció folyamatában, a szöveti átrendeződés (remodelling) és az apoptózis során is kintüntetett szereppel bírnak (Julier és mtsai., 2017).

A jelenlegi publikációk nagyjából a regeneráció és a fejlődési folyamatok közötti kapcsolatokat vizsgálták. A regeneráció morfológiailag jól tanulmányozott, de a részletes molekuláris mechanizmusról és az immunbiológiai folyamatok kapcsolatáról kevés adattal rendelkezünk. Ezért fő célunk volt az *E. andrei* gilisztafaj anterior és posterior regenerációja során a sejtsztódás és sejthalál kapcsolatának vizsgálata, a folyamatban a makrofág-szerű sejtek (coelomasejtek) részvételének igazolása és az immunválaszban szerepet játszó gének mRNS-expressziójának vizsgálata.

## **4.2. Anyagok és módszerek**

### **4.2.1. A regenerációs kísérletek kivitelezése**

A regenerációs folyamat morfológiai vizsgálatai során az állatokat elbódítottuk (szénsavas vízzel 30-60 másodpercig), majd az első öt (anterior-vég) vagy az utolsó öt (posterior-vég) szelvényt eltávolítottuk. A regenerációs időszak alatt az állatokat talajban tartottuk, a szelvények eltávolítása előtt egy nappal nedves szűrőpapírra helyeztük a gilisztákat, hogy béltartalmuk megfelelően kiürüljön. A regenerációs folyamat 4. napja, 1., 2. és 4. hete végén a regenerációs blastemát is amputáltuk az állatok narkotizálása után, majd a szöveteket kriosztátos fagyasztó médiumban  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A kísérletekben intakt állatokat használtunk kontrollként, ezek esetében a normál szegmenseket (anterior/posterior) távolítottuk el és használtuk a metszetek készítéséhez.

#### **4.2.2. Hisztokémia**

A kriosztátos metszetek (8 µm) készítését követően a tárgylemezeket egy éjszakán keresztül szárítottuk, majd hematoxylin-eozin festést alkalmaztunk a standard protokoll alapján. A poliszacharidok detektálása céljából a metszeteket 10 percig 1 %-os perjódsvanban inkubáltuk, amelyet egy 10 perces Schiff-reagensben történő inkubáció követett.

#### **4.2.3. Enzim hisztokémia**

A metszetek előkészítése a 4.2.2-es pont alapján történt. A savas-foszfataz aktivitás kimutatása céljából a metszeteket fixáltuk, majd 3 órán keresztül a reakciós-mixben inkubáltuk. A reakciós mix összetétele 10 mg naftol AS-BI foszfát (Sigma-Aldrich) dimethylformamidban (DMF) oldva, 4 %-os pararozanilin, 2 %-os vizes hidrogén-klorid és 2 %-os vizes nátrium-nitrit volt. Az inkubáció után a metszeteket nátrium-acetát pufferrel mostuk, majd hematoxylin-kontrasztfestést végeztünk.

#### **4.2.4. Sejtosztódás és sejthalál detektálása, immunfluoreszcencia**

Az osztódó sejtek detektálásakor elsőként EdU-t (12,5 µg, Thermo Scientific) injektáltuk Hamilton-pipetta segítségével a narkotizált állatokba. Az intakt állatok esetén az injektálás az anterior-vég felőli 5. vagy a posterior-vég felőli 5. szelvénybe történt. A morfológiai vizsgálatok során a legnagyobb regenerációbeli változásokat 2 és 4 hét elteltével tapasztaltuk, ezért ezeket az időpontokat választottuk a sejtosztódás kimutatására. A 2 és 4 hetes regenerálódó állatok esetén az EdU injektálás a regenerációs blastema előtti első eredeti (intakt) szelvénybe történt. Négy óra elteltével eltávolítottuk intakt állatok esetében az első vagy utolsó 5 szegmenst, regenerálódó állatok esetében pedig a regenerációs blastemát, majd a szöveteket kriosztátos fagyasztó médiumban -80 °C-on tároltuk és a metszeteket a 4.2.2-es pontban leírt módon készítettük elő. Az osztódó sejteket Click-iT EdU Imaging Kit (Thermo Scientific) segítségével detektáltuk a gyártó által megadott protokoll alapján.

Párhuzamosan, a sejtosztódás kimutatása mellett (nem ugyanazon az állatokon) az apoptotikus sejtek azonosítását is elvégeztük Click-iT Plus TUNEL Alexa Fluor 488 Imaging Assay (Thermo Scientific) alkalmazásával, a megadott protokoll alapján.

Mindkét protokoll lehetővé teszi az antitestes festés alkalmazását, ezért a coelomasejt-alcsoportok kimutatása céljából immunfluoreszcens festést alkalmaztunk. Az elsődleges antitestek felvitele előtt egy 30 perces blokkolási lépést végeztünk (3 %-os BSA + 0,1 % Triton-X/PBS-ben). A következő lépésben alkalmaztuk a biotinnal-konjugált, eleocyta



specifikus anti-EFCC-5 (1:50) és granuláris amoebocytá specifikus anti-EFCC4 (1:100) monoklonális antitesteket (egér IgG). A lemezeket az antitestekkel 1 órán keresztül, sötétben inkubáltuk. Másodlagos reagensként Steptavidin-R-phycoerythrin-t (1:100) (0,1 % Triton-X /PBS-ben) alkalmaztunk szintén 1 órán keresztül, sötétben (Engelmann és mtsai., 2016a alapján). Magfestékként DAPI-t használtunk, a metszeteket PBS-glycerol 1:1 arányú keverékével fedtük le. A metszeteket Olympus BX61 mikroszkóp és AnalySIS software (Olympus Hungary, Budapest) segítségével vizsgáltuk. Többféle negatív kontrollt is alkalmaztunk: (1) EdU helyett PBS-t injektáltunk, illetve (2) EdU-injektált intakt állatokat is használtunk, azonban a Click-it reakciós mixet az Alexa Fluor 488 festék nélkül alkalmaztuk.

#### 4.2.5. RNS-izolálás, reverz-transzkripció és valós-idejű PCR

Az intakt és regenerálódó szövetekből a totál RNS-izolálása NucleoZOL reagens (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) alkalmazásával történt a gyártó által megadott instrukciók alapján. Az RNS-k mennyiségét NanoDrop készülékkel 260 nm-en határoztuk meg, és az RNS mintákat -80 °C-on tároltuk. Ezt követően a reverz-transzkripciót és valós-idejű PCR-t az eredmények I. fejezetében leírt módon hajtottuk végre. A génspecifikus primerek tervezését a Primer Express Software (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük el, az alkalmazott primer szekvenciák az **4.2.5. táblázatban** vannak feltüntetve.

Target gén	Gén Bank accession #	Szekvencia (5'-3') <sup>a</sup>	Amplikon méret (bp)
<i>TLR</i>	JX898685	ATT GTG TCA AAC GCC TTC GC GTC GGC GAT CTC TTC CAA CA	123
<i>Lumbricin</i>	KX816866	ACT CGG AAC GCA AGA ACC AA GGT TCT GCG TGA CCT CCT TC	139
<i>LuRP</i>	KX816867	GGT CGA GAG AAT CAA CCC AAC TA CTT GTG AGC GAT GTC GGC TA	133
<i>Lysenin</i>	D85846	TGA TCC ACA CTG GTG CTT CC CAG GTG CCA AGG AGA AGA AG	117
<i>RPL17</i>	BB998250	GCA GAA TTC AAG GGA CTG GA CTC CTT CTC GGA CAG GAT GA	159

**4.2.5. táblázat.** A felső és az alsó szekvenciák a forward és reverse primereket jelentik.

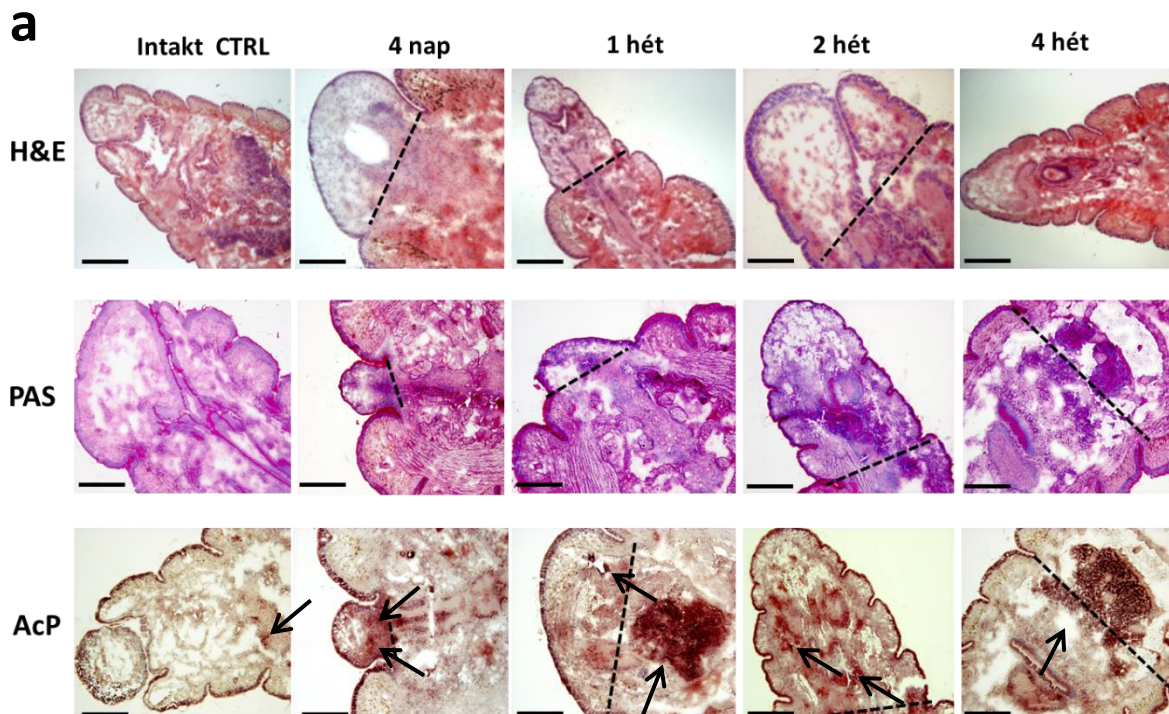
#### 4.2.6. Statisztikai analízis

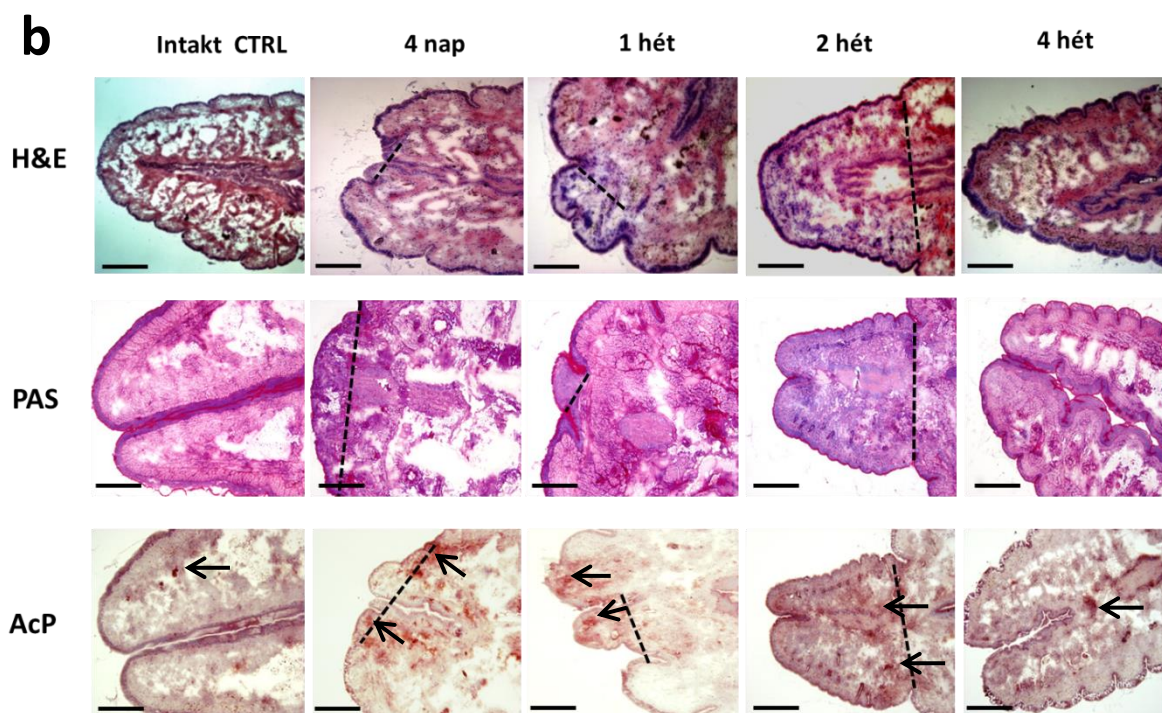
A statisztikai elemzéseket a Prism v5.0 programmal (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) hajtottuk végre. Az adatokat négy független mérés alapján határoztuk meg. Az adatok szignifikanciáját egyutas ANOVA módszerrel értékeltük, Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

### 4.3. Eredmények és megbeszélésük

#### 4.3.1. Az anterior és posterior-vég regenerációs folyamatának morfológiai változásai

A gyűrűsférgek regenerációja morfológiailag jól tanulmányozott, azonban a regeneráció háttérben álló molekuláris és immunológiai folyamatokkal kapcsolatban kevés adattal rendelkezünk. A giliszták regenerációja epimorfózis és morphallaxis útján megy végbe (Berill, 1952; Várhalmi és mtsai., 2008; Engelmann és mtsai., 2018). A regenerációs blastema többféle, morfológiailag elkülönülő sejtből épül fel. Első lépésben, a sebhely a felszínen lévő epiblasztok révén záródik, amelyek differenciálatlan epidermális sejtek. Az alatta lévő rétegekben található a myoblasztok, amelyek a differenciálatlan testfalból és bélcsatornából eredeztethetők. Az alsóbb rétegekben endoblasztok és migratorikus képességgel rendelkező mezodermális sejtek is megfigyelhetők (Várhalmi és mtsai., 2008). Munkánk során elsőként hisztokémiai festéseket végeztünk az anterior (**4.3.1a ábra**) és posterior (**4.3.1b ábra**) regeneráció folyamata során a regenerációs blastema megjelenésétől (4. nap) a regenerációs folyamat végéig (4 hét). A hematoxilin-eozin (H&E) festés segítségével jól látható az új szelvények képződése és a szövetek újrászerveződése mind az anterior (**4.3.1a ábra**) mind a posterior (**4.3.1b ábra**) regeneráció folyamata során.





**4.3.1. ábra.** Az intakt kontroll (CTRL) és regenerálódó (4. naptól 4. hétig) állatok elülső, anterior (**a**) és hátsó, posterior szegmenseinek (**b**) hematoxilin-eozin festése (H&E), perjódsvav-Schiff (PAS) és savas-foszfataáz (AcP) festése. AcP-pozitivitás: nyilak. Méretarány: 100  $\mu$ m.

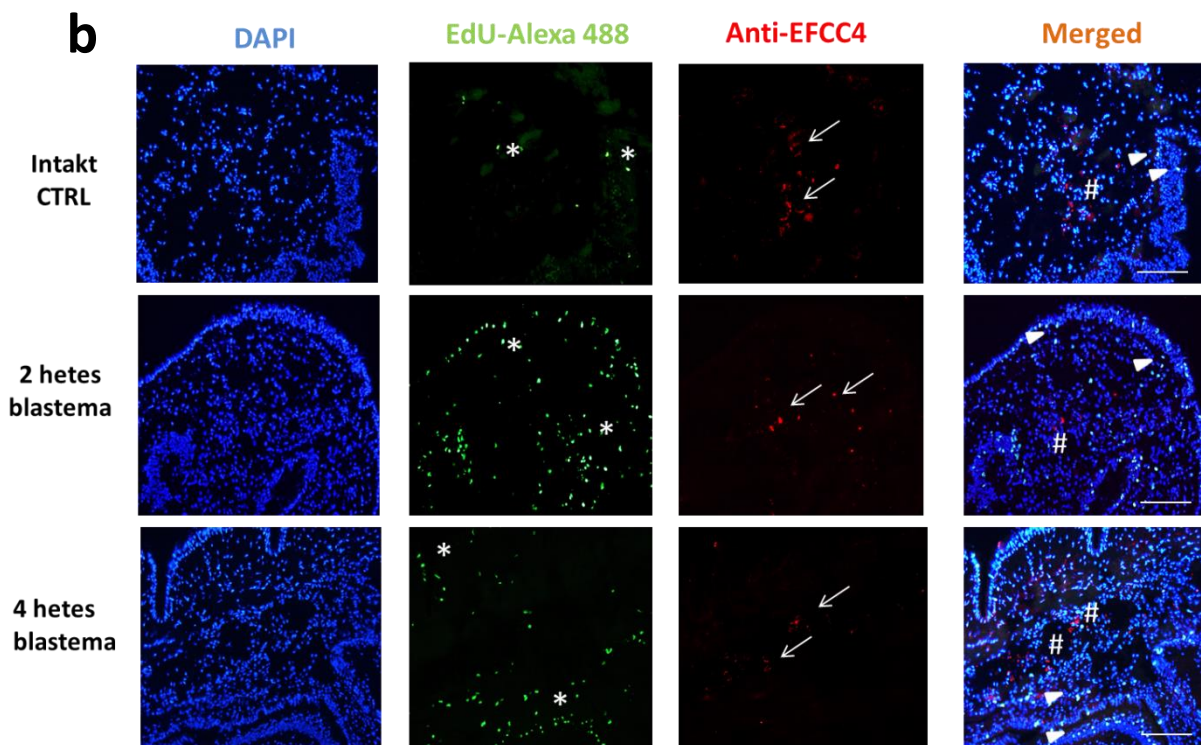
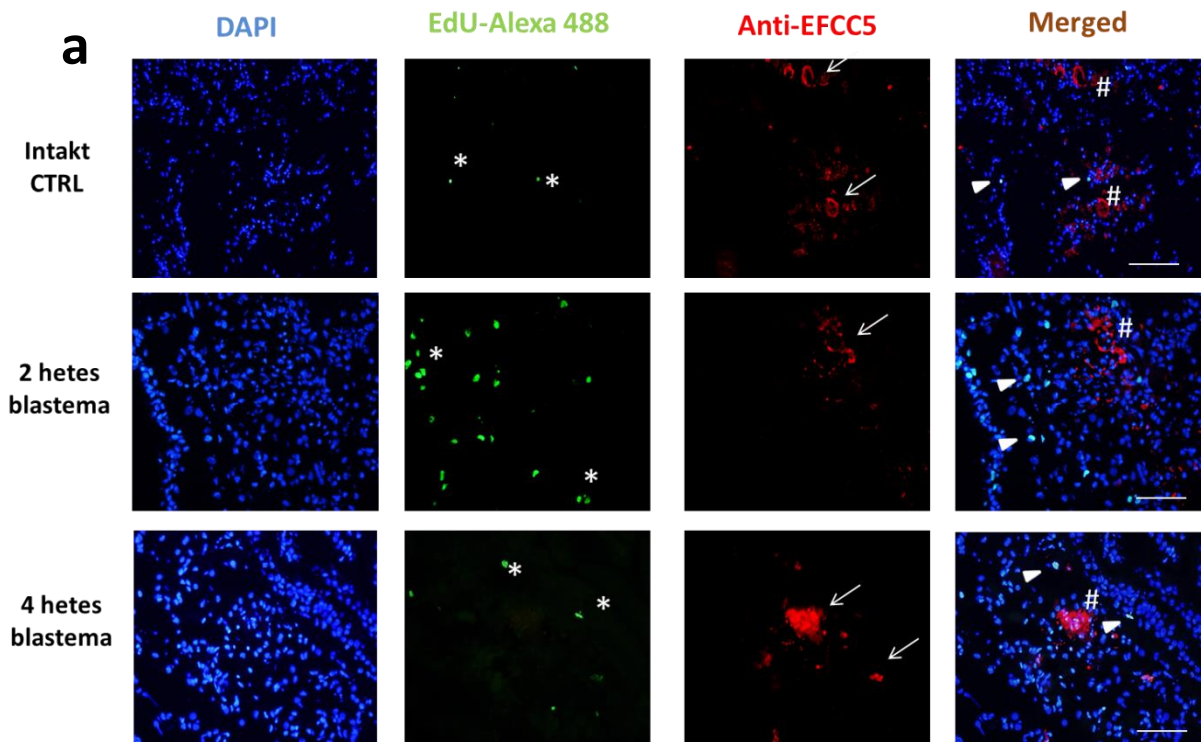
A PAS festés, amely a szénhidrátok/glikogén-kimutatására alkalmas (Engelmann és mtsai., 2016a), nem mutatott lényeges különbségeket az intakt és regenerálódó állatok között sem az anterior, sem a posterior regeneráció folyamatában. Ezzel szemben AcP festés segítségével mindegyik folyamat során lényeges különbségeket figyeltünk meg az intakt és regenerálódó állatok között. A savas-foszfataáz a lizoszómális aktivitás egyik markere (Engelmann és mtsai., 2016a), illetve az autofágia miatt megnövekedett lizoszómális-aktivitás egyik jele is lehet (He és Klionsky, 2009).

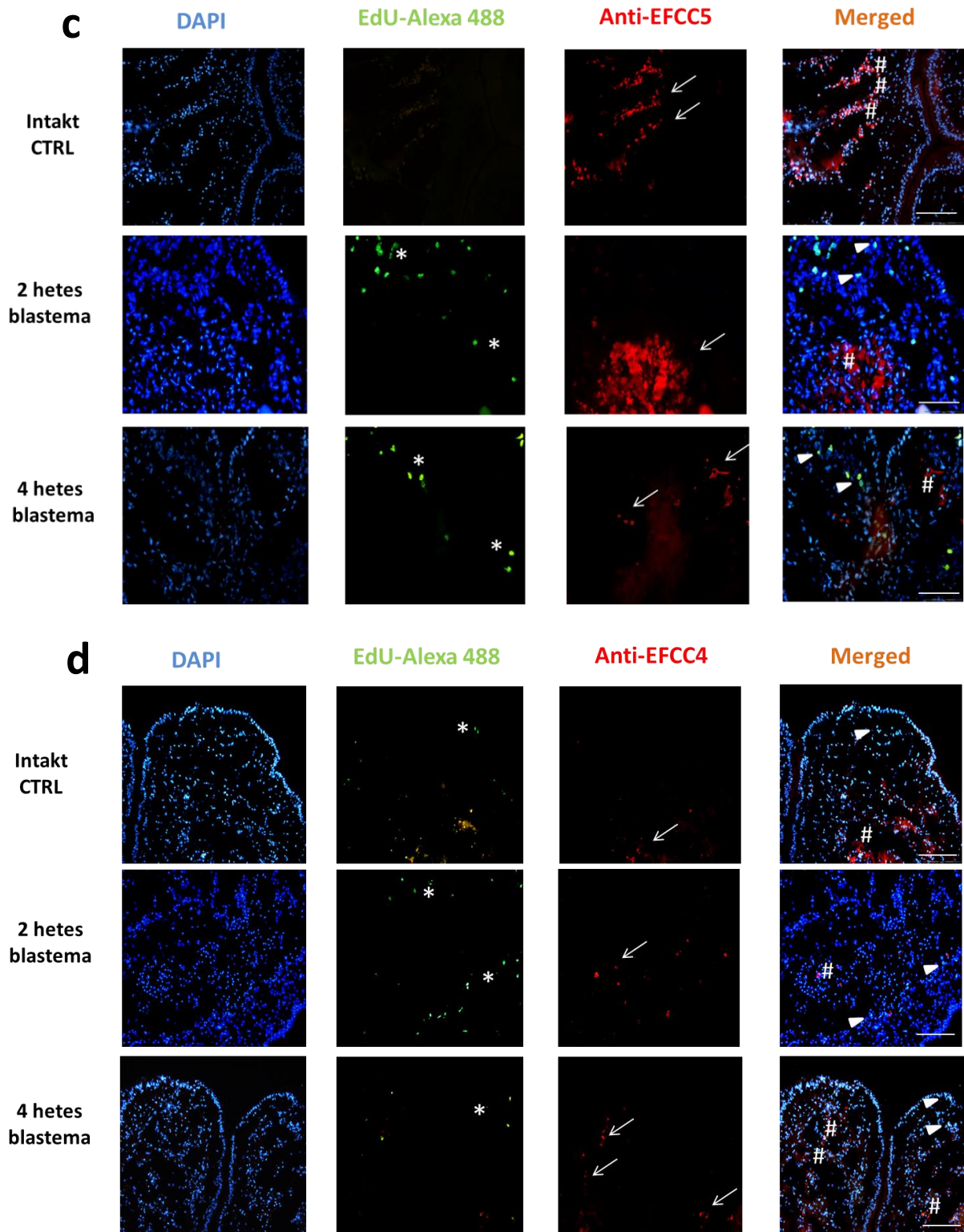
#### **4.3.2. Az eleocyták és granuláris amoebocyták blastemába vándorlása az anterior és posterior-vég regenerációja során**

Munkánk során konzervált sejtbiológiai és immunbiológiai folyamatokat vizsgáltunk *E. andrei* gilisztafaj anterior és posterior regenerációja során. Továbbá, összefüggéseket kerestünk a celluláris és molekuláris immunbiológiai folyamatok között. A sejtsztódás kimutatása céljából az intakt, 2 és 4 hetes regenerálódó állatok esetében (az időpontokat a hisztokémia alapján választottuk, itt voltak a legszembetűnőbbek a morfológiai különbségek) EdU-festést végeztünk. Vizsgálataink során elsőként mutattunk ki osztódó sejteket *E. andrei* gilisztafaj anterior és posterior regenerációja során (**4.3.2a-d ábra**). A módszer segítségével nyilvánvalóvá vált, hogy a kéthetes regenerálódó állatoknál jóval több az osztódó sejtek

menyisége az anterior és posterior regeneráció (8 független kísérlet átlagaként 371 osztódó sejt az anterior, és 220 a posterior blastemában) alatt, mint az intakt (8 független kísérlet átlagaként 59 osztódó sejt az anterior, és 10 a posterior vég esetében) és 4 hetes (8 független kísérlet átlagaként 169 osztódó sejt az anterior, és 50 a posterior blastemában) regenerálódó állatoknál. Megfigyeléseink alapján a sejtosztódás az anterior regeneráció során jóval kifejezettebb, mint a posterior regeneráció folyamatában (nem mutatott eredmények).

Összehasonlítva a BrdU-festéssel, ez a módszer egy jóval gyorsabb és megbízhatóbb eljárás, amelynek során nincs szükség HCl-as feltárássra, így az epitópok nem sérülnek. Ezáltal lehetőségünk nyílt immunhisztokémiai lépések végrehajtására is. Jelen munka során, a már korábban használt anti-EFCC5 (eleocyta/lysenin) és anti-EFCC4 (granuláris amoebocyta specifikus) monoklonális antitesteket alkalmaztuk (Engelmann és mtsai., 2005; Engelmann és mtsai., 2016a), azért, hogy igazolni tudjuk a coelomasejtek részvételét a regenerációs folyamatokban. Már korábban bizonyították, hogy a veleszületett immunrendszer celluláris és humorális komponensei nélkülözhetetlen szerepet játszanak a regenerációs folyamatokban, aktivitásuk meghatározza a regeneráció sikerességét (Abnave és Ghigo, 2018). Korábban is ismert volt, hogy a coelomasejtek valamilyen szinten részt vesznek a sebgyógyulás és regeneráció folyamatában (Liebmann, 1943). Eredményeink alapján az eleocyták és granuláris amoebocyták is az újonnan képződő szegmensekbe vándorolnak. Azonban az anterior regeneráció folyamatában sokkal kevesebb anti-EFCC5 pozitív eleocyta, és anti-EFCC4 pozitív granuláris amoebocyta volt megfigyelhető még 2 és 4 hét után is, összehasonlítva a posterior regenerációval (**4.3.2a-d ábra**).





**4.3.2. ábra.** A sejtosztódás kimutatása és a coelomasejtek (eleocyták/anti-EFCC5 pozitív sejtek (**a** és **c**) és a granuláris amoebocyták/anti-EFCC4 (**b** és **d**) pozitív sejtek) részvételének igazolása az intakt, 2 és 4 hetes anterior (**a** és **b**), illetve a 2 és 4 hetes posterior (**c** és **d**) regeneráció folyamatában. Csillagok: EdU-pozitív sejtek, nyilak: anti-EFCC5 (lysenin) és anti-EFCC4 pozitív sejtek, nyílhegyek: egyesített (merged) EdU-pozitív sejtek, számjelek: egyesített (merged) anti-EFCC5 és anti-EFCC4 sejtek. Méretarány: 50  $\mu$ m.

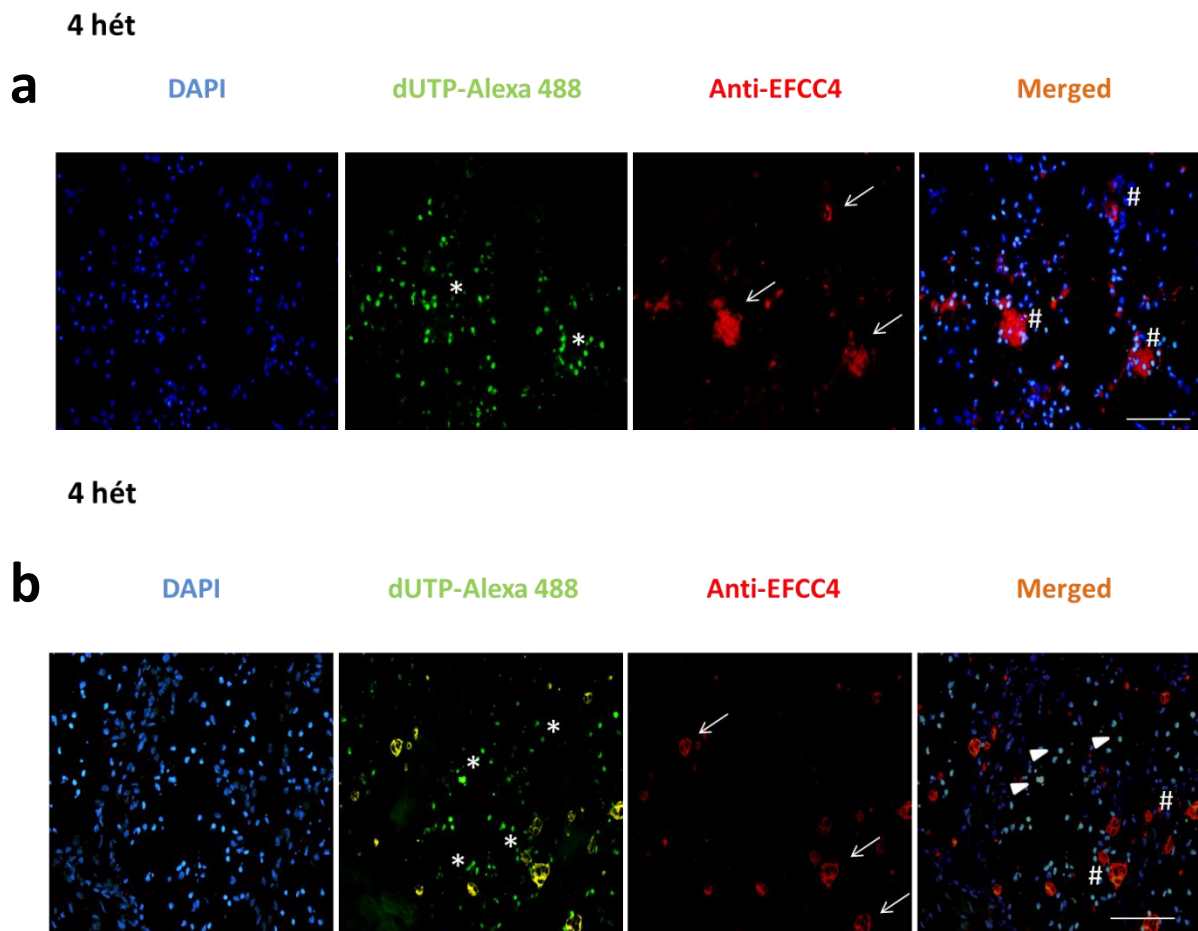
Ezzel szemben a posterior regeneráció során már a második hét elteltével anti-EFCC5 pozitív, eleocyta-csoportosulásokat figyeltünk meg a regenerációs blastema lacunáiban (**4.3.2c ábra**). A lysenin-szekretáló eleocyták jelenléte, így az antimikrobiális környezet kialakítása a regenerációs folyamatban összekapcsolódhat a kórokozók elleni védelemmel. Megfigyeléseinket alátámasztja, hogy korábban a rákok központi idegrendszerének regenerációja során kimutatták az immunsejtek aktív részvételét (Chaves da Silva és mtsai., 2013). Továbbá bizonyított, hogy számos antimikrobiális faktor (*theromacin*, *neuromacin*, *Hm-lumbricin*) képes a sérült axonok helyreállításának fokozására *H. medicinalis* pióca faj esetében (Schikorski és mtsai., 2008).

Az anti-EFCC4 pozitív, migrációra és fagocitózisa képes granuláris amoebocyták is jelen voltak a regenerációs blastemában, de nem csak a coelomaüregekben, hanem a testfalban és izomzatban is (**4.3.2b és d ábra**). Ez a megfigyelésünk egybevág a szakirodalommal, miszerint a szegmensek eltávolítását követően a coelomasejtek fagocitáló csoportja képes a sérülés közelébe vándorolni és ott a sérült epitheliális és izomsejteket eltávolítani (Cooper és Roch, 1984).

### **4.3.3. A programozott sejthalál kinetikája és effektor coelomasejtek megjelenése a regenerációs blastémában**

A sejtosztódással párhuzamosan a programozott sejthalál (apoptózis) folyamatát is vizsgáltuk Click-iT TUNEL-assay segítségével, mellyel az apoptotikus sejtek jelenléte volt kimutatható az anterior és posterior regenerációs folyamatok során. Az apoptózis két hullámban mutatott nagyobb intenzitást (nem mutatott adatok), azonban a legnagyobb mértékű sejtpusztulást a 4 hetes anterior (**4.3.3a ábra**) és posterior (**4.3.3b ábra**) regenerálódó állatokban volt kimutatható. A programozott sejthalál nem csak a transzdifferenciáció szakaszában fontos, hanem a regenerációs folyamat elindulásakor is. Például a pusztuló sejtek szignálokat (szolubilis ágenseket) bocsáthatnak ki, és szignál transzdukciós utakat aktiválnak. Hidra regenerációja során (a fej és láb regenerálása körülbelül három nap alatt lezajlik) megfigyelték, hogy az apoptózis két hullámban megy végbe. Kettévágás hatására egy órán belül egy masszív, apoptotikus hullámot láthatunk, a másik hullámot csak jóval később tapasztalhatjuk. Ez az aszimmetrikus hullám szerepet játszik a fej regenerációjában, mert a pusztuló sejtek Wnt3-at bocsátanak ki, amely aktiválja a Wnt/ $\beta$ -catenin útvonalat, ezáltal megindítja a sejtproliferációt (Vriz és mtsai., 2014). Egy planárián végzett összehasonlító tanulmányban megállapították, hogy a regeneráció során számos sejt feleslegessé válik vagy a szimmetria helyreállítása alatt nem megfelelő pozícióba kerül, így többféle sejttípus

eliminálódhat az apoptózis által (Tettamanti és mtsai., 2008). *Drosophila* lárva esetében a sejtek 60 %-nak irradiálása után a szárny imaginális diszkuszai képesek a normál méret helyreállítására, amely apoptózis indukálta proliferáció útján valósult meg (Holstein és mtsai., 2011; Vríz és mtsai., 2014). A zebrahal farokúszó regenerációjánál is két hullámban tapasztalható az apoptózis, elsőként a kezdeti sebgyógyulásnál, később pedig a szöveti átrendeződés folyamatában (Vríz és mtsai., 2011). Mindezek alapján beszélhetünk, egy ún. regeneratív sejthalálról, amely kísérlet sorozatunk során is tapasztalható volt, legintenzívebben a „remodelling” fázisban (4.3.3a és b ábra).



**4.3.3. ábra.** Apoptózis kimutatása a 4 hetes blastemában az anterior (**a**) és a posterior (**b**) regenerációs folyamat során. A TUNEL-pozitív sejtek száma 4 hét után volt a legmagasabb, egyidejűleg csak a granuláris amoebocyták (anti-EFCC4-pozitív sejtek) voltak jelen az apoptotikus sejtek körül. Csillagok: TUNEL-pozitív sejtek, nyilak: anti-EFCC4-pozitív sejtek, nyilak: összeillesztett (merged) TUNEL-pozitív sejtek, számjelek: merged anti-EFCC4-pozitív sejtek. Méretarány: 100 µm.

Eredményeink alapján az anti-EFCC4 pozitív sejtek megtalálhatóak voltak az apoptotikus sejtek körül, és feltehetőleg azok eltakarításában vesznek részt (4.3.3a és b ábra). Korábban gerincesekben leírták, hogy a veleszületett immunrendszer sejtípusai (neutrofil granulocyták, monocyták, stb) a sérülés helyére vándorolnak és részt vesznek az elhalt részek



eltávolításában és a kórokozók elleni védelemben, ezáltal hozzájárulnak a sikeres sebgyógyuláshoz, és a helyreállítási folyamatok megindulásához (Eming és mtsai., 2017). Zebrahal farokúszó regenerációjában a makrofágok szerepe jól dokumentált, és nélkülözhetetlen a sikeres szöveti regenerációhoz (Morales és Allende, 2019). A fagocita sejteknek magában a szöveti újrászerveződés folyamatában is szerepük van, a második apoptotikus hullám megengedi a létező struktúrák átrendeződését és a coelomasejtek jelenléte befolyásolja a blastemaképződés és regeneráció sikerességét (Okrzesik és mtsai., 2013; Molnár és mtsai., 2015).

#### **4.3.4. Az immunválaszban szerepet játszó gének mRNS expressziós változásai az anterior és posterior regeneráció folyamata során**

Munkánk során a regeneráció celluláris mechanizmusai mellett a molekuláris szintű változásokat is vizsgáltuk. A hasonló témájú tanulmányok (gyűrűsférgék és magasabb rendű szervezetek esetén is) eddig főként a fejlődésben szerepet játszó gének expressziójára koncentráltak. Elmondhatjuk, hogy már a blastema formálódás korai szakaszában a blastema transzkripcionálisan aktívvá válik. Transzkriptom analízis számos *Hox*-klaszter gén, *GMP*-gének, a *Wnt*-jelátviteli útvonal génjei (köztük a *β-catenin*), *glutamin-szintetáz*, *twist*, *miRNS*-ek, a *grimp* és *tuba* expressziójának változásait állapította meg a regeneráció során (Tadokoro és mtsai., 2006; Níva és mtsai., 2008; Takeo és mtsai., 2008 és 2010; Steinmetz és mtsai., 2010; Bely és Sikes, 2010; Pfeifer és mtsai., 2012; Huang és mtsai., 2012; Pfeifer és mtsai., 2013; Novikova és mtsai., 2013; Özpolat és Bely, 2015; Kozin és Kostyuchenko, 2015; de Jong és Seaver, 2016).

Gyűrűsférgeknél az immunválaszban szerepet játszó gének (PRR és AMP-ek) mRNS expresszióját eddig még nem vizsgálták a regeneráció folyamatában. Gilisztában egyelőre nem ismerjük a TLR-szignalizáció következményeit, de gerincesek esetében a TLR-aktiváció inflammatorikus citokinek (pl. TNF $\alpha$  és INF $\gamma$ ) szintéziséhez vezet (Chen és DiPietro, 2017), rovaroknál azonban a Toll ligand kötése antimikrobiális peptidek termelődését idézi elő (Ganesan és mtsai. 2011). Kísérleteink során ezért vizsgáltuk a *TLR* (PRR), és az antimikrobiális tulajdonságú fehérjék (*lysenin*, *Lumbr* és *LuRP*) expressziós mintázatát az anterior (**4.3.4a ábra**) és posterior (**4.3.4b ábra**) regenerációs folyamat (1. héttől a 4. hétig) során.

Munkánk során az intakt állatokhoz képest főként csökkent mértékű génexpressziós mintázatot figyeltünk meg. Kísérleteink során a *TLR*-expresszió csökkenését tapasztaltuk a

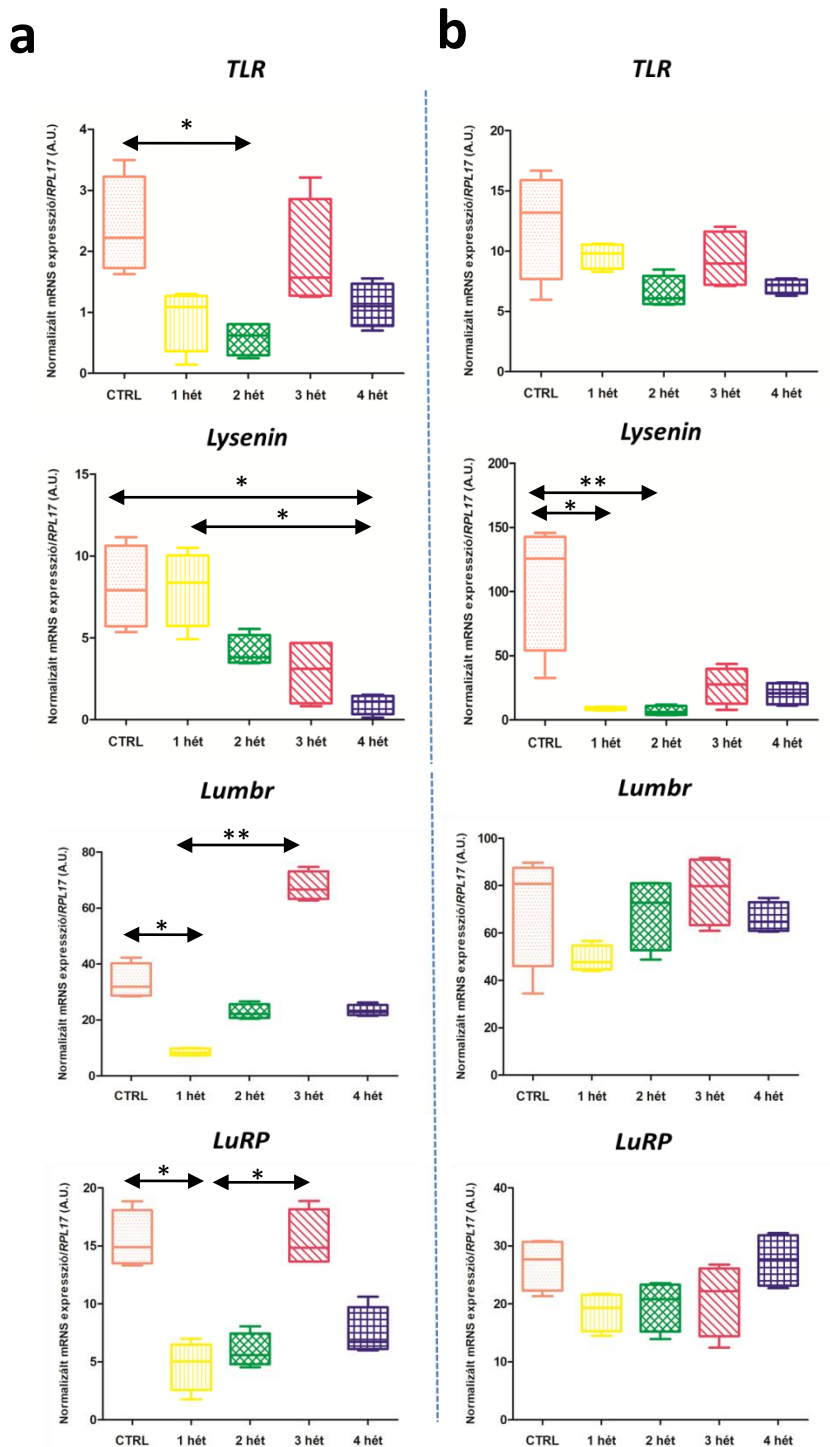
regenerációs folyamat alatt (**4.3.4 a és b ábra**). A *Lumbr* és *LuRP* prolin gazdag AMP-ek (Bodó és mtsai., 2019) esetén is szembeűnő, hogy amíg a sejtosztódás kifejezett (2. hét), az AMP-ek mRNS expressziója csökkenést mutatott, azonban a 2. hét után a sejtosztódás lényegesen csökken, és ekkor a mRNS expressziós mintázat növekedését tapasztaltuk (**4.3.4a és b ábra**). Az *Eisenia*-specifikus lysenin, egy többféle funkcióval (citotoxikus, antibakteriális) rendelkező molekula (Opper és mtsai., 2013). A *lysenin* expresszió csökkent a legkifejezettebb mértékben mind az anterior és posterior regenerációs folyamatok során, és a tartósan redukált expresszió jellemző volt a megfigyelt regenerációs periódusra, ellentétben a *Lumbr* és *LuRP* szintekkel (**4.3.4a és b ábra**).

Emlősöknél a sérülést követően a patogéneket és a „danger szignálokat” (pl. hősokk fehérjék, extracelluláris ATP, IL-1 $\alpha$ , IL-33) a TLR-ok és más PRR-ok ismerik fel, majd az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor aktivációján keresztül gyulladáshoz vezetnek. A TLR és NF- $\kappa$ B aktiváció a gyulladás indukciója révén negatívan szabályozza a sérülések kezdeti regenerációját (Mescher és Neff, 2005; Chen és DiPietro, 2017).

Előzetes tanulmányok alapján az *axolotl* esetében megfigyelték, hogy bőrsérülést követően egy attenuált immunválasz szükséges a tökéletes gyógyuláshoz, a *Xenopus* ebihalaknál a láb regenerációjának esetében az immunválasz génjeinek későbbi aktivációját figyelték meg (Godwin és Rosenthal, 2014). Egy hipotézis szerint az adaptív immunrendszer kifejlődése szab gátat a regeneráció folyamatának és idézi elő csupán a sebgyógyulást a magasabb rendű gerincesek esetében (Vitulo és mtsai., 2017).

Összefoglalásként, elmondhatjuk, hogy a vizsgált gének alulműködése a blastemát alkotó sejtek éretlen természetére utalhat, továbbá a blastema sejtek metabolizmusa is eltérhet a differenciálódott szövetektől. Egy másik elmélet az immunválaszban szerepet játszó gének „down-regulációját” a regeneráció folyamatában az egyes allokációs stratégiákkal és a „trade-off” modellel magyarázza. A regeneráció képessége, csakúgy, mint az aszexuális agametikus reprodukció (pl. hasadás, bimbózás) egy poszt-embrionális képességnek számít (Bely és Nyberg, 2010). Egy új képesség hozzáadódása az organizmus repertoárjához, az előzetes „forrás” allokáció módosítását feltételezi. Az egyes allokációs-stratégiák meglehetősen nagy energia-ráfordítást igényelnek. Ezek a stratégiák lehetnek például a szomatikus növekedés, a regeneráció és az aszexuális agametikus reprodukciós képesség (Bely és Nyberg, 2010; Zattara és Bely, 2013). Ha egy élőlény valamelyik életmenet stratégiába több energiát allokál, a többi stratégia negatív korrelációba kerül az aktuálisan preferálttal szemben („trade-off”). Gyűrűsféreg esetében a regeneráció során az elsődleges cél, az elvesztett szelvények minél hamarabbi pótlása. A „trade-off” értelmében pedig ezen idő alatt a felvett forrás nagy része a

regenerációs mechanizmusra fordítódik, és így kevesebb energia jut a védekező mechanizmusokra (Zattara és Bely, 2013).



**4.3.4. ábra.** A célgének (*TLR*, *lysenin*, *Lumbr*, *LuRP*) expressziós mintázata az anterior (**a**) és a posterior (**b**) regenerációs folyamat (1-4. hét) során. A box-plotokon a mediánt, az interkvartilis és a legalacsonyabb/legmagasabb kvartilis terjedelmeket ábrázoltuk. A  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az eredményeinket *RPL17* mRNS szintjéhez normalizáltuk és négy független mérést végeztünk ( $n=4$ ,  $\pm$ SEM).

#### 4.4. Konklúzió

A regenerációs képesség törzsfejlődésileg ősi tulajdonság, melynek sikerességét számos faktor határozza meg. Mai elképzelések szerint a regeneráció az embrionális fejlődési folyamat egy alternatív módjaként értelmezhető. A legtöbb tanulmány igen nagy hangsúlyt fektet a fejlődés és regeneráció közötti párhuzamok felderítésére. Számos hipotézist sikerült felállítani, miért és hogyan veszett el a regenerációs képesség a filogenezis során. Az egyik szerint az immunrendszer szerepe döntő a regenerációs folyamatban, illetve a regenerációs kapacitás fordítottan arányos az immunrendszer fejlettségével. A sérülés hatására egy lokális gyulladás indul el, amely a gyógyulási folyamatot negatívan befolyásolja. Szöveti makrofágok, monocyták, neutrofilek aktivációja és mobilizációja kezdődik el, a sérülés pedig egy gyors sebgyógyulást igényel. A sebgyógyulási folyamatban kitüntetett szerepet játszanak az M2 (alternatív útvonalon aktivált) makrofágok, melyek anti-inflammatorikus tulajdonságaik révén vesznek részt a sebgyógyulásban (a regenerációs fázisban már nincs gyulladás). A makrofágok szerepe döntő a regenerációs folyamatban, de különböző T-sejt alcsoportok (Treg, Th<sub>2</sub> és  $\gamma\delta$ T-sejtek) részvétele is bizonyított (Gieseck és mtsai., 2018).

Kísérleteink során a regeneráció morfológiai lépéseit és az immunbiológiai folyamatokat vizsgáltuk az intenzív regenerációs képességgel rendelkező *E. andrei* gilisztafajban (ahol csak a veleszületett immunrendszer van jelen). Eredményeink alapján morfológiai különbségek vannak az anterior és posterior regeneráció során, a coelomasejtek (makrofág-szerű sejtek) részt vesznek a regeneráció folyamatában, de az immunválaszban szerepet játszó gének mRNS expressziója (PRR, AMP) alacsonyabb mértékű expressziós mintázatot mutatott az intakt állatokhoz képest. Számos karakterisztikus sejt és génszintű változást figyeltünk meg a gyűrűsférgék immunválaszában, amely párhuzamba állítható más gerinctelen fajok regenerációja során megfigyelt immunológiai változásokkal, illetve a sikeres regenerációs képesség oka lehet, hogy a blastema időlegesen egy immunológiailag tolerált terület.

### *Eredmények III.*

#### **5. Evolúciósan konzervált stressz és immuntoxikológiai folyamatok: ezüst és arany nanopartikulumok *in vitro* kölcsönhatásának vizsgálata gerinctelen immunsejteken**

A téma alapjául szolgáló publikáció:

Engelmann P., Hayashi Y., **Bodó K.**, Molnár L. (2016b) in *Lessons in immunity: from single cell organism to mammals*, ed. L. Ballarin and M. Cammarata, Elsevier, Amsterdam, 1stedn., 2016, ch. 4, pp 53-66.

**Bodó K.**, Hayashi Y., Gerencsér G., László Z., Kéri A., Galbács G., Telek E., Mészáros M., Deli A. M., Tolnai G., Kokhanyuk B., Németh P., Engelmann P. Species-specific sensitivity towards noble metal nanoparticles: a multiparametric *in vitro* study of OECD standard soil sentinels (elbírálás alatt).

## **5.1. Bevezetés**

### **5.1.1. A nanorészecskék definíciója, és jellemzői**

A nanotechnológia egy új szakterület, amely egy teljesen új korszak hírnökének, avagy a következő ipari forradalom úttörőjének tekinthető (Hansen és mtsai., 2008). Ez a technológia magában foglalja az atomi, molekuláris és makromolekuláris területeken történő kutatásokat és fejlesztéseket, melyekben az alkotóelemeket nanométeres skálán értelmezzük. A különféle nano-méretű anyagok hajlamosabbak a kémiai reakciókra, különböző erősségű vagy eltérő elektromos tulajdonságaik révén mobilisabbak lehetnek a nagyobb méretű, hasonló anyagoknál. Az Európai Bizottság 2011. október 18-án a következőképp határozta meg a nanopartikulumok (NP-ok) fogalmát: természetes, esetleges gyárilag előállított anyagok, melyek a partikulumokat oldott vagy aggregált állapotban tartalmazzák, méretük egy vagy több dimenziós skálán 10 és 100 nm közötti tartományban mozog (McShan és mtsai., 2014). Gyártásuk és használatuk rendkívül gyorsan növekszik, a 2004-es becslések szerint a globális szintű előállításuk és használatuk több ezer tonnára volt tehető, és a 2020-as év végére már el fogja érni a fél millió tonnát. Így biztosnak mondható, hogy a nanotermekek melléktermékei is kikerülnek a környezetbe (Robichaud és mtsai., 2009; Stensberg és mtsai., 2011).

### **5.1.2. A nanopartikulumok, mint potenciálisan káros anyagok**

Számos NP-ot használnak a víz tisztítása, kezelése, és a talajvíz remediációjának folyamata során, amely eredményesnek bizonyult, de nő annak is az esélye, hogy a felhasznált részecskék a vízzel együtt az élő szervezetekbe kerüljenek. Ennek alapján elmondhatjuk, hogy a NP-ok használatának és alkalmazásának számos környezeti kockázata van (Borm és Kreyling, 2004). Ebben a tekintetben a NP-ok megnövekedett felhasználása (ha nem megfelelően szabályozzák) jelentős felhalmozódáshoz vezethet a környezetben (Soni és mtsai., 2015; Lai és mtsai., 2017; Prajitha és mtsai., 2019). A nagyobb mértékű ipari termelés eredményeként annak is növekszik a kockázata, hogy az emberek szervezetébe is bekerülhetnek ezek a részecskék, amelynek többféle módja lehet: inhaláció, dermális kontaktus vagy abszorpció az emésztő traktusból. A nanotoxikológia a toxikológia egy új ágának tekinthető, mely a nanopartikulumok interakcióját és potenciálisan káros hatásait vizsgálja az élő szervezeteken és környezetükön (Das és mtsai., 2016). A NP-ok előállítása egy elektronikus-galvanikus eljárás keretein belül történik, így könnyebben szívódnak fel a szervezetben apró részecskék formájában. Alacsony koncentrációban is képesek a szervezet

egyensúlyának felborítására, az életfolyamatok negatív irányba való befolyásolására. Méretük és esetlegesen más anyaggal való borítottságuk nagymértékben meghatározza a reaktivitásukat, transzportjukat, és toxicitásukat (Oberdörster és mtsai., 2005; Maurer-Jones és mtsai., 2009).

Magasabbrendű élő szervezetek, mint a gerincesek esetében a NP-ok képesek áthatolni a különböző védelmi funkciókat ellátó határfelületeken. Így a belélegzett részecskék átjuthatnak a pulmonális vagy gasztrointesztinális rendszer epiteliális sejtrétegein, bekerülhetnek a vérkeringésbe, majd azon keresztül az egyes belső szervekbe jutva megzavarhatják azok normál működését, de specifikus helyekre is akkumulálódhatnak, pl.: az olfaktorikus idegek segítségével közvetlenül az agyba szállíthatnak károsodást idézhetnek elő az idegsejtekben (McShan és mtsai., 2014).

### **5.1.3. Az arany és ezüst nanopartikulumok: általános jellemzők, kölcsönhatásuk biológiai rendszerekkel**

A fém-nanorészecskék egyedülálló fizikai,- kémiai és optikai tulajdonságaik miatt kitüntetett szereppel bírnak a kereskedelemben és orvostudományban (Soni és mtsai., 2014; Vio és mtsai., 2017; Zhao és mtsai., 2019). Az ezüst (Ag) NP-ok az antimikrobiális tulajdonságuknak köszönhetően a leginkább felhasznált NP-ok a kereskedelmi termékekben, míg az arany (Au) NP-ok főként az orvosdiagnosztikai képalkotásban terjedtek el (Cabuzu és mtsai., 2015; Negut és mtsai., 2018).

Számos tanulmány számolt be a NP-ok (leginkább AgNP) akut és káros (főként citotoxikus) hatásairól. Bizonyított, hogy a kisebb méretű AgNP-ok nagyobb mértékű ROS-képződést idéznek elő, ezáltal az apoptotikus válaszreakció fokozódása következhet be, illetve számos tanulmány mutatott rá a megnövekedett oxidatív stressz és a mitokondriális membrán,- és DNS károsodása közötti erős korrelációra (Hayashi és mtsai., 2012; Tourinho és mtsai., 2012; Zoroddu és mtsai., 2014; Bodó és mtsai., elbírálás alatt). Jól ismert, hogy az AgNP és Ag<sup>+</sup> képes interakcióba lépni a fehérjékkel és aminosavakkal (főként thiol), így megváltoztatva azok szerkezetét, amely a funkciójuk módosulásához is vezet (Kim és Ryu, 2013). A legtöbb esetben az AuNP expozíció nincs hatással a sejtek életképességére és a hatásmechanizmus kimenetele máig ismeretlen. Az eddigi tanulmányok alapján az AuNP toxicitási képessége erősen függ a sejtek vagy sejt kultúrák típusától és az egyes organizmusok fogékonyságától (Tao, 2018). Emellett az AgNP-ok és AuNP-ok interakcióba lépnek a biológiai folyadékokban (pl. sejt kultúrák felülszója, szérum) található fehérjékkel, amelynek eredménye egy bio-molekuláris korona képződése (un. protein korona) (Lai és mtsai., 2017).

Az újonnan kialakult protein koronának feltehetőleg szerepe van a NP-ok felismerésében és azok felvételének folyamatában, illetve a NP-ok biológiai identitásának az evolúciójában (Hayashi és mtsai., 2013; Bodó és mtsai., elbírálás alatt).

#### **5.1.4. Nanorészecskék és coelomasejtek interakciója *in vitro***

A nanotoxikológiai tanulmányokban a mai napig kitüntetett szerephez jutnak a baktériumok és a gerinctelenek, mivel ezek a szervezetek az elsők között találkozhatnak a környezetünkbe került nanorészecskékkel (Maurer-Jones és mtsai., 2009). Mostanáig számos *in vitro* és *in vivo* tanulmány (különböző sejt kultúrákat és szervezeteket alkalmazva) foglalkozott az AgNP toxicitásával, azonban a részecskék biokémiai és immunológiai folyamatokra gyakorolt hatása sokszor nehezen értelmezhető és vitatható (Kim és Ryu 2013; Tao, 2018). A területen mérföldkőnek számított az az *in vitro* tanulmány (Hayashi és mtsai., 2012), amely AgNP-kezelés alkalmazásával összehasonlította a konzervált biológiai folyamatok lezajlását gerinctelen (*E. fetida* coelomasejtek) és gerinces immunsejtek (THP-1, humán akut monocita leukémia sejt vonal) között. A tanulmányt később összekapcsolták *in vivo* vizsgálatokkal is (Hayashi és mtsai., 2016). Érdekes, hogy a nanotoxikológiai vizsgálatok figyelembe veszik filogenetikai szinten a stresszválaszok konzerváltságát, viszont horizontális szinten a közel-rokon fajok közötti különbségeket nem vizsgálják.

A talajlakó giliszták kulcsfontosságú szervezetek, amelyek a talaj, mint ökoszisztéma állapotát jellemzik (Ečimović és mtsai., 2018). Az *Eisenia andrei* és az *E. fetida* giliszták morfológiai tulajdonságaik révén két megkülönböztetett, de szoros rokonságot mutató földigiliszta faj, melyeket széles körben alkalmaznak az ökotoxikológiai és összehasonlító immunológiai vizsgálatok során (Hayashi és mtsai., 2002; Engelmann és mtsai., 2016b). Valójában a két faj természetes életkörülményei alapvető különbségeket mutatnak; pontosabban, az *E. andrei* inkább a komposztban, míg *E. fetida* nedves erdei talajban él, azonban kialakulhatnak vegyes kolóniák is (Rorat és mtsai., 2014). Annak ellenére, hogy a két *Eisenia spp.* már régóta alkalmazott modellszervezet a különböző biológiai vizsgálatokban, pontos genetikai megkülönböztetésüket csak a közelmúltban sikerült megoldani a mitokondriális citokrom-oxidáz (COI) I-es gén alegységére tervezett faj-specifikus primerekkel (Dvořák és mtsai., 2013). A korábbi eredmények eltérő mértékű génextpressziót bizonyítottak a két *Eisenia* faj között a *fetidin/lysenin* alapszintjében (e fehérjék szerepe vitathatatlan a faj-specifikus fehérje-NP komplexek képződésében) (Hayashi és mtsai., 2013).



Munkánk során *E. andrei* és *E. fetida* giliszták immunsejtjeinek kölcsönhatásait vizsgáltuk *in vitro* 10 nm-es nemesfém NP-okkal (AgNP-ok és AuNP) molekuláris és celluláris szinten. Céljaink között szerepelt a NP kezelésekre adott molekuláris és sejtszintű (Bodó és mtsai., elbírálás alatt) válasz megállapítása, a részt vevő antimikrobiális hatással rendelkező peptidek (lysenin, lumbricin, LuRP) szerepének pontos vizsgálata, illetve a két faj érzékenységbeli különbségének a meghatározása.

## **5.2. Anyagok és módszerek**

### **5.2.1. Nanopartikulumok**

A polyvinylpyrrolidone (PVP)- felszínű, 10 nm-es AgNP-ot és AuNP-ot (1 mg/mL, BioPure, OECD standard) a NanoComposix (San Diego, CA, USA) cégtől szereztük be, és 4 °C-on, sötétben tároltuk a gyártó utasításait követve. Az AgNO<sub>3</sub>-ot (oldott Ag) a Sigma-Aldrich-től vásároltuk (Budapest, Magyarország), és 4 °C-on, sötétben tároltuk a gyártó utasításai szerint.

### **5.2.2. Coelomasejtek izolálása és az *in vitro* kezelés körülményei**

*E. andrei* és *E. fetida* giliszták tartása standard laboratóriumi körülmények között történt (az eredmények I. fejezetében leírt módon), csakúgy, mint a coelomasejtek izolálása (Engelmann és mtsai., 2005). A fajok genotipizálása Dvořák és mtsai. (2013) alapján zajlott. A sejtek izolálását, mosását és számolását követően ( $5 \times 10^5$ ), kezeltük őket eltérő koncentrációban (1,25-40 µg/mL) és időtartamban (1-24 óra) a NP-okkal RPMI-1640 sejttenyésztő médiumban (HEPES 3,5 g/L pH 7,4) 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin, Lonza) és 1 % hőinaktivált FBS jelenlétében. A kezelésekhöz 24 lyukú-sejttenyésztő lemezeket használtunk. Egyes kolorimetriás méréseknél interferencia volt várható, ezekben az esetekben fenol-vörös mentes RPMI-t használtunk. Kétszeresen desztillált-vizet (ddH<sub>2</sub>O) alkalmaztunk negatív kontrollként (abban a térfogatban, mint a legnagyobb koncentrációjú AgNP-kezelés), pozitív kontrollként AgNO<sub>3</sub>-ot használtunk (oldott Ag). Az áramlási citometriás mérések alatt csak az amoebocytákra kapztunk, hogy kizárjuk a magas autofluoreszcenciával rendelkező eleocyta alpopulációt (Bodó és mtsai., 2018).

### 5.2.3. A dózis-hatás görbék alkalmazása és a további kísérletekben alkalmazott koncentrációk kiválasztása

A kezelésekhez tartozó lethális koncentrációk ( $LC_x$  értékek) kiszámításához dózis-hatás görbéket készítettünk. A toxicitási mechanizmus további tanulmányozása céljából az AgNP-nál a magasabb koncentrációkat választottuk (15, 30 és 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ki, a pozitív kontrollnál ( $\text{AgNO}_3$ ) a legmagasabb koncentrációt (1.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ahol a kezelés sejtek több mint 95 %-ra hatékony) alkalmaztuk (az ehhez tartozó részletes leírás a releváns publikációban megtalálható: Bodó és mtsai., elbírálás alatt). Az AuNP esetében nem figyeltünk meg toxicitást, egy köztes koncentrációt (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) használtunk. Az áramlási citométeren alapuló funkcionális méréseket (különböző fluoreszcens festékek) az élő/halott sejtek megállapításához használt 7-AAD-vel (Biotium, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) kombináltuk. A gén-, és protein expressziós profil vizsgálatoknál szublethális koncentrációkat alkalmaztunk, amelyek az  $LC_{20}$ -as értékeket jelentették (AgNP: *E. andrei* 2,71  $\mu\text{g}/\text{mL}$  és *E. fetida* 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $\text{AgNO}_3$  0,20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), illetve az AuNP esetében mindkét fajnál a változatlan 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -os koncentrációt használtuk. Dolgozatomban részletesen a génextpressziós és fehérje-szintű változásokat ismertetem, a subcelluláris válaszreakciók vizsgálata (ROS/NO detektálás, mitokondriális membránpotenciál, kaszpáz aktiváció, DNS-károsodás) megtalálható a releváns publikációban (Bodó és mtsai., elbírálás alatt).

### 5.2.4. Génextpressziós profil

A coelomasejteket ( $5 \times 10^5$ ) eltérő időtartamban (2, 12 és 24 h) kezeltük az alacsony toxicitási koncentrációkkal ( $LC_{20}$ ) (AgNP: *E. andrei* 2,71  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; *E. fetida* 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  illetve  $\text{AgNO}_3$ : 0,20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mindkét fajnál) ill. a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AuNP koncentrációval. Minden kondíció esetében öt független biológiai ismétlést végeztünk. A kezeléseket követően a coelomasejteket összegyűjtöttük és kétszer mostuk LBSS-sel (5 perc, 100 RCF). A totál RNS izolálása és cDNS-szintézis a gyártó által megadott protokoll alapján, az eredmények I. fejezetében leírt módon (3. pont) történt, emellett a valós-idejű PCR esetében is ugyanazokat a paramétereket alkalmaztuk (I. fejezet, 3. pont).

A SyBR Green-alapú valós-idejű PCR reakciót a korábbi fejezetekben leírtakhoz hasonlóan végeztük el. A génspecifikus-primerek megtervezése a Primer Express szoftver (Thermo Scientific) segítségével (Bodó és mtsai., elbírálás alatt) valósult meg. Az analízis során a nyers fluoreszcens adatokat használtuk az amplifikáció kinetikájának a számításához, ezért a cDNS templát kezdeti mennyiségét ( $R_0$ ) DART-PCR (Peirson és mtsai., 2003)

segítségével határoztuk meg. Az  $R_0$ -értékek normalizálásához kétféle módszert alkalmaztunk, egyrészt a konvencionális „house-keeping” gén (*RPL17*, mint belső referencia gén) alapú megközelítést illetve az adat-alapú NORMA-gén algoritmust (Heckman és mtsai., 2011). Az utóbbi módszert választottuk, mivel ebben az esetben csökkent az egyes csoportokon belüli variáció (hatékony normalizáció) illetve a csoportok közötti varianciát is minimálisan befolyásolta. Minden időpontban a NORMA-gén algoritmus által normalizált  $R_0$ -értékeket mutattuk be a kontroll értékek geometriai átlagához viszonyítva. A hőtésképeket a  $\log_2$ -transzformált és skálázott adatkészletekre készítettük az R programcsomag (3.5.1. verzió) gplot funkciójának (3.0.1.1 verzió) alkalmazásával.

A génexpressziós adatok többváltozós elemzéséhez főkomponens-analízist (PCA) és korrespondencia-elemzést (CA) végeztünk a FactoMineR (verzió 1.41) (Le és mtsai., 2008) és a factoextra (ver. 1.0.5) szoftverek segítségével. A PCA esetében a génexpressziós értékeket  $\log_2$ -transzformáltuk. A PCA-t az adatok dimenziójának csökkentése érdekében végeztük el, hogy meghatározzuk az általános eltéréseket a különböző kategóriák (fajok, expozíciós időtartam és kezelések, valamint ezek kombinációi) között. A CA-t standardizálás (azaz skálázás) nélkül hajtottuk végre, hogy ábrázolni tudjuk a kezelés-specifikus génexpressziós mintázatok időbeli kinetikáját.

### **5.2.5. A NP-ok körül kialakuló ex-situ protein korona összetételének vizsgálata**

Az AgNP-ok és AuNP-ok körül kialakuló protein korona összetételének tanulmányozása során néhány módosítással ugyanazon módszereket alkalmaztuk, mint amelyeket Hayashi és mtsai., (2013). A sejteket ( $5 \times 10^5$  sejt/mL) 24 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten szérum nélküli (inkomplett) RPMI sejttenyésztő tápoldatban. Ezt követően a felülúszót leszívtuk és centrifugáltuk (5 perc, 500 RCF) a sejtek eltávolítása céljából. A következő lépésben a coelomafehérjét (CP) tartalmazó felülúszókat ismét centrifugáltuk (10 perc, 1700 RCF) és szűrtük (0,22  $\mu\text{m}$ ), majd a CP-t Protein LoBind csövekbe (Eppendorf, Hamburg, Németország) gyűjtöttük. A CP-eket az adott gilisztafaj szerint neveztük el: EaCP-nek (*E.andrei* coeloma protein) illetve EfCP-nek (*E.fetida* coeloma protein). A CP-k fehérje koncentrációját (250-300  $\mu\text{g/mL}$ ) BCA-kittel (Sigma-Aldrich) határoztuk meg. Ezek a koncentrációk nem voltak elég magasak ahhoz, hogy az 1% FBS (400-600  $\mu\text{g}$  fehérje/mL) alternatívájaként szolgáljanak, ezért úgy döntöttünk, hogy a CP-t BSA fehérjével a háttérben megnöveljük. Így összesen 800  $\mu\text{g}$  fehérje/mL koncentrációt értünk el, amelyből 100  $\mu\text{g/mL}$  volt a CP és 700  $\mu\text{g/mL}$  volt a BSA. Ez ötször nagyobb fehérje koncentrációt jelent, amely elegendő ahhoz, hogy elfedje a 20  $\mu\text{g}$  10 nm-es AgNP (így

106  $\mu\text{g}$  fehérje jut 11  $\text{cm}^2$  AgNP felületre) és 10 nm-es AuNP (58  $\mu\text{g}$  fehérje jut 6  $\text{cm}^2$  AuNP felületre) elméleti teljes felületét. E számításoknak megfelelően 1 mL 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNP-ot és AuNP-ot használtunk. A kontrollok esetében, ugyanazt az inkubációs feltételt alkalmaztuk csak CP fehérjék nélkül. A mintákat 24 órán át szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk „end-over-end” rotátoron, majd ezt követően centrifugáltuk (30 perc, 16 kRCF, 21 °C). A centrifugálást követően a felülúszókat eltávolítottuk, és a NP-okat háromszor mostuk PBS-sel (30 perc, 16 kRCF, 21 °C). Az utolsó mosási lépés után a NP-okhoz 2 $\times$ SDS mintapuffert adtunk, és a mintákat 5 percig főztük, majd újabb centrifugálással (30 perc, 16 kRCF, 4 °C) megszabadultunk a pelletté vált NP-októl.

Felhasználásig a felülúszókat -80 °C-on tároltuk, a SDS-PAGE-t és a Coomassie-Brilliant Blue festést standard protokollok szerint végeztük el. A referencia fehérjemintákat közvetlenül a CP-kből készítettük (NP-okkal történő inkubálás nélkül), hogy összehasonlítsuk a NP-ok felszínéről eltávolított fehérjékkel. A géleket egy VilberLourmat Bio-Profil 97 géldokumentációs rendszerrel (Collégien, Franciaország) és egy Biocapture Version 12.6 szoftverrel elemeztük. Elvégeztük a kivágott gélcsíkok fehérje azonosítását kombinált folyadékromatográfiás tandem tömegspektrometriával (LC-MS/MS) és Western blot-tal (WB) a diszkrét csíkok pontos azonosítása céljából. Az LC-MS/MS és a WB mérések pontos részleteit a releváns publikáció melléklete tartalmazza (Bodó és mtsai., elbírálás alatt). (Az LC-MS/MS mérések a Debrecen-i Egyetemen, dr. Csősz Éva segítségével történtek).

### **5.2.6. Fehérje szekréción mintázat**

A fehérje szekréción profil vizsgálat kivitelezése Hayashi és mtsai., (2016) publikációja alapján történt. Első lépésben a coelomasejteket ( $5 \times 10^5$  sejt/minta) 4 és 24 órán át, szobahőmérsékleten kezeltük a megfelelő NP-koncentrációkkal, ugyanazon expozíciós körülmények között, mint amelyeket a génexpressziós vizsgálatban használtunk. A kontrollok esetében ddH<sub>2</sub>O-t adtunk a sejtekhez a NP-ok helyett. Az inkubációt követően a tenyészetek felülúszóit (beleértve az NP-kat) összegyűjtöttük Protein LoBind csövekbe (Eppendorf), centrifugáltuk (5 perc, 500 RCF, RT) a sejtek eltávolítása céljából, majd újra centrifugáltuk (10 perc, 1700 RCF). A fehérjekoncentrációt BCA-kit (Sigma-Aldrich) segítségével határoztuk meg, és 400-600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -re állítottuk be. Ezt követően SDS mintapuffert adtunk a sejtmentes felülúszókhöz és 5 percig főztük őket. Az NP-ok eltávolításához a mintákat centrifugáltuk (30 perc, 16 kRCF, 4 °C), majd SDS-PAGE és Coomassie-Brilliant Blue

festést végeztünk a standard protokoll szerint. Az ImageJ szoftvert (NIH) használtuk a denzitometriás elemzéshez.

### 5.2.7. Statisztikai analízis

Minden kísérletet három független alkalommal ismételtünk meg (kivéve a qPCR-t, ott  $n=5$ ). A statisztikai elemzéseket a Prism v5.0 programmal végeztük el (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A normál eloszlást Shapiro-Wilk normalitási teszt alkalmazásával ellenőriztük. A grafikonokon az adatok átlagát a standard hibával ( $\pm$ SEM) együtt mutatjuk be. Az eredményeket egy-utas ANOVA-val, illetve Kruskal-Wallis teszttel elemeztük, amelyet Dunn post-hoc teszt követett. A valós-idejű PCR-nál a relatív génexpressziós értékeket log-transzformáltuk, hogy megfeleljünk a normalitás feltételeinek. A Student-féle t-tesztet (vagy adott esetben a Welch-féle t-tesztet) az R-ben hajtottuk végre, a Levene-féle variancia homogenitási teszt után. A kontrollok és a kezelések közötti szignifikáns különbségeket az egyes időpontokban  $\alpha=0,05$  értéként határoztuk meg.

## 5.3. Eredmények és értékelésük

### 5.3.1. A koncentráció-függő citotoxicitást csak az AgNP-ok idézik elő, az AuNP nem

Kísérleteink során elsőként meghatároztuk a dózis-hatás görbéket, amelyek alapján kiválasztottuk a megfelelő tesztkoncentrációkat a további szubletális mérésekhez. Az AgNP és AuNP (1,25–40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) illetve AgNO<sub>3</sub> (0,05-1,35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) koncentráció sorozatok 24 órás expozícióját követően a coelomasejtek túlélési arányát 7-AAD-vel, egy sejtmembrán-impermeabilis nukleáris festékkal értékeltük. Az áramlási citometriás elemzésben csak az amoebocytá populációra koncentráltunk, mivel az eleocyták (a coelomasejtek másik fő csoportja) magas riboflavin tartalmuk miatt erős autofluoreszcenciával rendelkeznek (Rorat és mtsai., 2014; Bodó és mtsai., 2018). Mindkét gilisztafaj coelomasejtjei esetében csak az AgNP (és alacsonyabb koncentrációkban az AgNO<sub>3</sub>, de az AuNP nem) koncentrációfüggő citotoxicitást mutatott a vizsgált koncentráció tartományban (Bodó és mtsai. elbírálás alatt). Ez azt is igazolja, hogy az AgNP-ok oldott frakciója (az összes Ag <0,4% -a) nem követte az AgNO<sub>3</sub> kezeléshez beállított koncentráció-válasz görbét. A fajok közötti különbségeket illetően az *E. fetida*-ból származó coelomasejtek nagyobb érzékenységet mutattak az AgNP-okkal és AgNO<sub>3</sub>-kal szemben, mint az *E. andrei* coelomasejtek, a becsült alacsonyabb LC<sub>50</sub> értékek és a meredekebb Hill-Slope-ok alapján (Bodó és mtsai. elbírálás alatt, **5.3.1.**

**táblázat).** Az itt kapott dózis-hatás görbék alapján a nagy koncentrációjú AgNP kezeléseket (15, 30 és 40 µg/mL) választottunk a 24 órás kísérletekhez, valamint egy közbelső AuNP koncentrációt (20 µg/mL), mivel ott a sejtek életképességében nem történt változás. A gén- és fehérje expressziós vizsgálatokhoz az alacsony citotoxikus koncentrációkat (LC<sub>20</sub>) választottuk ki az AgNP és az AgNO<sub>3</sub> esetében, míg az AuNP-kat ugyanabban a koncentrációban alkalmaztuk, mint a fent említett módon (Hayashi és mtsai., 2013).

Fajok	Kezelés	LC <sub>20</sub> (µg/mL)	LC <sub>50</sub> (µg/mL)	Hill-Slope
<i>E. andrei</i>	AgNP	2.76±0.64	6.72±1.71	1.37
<i>E. fetida</i>	AgNP	2.04±0.53	5.24±1.22	1.7
<i>E. andrei</i>	AgNO <sub>3</sub>	0.206±0.04	0.48±0.10	1.49
<i>E. fetida</i>	AgNO <sub>3</sub>	0.207±0.01	0.41±0.01	3.13

**5.3.1. táblázat.** Becsült LC<sub>x</sub> értékek (Bodó és mtsai. elbírálás alatt alapján).

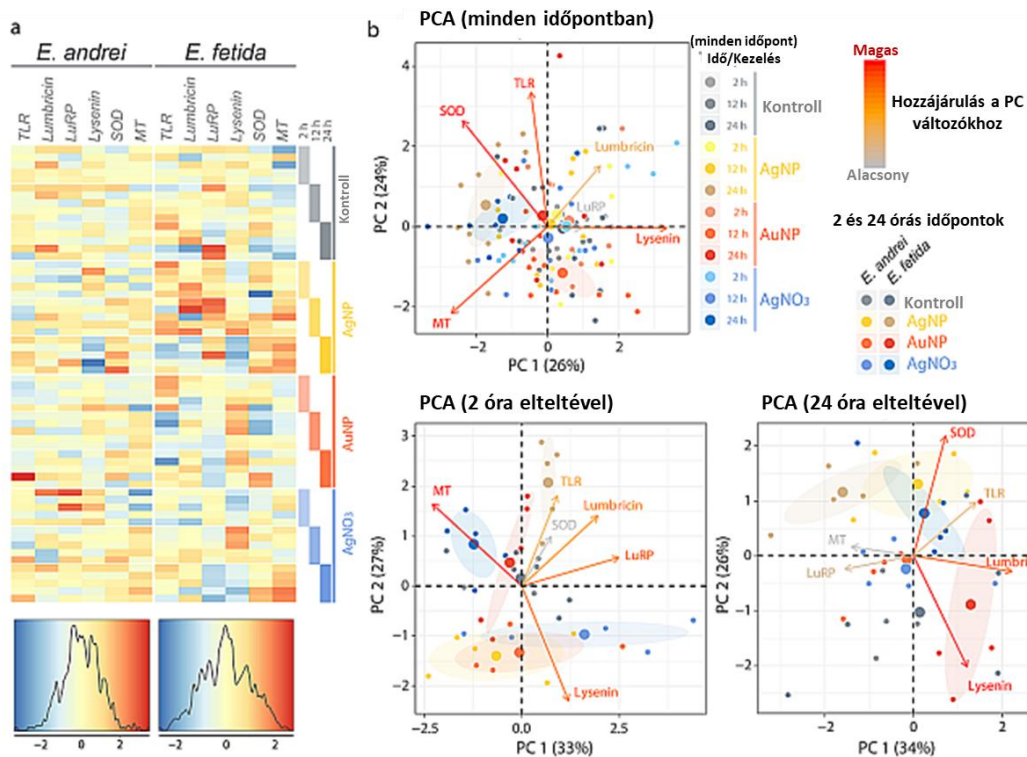
Számos részletes *in vitro* és *in vivo* tanulmány tárgyalja az AgNP-ok toxicitását különböző sejttényezetekben és szervezetekben; azonban a NP-ok biokémiai folyamatokra és immunrendszerre gyakorolt hatása vitatható és számos esetben ellentmondásos (Kim és Ryu, 2013; Tao, 2018). Munkánk során az AgNP-kezelés során kapott eredmények egybevágóak a szakirodalommal, az AgNP már alacsony koncentrációban károsította a coelomasejteket, amely a kis méretüknek is tulajdonítható (Hayashi és mtsai., 2012, Van der Ploeg és mtsai., 2014; Bodó és mtsai., elbírálás alatt). Ezzel ellentétben hasonló válaszokat nem figyeltünk meg AuNP kezeléseket után (Bodó és mtsai., elbírálás alatt; S1c és d ábra). Az AuNP biológiai rendszerekkel való kölcsönhatása meglehetősen ellentmondásos (Unrine és mtsai., 2010; Asharani és mtsai., 2011), bár számos tanulmány foglalkozik az AuNP-ok széles körű toxicitásával (Choi és mtsai., 2012; Lopez-Chaves, 2018).

### 5.3.2. Az AgNP-ok hatása fajtól független és függő hatása a génexpresszióra

A NP-okkal szembeni - fajok közötti- érzékenység különbségének megállapításához több gén expressziós profilját elemeztük (stresszhez kapcsolt: *szuperoxid-dizmutáz-SOD*, *metallothionein-MT*, *mintázatfelismerő receptor: toll-szerű receptor-TLR* és antimikrobiális peptidok: *lysenin*, *lumbricin*, *LuRP*). Multiparametrikus analízist végeztünk: két különböző faj, időkinetika (2, 12 és 24 óra) és különféle kezelések (AgNP, AuNP és AgNO<sub>3</sub>) adatait hasonlítottuk össze. Az AgNP (*E. andrei*: 2,71 µg/mL és *E. fetida*: 2 µg/mL) és az AgNO<sub>3</sub> (0,20 µg/mL mindkét faj esetében) alacsony toxikus koncentrációit (LC<sub>20</sub>-értékek) választottuk a koncentráció standardizálására szolgáló kísérletekhez (kapcsolat megállapítása a két faj között). Az AuNP esetében a nem toxikus koncentrációt (20 µg/mL) használtuk a fentiek szerint.

Az általános mintázatok feltárása érdekében először az egyes fajokra vonatkozó adatkészleteket hőtérképeken ábrázoltuk a z-pontszámok alapján. Így az összes gént azonos módon tudtuk kezelni az inherens expressziós szintektől függetlenül. Az *E. fetida* relatív expressziós profiljai szélesebb z-pontszám-eloszlással rendelkeznek, ezáltal az így kapott hőtérkép szélsőségesebb értékeket mutat, mint az *E. andrei* hőtérképe, ahol az expressziós értékek (z-pontszám nulla) a globális átlag körül fordulnak elő (**5.3.2a ábra**). Ez arra utal, hogy az *E. fetida* coelomasejtek valóban érzékenyebben reagáltak a vizsgált kezelésekre. A z-transzformált adatkészletek felhasználásával PCA-t végeztünk, hogy megkapjuk a globális mintázatot jellemzően a fajokra, kezelésekre vagy időpontokra, vagy az utóbbi kettő kombinációjára (kezelés×idő). Az első két PC (főkomponens) minden esetben a teljes variációk >50%-át elemezte. Annak ellenére, hogy a transzkripciós válaszok mértéke globálisan eltér (**5.3.2a ábra**), az általános génexpressziós mintázat nem különbözött nagymértékben a két faj között (Bodó és mtsai., elbírálás alatt; S3a ábra). Mindkét faj esetében közös, expressziós mintázatot figyeltünk meg a negatív PC1 pontszámú adatoknál: ezeket világosabb színnel ábrázolják az 24 órás AgNP és az AgNO<sub>3</sub> kezelések (Bodó és mtsai., elbírálás alatt, S3b ábra, az átlagpontok sárga és kék színnel lettek jelölve, illetve S3c ábra, narancssárga színű átlagpont). A kezelések és az időpontok kombinálását (24 órás expozíció AgNP-okkal vagy AgNO<sub>3</sub>-tal) egyértelműen jelöltük (**5.3.2b ábra**: „minden időpont”, barnás-sárgával és sötétkékekkel jelölt átlagpontok). A PC1-hez nagymértékben hozzájárul a viszonylag alacsony expressziós szintű *lysenin* (erősen kapcsolódik a 24 órás AgNP és AgNO<sub>3</sub> kezelésekhöz), míg a relatíve magas expressziójú *SOD* és *MT* nagymértékben befolyásolja az 1. és 2. PC alakulását (**5.3.2b ábra**: „minden időpont”). Ezt a

három gént szem előtt tartva a két faj közös és eltérő jellemzőit vizsgáltuk mindkét időpontban, 2 és 24 óra elteltével. A *MT* és a *lysenin* nagymértékben járulnak hozzá az 1. és a 2. PC-hez 2 óránál, amely egyértelműen elkülönítette az AgNP és AgNO<sub>3</sub> kezeléseket a PC1-en, valamint az *E. andrei* és *E. fetida*-t a PC2-n (5.3.2b ábra: „2 órás időpontok”). Érdekes, hogy a koordináták mintázata pontosan ellentétes volt a két faj között, jelezve azt a kontrasztos tendenciát, hogy a 2 órás kezelések elteltével az *E. andrei* alacsony *MT*/magas *lysenin*-profilal, az *E. fetida* pedig magas *MT*/alacsony *lysenin*-profilal rendelkezik. A PC2 úgy tűnik, hogy 24 óra elteltével kihangsúlyozza a két fajra jellemző kezeléseket közötti különbséget, ahol azt láthattuk, hogy a kontrollok és az AuNP kezelésekre magasabb vagy pozitív PC2 pontszámokkal társulnak, míg az AgNO<sub>3</sub> és AgNP kezelésekre magasabb vagy pozitív PC2 pontszámok jellemzőek (5.3.2b ábra: „24 h időpont”).



**5.3.2. ábra.** Hő térkép és főkomponens-elemzés (PCA). Mindkét faj esetén a relatív génexpressziós értékek vannak ábrázolva a hő térképeken, a z-pontszámok eloszlása és a színek alapján. A minták színekkel vannak ellátva, és a kezeléseket három csoportra osztották (2, 12 és 24 óra), amelyek 5 biológiai ismétlésből állnak (a). A PCA-biplotok reprezentálják az egyes fajokhoz tartozó adatokat minden időpontban, vagy külön-külön a 2 és 24 órás időpontokban, ahol a két faj színekkel jelölt. Az egyedi minták (kis pontok) és átlagpontok (nagy pontok) az első két PC koordinátáin a változó együtthatókkal (nyílak) vannak ábrázolva. A 6 változó (gén) hozzájárulása a két PC-hez színskálán jelölt, a szürkétől a vörösig. Konfidencia ellipsziseket rajzoltunk azon mintajellemzők esetében, amelyek átlagos PC-pontszáma nagyobb, mint a többi mintáé (b). Minden időpontban öt független mérést hajtottunk végre, duplikált technikai ismétléssel.



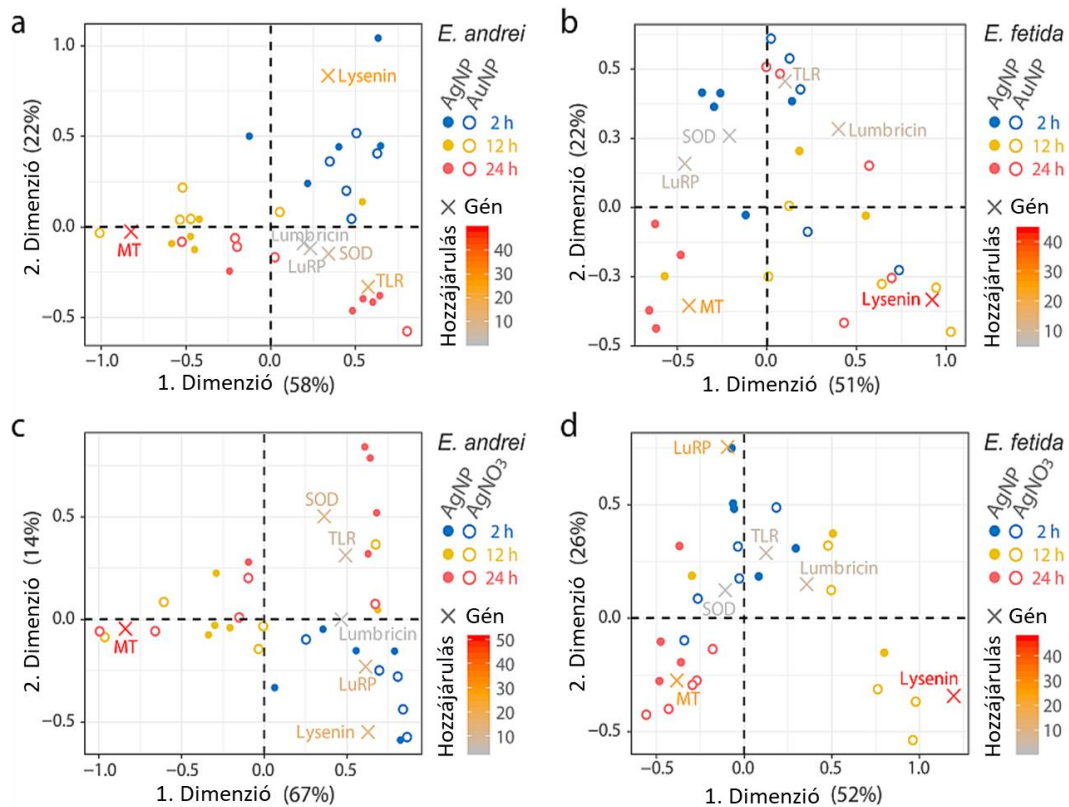
Ez a trend eredményezi a *lysenin* szupresszióját és a *SOD* indukcióját, amely a legszembetűnőbb eredménye az *E. fetida* coelomasejtek AgNP kezelésének. Összességében, a kezelések és az időpontok hatását tekintve a PCA azonosította, hogy a 24 órás időpontban az AgNP és az AgNO<sub>3</sub> kezelések eredményei jellegzetesen különböznek a többitől. Ez a különbség főként a *lysenin* és az *SOD* expressziós mintázatából származott, amely közös mind az *E. andrei*-nél, mind a *E. fetida*-nál. Azonban 2 óra elteltével a két faj ellentétes expressziós profilt mutatott a *lysenin* és *MT* vonatkozásában az összes kezelésnél, jelezve a fajspecifitást, amely az idő függvényében alakulhat ki.

### 5.3.3. Idő- és kezelés-specifikus génexpressziós mintázatok vizsgálata

A PCA-val ellentétben a korrespondencia-analízis (CA) egy közvetlenebb megközelítés a többdimenziós adatkészletek megjelenítéséhez egyszerűbb grafikonokon, z-transzformáció nélkül. Ez megkönnyíti az értelmezést, ha a két kezelés időbeli szempontjait összehasonlítják a génexpressziós-minták közös és eltérő jellemzőinek azonosítása érdekében. (Referenciaként az egyváltozós statisztikák eredményeit az S4-es ábra mutatja be, Bodó és mtsai., elbírálás alatt). A CA-ben az AgNP adatkészleteket közvetlenül összehasonlítottuk az AuNP-mal vagy az AgNO<sub>3</sub>-tal, hogy megállapíthassuk a NP-okra vagy az AgNO<sub>3</sub>-ra jellemző tulajdonságokat. Általánosságban az *E. andrei*-nél és az *E. fetida*-nál is két gén, a *lysenin* és az *MT* járult hozzá leginkább ellentétes irányban az első tengelyhez (1. dimenzió), amely magyarázza az elemzett adatok variációinak > 50% -át (**5.3.3. ábra**). Ez tükrözi a mindkét fajra jellemző, PCA-ban azonosított tendenciát, hogy a *lysenin* akkor indukálódik, ha az *MT*-expresszió alacsony, továbbá hogy a két gén relatív expressziós szintje kifejezettebb, mint a többi vizsgált géné. A második tengely (2. dimenzió) jellemzi az időbeli szempontokat. *E. andrei* esetében a *lysenin* a *SOD* és a *TLR* ellentétes oldalán, az *MT* pedig közepén helyezkedik el, ahol a *lysenin* pozitív korrelációban áll a 2 órás profilokkal, és a *MT* a 12 órás profilokkal (**5.3.3a és c ábra**). Különösen figyelmet érdemel, hogy az AgNP-kezelés és -kisebb mértékben - az AuNP-kezelés szintén negatív korrelációban volt a *lysenin*-nel és pozitívban a *SOD/TLR*-ral a 24 órás időpontban. Ez azt mutatja, hogy függetlenül a kezelés típusától, a *lysenin* 2 óra elteltével indukálódik, majd 24 órára represszálódik, míg az *MT* akkor indukálódik, amikor a *lysenin* expresszió újra a kiindulási szinthez ér, 12 óra elteltével. Egyidejűleg az AgNP/AuNP kezeléseknél tapasztalható 24 órás *lysenin* szupresszióval (AgNP,  $p = 0,002$ ; AuNP,  $p = 0,039$ ) nyilvánvalóvá vált a *SOD* (AgNP,  $p = 0,006$ ) és a *TLR* indukciója (S4a ábra). Az *E. fetida* esetében a második tengelyen a *MT* most közelebb van a *lysenin*-hez, szemben a *SOD*-zal és a *TLR*-ral (**5.3.3b és 5.3.3d ábra**). Az *E. andrei*-től

eltérően, a *TLR* AgNP és AuNP általi indukcióját 2 óra elteltével figyeltük meg (AgNP,  $p = 0,022$ ; AuNP,  $p = 0,020$ ), míg az AgNO<sub>3</sub> a *TLR* expressziót nem befolyásolta (Bodó és mtsai. elbírálás alatt, S4b ábra). Az AgNP és az AgNO<sub>3</sub> kezeléseket összehasonlítva az expressziós profilok hasonló tendenciát mutatnak, azzal a különbséggel, hogy a *LuRP* is hozzájárult a második tengelyhez, általában negatív pontszámokat hozzáadva az AgNO<sub>3</sub> profilokhoz (5.3.3d ábra). A *LuRP*-tól eltekintve mindkét kezelést főként a *lysenin* szuppressziója jellemezte 2 óránál (AgNO<sub>3</sub>,  $p = 0,005$ ) és 24 óránál (AgNP,  $p \leq 0,0010$ ; AgNO<sub>3</sub>,  $p = 0,003$ ), valamint a *MT* fokozatos indukciója 24 óra felé (AgNP,  $p = 0,006$ ; AgNO<sub>3</sub>,  $p \leq 0,0010$ ) (Bodó és mtsai., elbírálás alatt; S4b ábra). A PCA-ben meghatároztuk, hogy az AgNP-ok - mindkét fajra jellemzően - a *lysenin* folyamatos csökkenését idézik elő 24 óra felé egyidejűleg a *SOD* indukciójával, *E.fetida*-nál a *MT*-nel is. Az AgNP-okra és az AgNO<sub>3</sub>-ra adott génválaszok hasonló mintákat mutattak mindkét fajban néhány kivétellel, valószínűleg a gének, például az *MT* és a *LuRP* nagy biológiai variációi miatt (Bodó és mtsai., elbírálás alatt; S4 ábra).

További tényező, amely megkülönböztette a két fajt, a *lumbricin*, a *lysenin* és *SOD* gének alapszintű expressziós szintjei, amelyek magasabbak voltak az *E. andrei*-ben, míg a *TLR*, *LuRP* és *MT* az *E. fetida*-ban erősen indukálhatóak stressz körülmények között (Bodó és mtsai., elbírálás alatt; S3 Táblázat). Az idő függvényében vizsgált expressziós profilok rávilágítanak arra, hogy az *E. fetida* coelomasejtek kétségkívül érzékenyebbek a vizsgált kezelésekre (5.3.2a ábra), azonban a két faj között a teljes génexpressziós mintázat nem különböző teljesen (Bodó és mtsai., elbírálás alatt; S4a ábra).



**5.3.3. ábra.** Korrespondencia analízis (CA). A CA biplotok a génexpressziós profilokat mutatják az idő függvényében, az AgNP és az AuNP (**a, b**) vagy az AgNP és az AgNO<sub>3</sub> (**c, d**) kombinációjában a két fajra. Az egyes mintákat (kis pontok vagy körök) és géneket (keresztek) az első és második dimenzió koordinátáinak megfelelően ábrázoljuk. A 6 változó (gén) hozzájárulása a két dimenzióhoz színskálán jelölt: szürkétől a pirosig. Pontok/körök (expressziós profilok a megadott időpontban) egy kereszt (gén) közelében jelentik az expozíciós idő és a transzkripció válasz közötti kapcsolatot. Három, túlságosan kilógó mintát kizártunk az *E. fetida* AgNP adatkészletéből (2 ismétlést a 12 órás időpontok és 1 ismétlést a 24 órás időpontok közül), mivel ezekben a domináns *LuRP* expresszió szintje befolyásolta az elemzést (**b, d**).

Általában az *MT* (fémek detoxifikációja) és a *lysenin* expresszió sokkal szembevetőbb volt a többi vizsgált génnél. Korábban megfigyelték *E. fetida*-ban, hogy az *MT* és a *lysenin* szabályozása a környezeti stresszorok hatására gyorsan megváltozik, ezért a stressz korai biomarkereinek tekinthetőek (Bernard és mtsai., 2010). Eredményeinkkel összhangban Hayashi és mtsai., (2016) megfigyelték az *MT* indukcióját és egyidejűleg a *lysenin* expresszió csökkenését az *E. fetida* coelomasejtek AgNP-okkal (NM-300K, 15 nm) és AgNO<sub>3</sub>-tal történő kezelését követően. Ezek alapján eredményeink összhangban állnak a korábbi eredményekkel, és megerősítik e gének biomarkerekként való felhasználását fém-expozíció esetén (Bernard és mtsai., 2010). A *MT* mellett, a *SOD* növekvő expressziója is az oxidatív stresszválasz kialakulására utal mindkét fajban. Az AgNP-oknak kezelt egerek tüdőszövetében is megfigyelték a *SOD* fokozott regulációját (Asare és mtsai., 2015). Hasonló jelenségeket írtak le humán hepatóma sejtek AgNP-nak való kezelése után is (Kim és mtsai., 2009).

Az *E. fetida* coelomasejtek korai (2 óra elteltével) TLR indukciója valószínűleg a makrofág-szerű sejtek és NP-ok kölcsönhatásával magyarázható (Hayashi és mtsai., 2016, Njoroge és mtsai., 2018). A PRR-ok és a NP-ok kölcsönhatása következtében feltételezhető, hogy az AMP-ek expressziója emelkedik (a PRR ligand-kötése számos jelátviteli lépést követően AMP termelést indukál) (Hayashi és mtsai., 2016). Korábbi megfigyeléseink során azt tapasztaltuk, hogy a *lumbricin* és a *LuRP* mRNS expressziója meglehetősen konstitutív mintázatot mutatott az *E. andrei* coelomasejtek patogén kezelését követően (Bodó és mtsai., 2019). Bár az AuNP-kezeléseknél nem figyeltünk meg citotoxicitást az alkalmazott koncentrációnál, szignifikánsan eltérő expressziós mintázatot mutattak a *TLR*, a *lysenin* és a *MT* gének (Bodó és mtsai., elbírálás alatt; S4 ábra), jelezve, hogy az AuNP-mediálta mechanizmusok nem közvetlenül kapcsolódnak a sejthalálhoz, hanem inkább az NP-okkal való interakciókhoz. Az AuNP-ok megváltoztatják az antioxidáns,- és a veleszületett immunválaszban részt vevő gének expresszióját a *Sparus aurata* halakban, de nem befolyásolják a *SOD* expressziót (Na-Phatthalung és mtsai., 2018). Az AuNP-ok potenciális hatása a veleszületett immunitásra ezért olyan terület, amely a jövőben további figyelmet érdemel, és érdemes a dózis-válaszok során az immunrendszerrel kapcsolatos paraméterekre érdemes koncentrálni, nem pedig a toxicitásra.

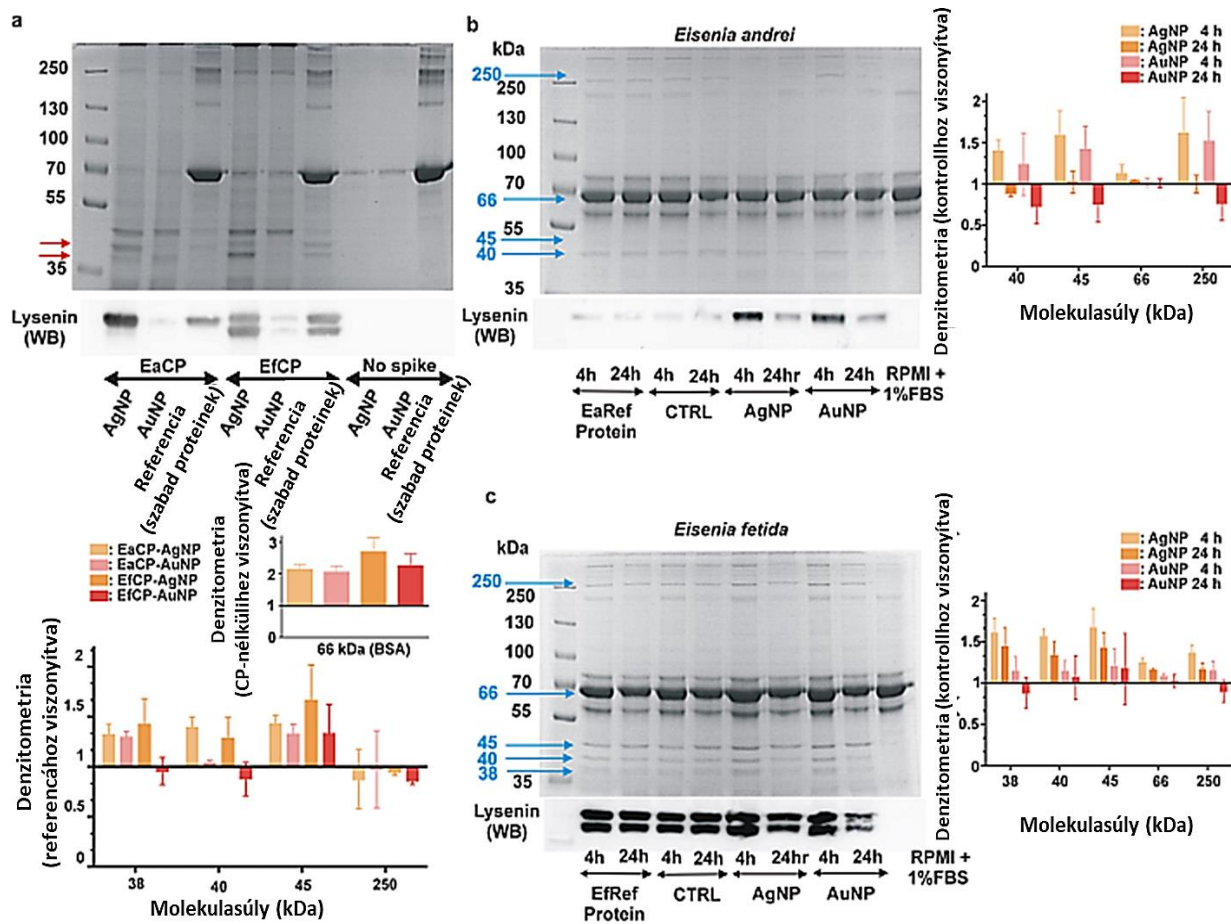
#### **5.3.4. Az AgNP-ok kölcsönhatásba lépnek a lyseninekkel, és az expozíciós körülmények között szabályozzák ezek szekrécióját**

Korábban Hayashi és mtsai., (2013) dokumentálta a protein korona fajspecifikus kialakulását *E. fetida* coelomaprotein (EfCP) felhasználásával, ahol a lysenin fehérjék családja jellegzetes dúsulást mutatott a 15, és 75 nm-es AgNP-ok felszínén. Másrészt sem az *E. andrei* coelomaproteineket (EaCP), sem az AuNP-okkal való kölcsönhatás tulajdonságait napjainkig még nem vizsgálták. A *lysenin* alap génexpressziós szintje eltér az egyes *Eisenia* fajokban (Brulle és mtsai., 2006; Dvořák és mtsai., 2013), ezért elemeztük a protein korona összetételét és vizsgálataink középpontjában a lysenin,- és olyan fehérjék álltak, amelyeknek nagy affinitása van az AgNP-mal, és –feltételezhetően- az AuNP-mal szemben is. A korábban leírtak szerint a coelomasejteket sejtenyésző médiumban inkubáltuk szérum-kiegészítő nélkül, majd összegyűjtöttük az EaCP-t és az EfCP-t. Kísérleteinkben BSA-t használtuk háttér fehérje-forrásként, hogy biztosítsuk a megfelelően magas fehérje koncentrációt ahhoz, hogy megakadályozzuk a fehérjék által kiváltott NP-aggregálódást. Ez a fajta megközelítés hasonlít az immunológiai metodikákra, ahol a BSA-t vagy a tejfehérjéket használják a nem-specifikus

kötések blokkolására. Valójában, annak ellenére, hogy az inkubációs keverékben nagy mennyiségben van jelen a BSA (66 kDa-os sáv) ("Referencia"), a CP-specifikus proteinek feldúsulását (38, 40 és 45 kDa-os sávok) figyeltük meg az AgNP és AuNP körül képződött protein-koronákban (**5.3.4.1a ábra**). Szintén nyilvánvaló volt, hogy az AgNP, és az AuNP kölcsönhatásba lép a BSA-val, mivel csak kevés különbség mutatkozott a BSA sávintenzitásában a CP-vel („CP-spiked”) ellátott minták és a CP-nélküli („No-spike”) kontrollok között (**5.3.4.1a ábra**).

Korábban Hayashi és mtsai., (2013) bizonyították, hogy az EfCP egyik fő fehérje komponense a lysenin, mely erősen kötődik az AgNP-hoz, de ez az interakció nem volt megfigyelhető a szilika NP-ok esetében. Jelen tanulmányban AuNP-ot használtuk az összehasonlításhoz, mivel hasonló kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint az AgNP-ok a (thiolokkal való felületi reakcióképesség szempontjából). Meglepő módon, a Western blot elemzés bebizonyította, hogy a lysenin (38 kDa-os és 40 kDa-os sávok) kötődése csak az AgNP-okra korlátozódik, ezáltal kizárhatjuk a thiol-vezérelt kölcsönhatások lehetőségét (**5.3.4.1a ábra**). A felszíni hidrofóbítás mindenesetre hozzájárulhat a lyseninek preferenciális kötődéséhez, amint azt korábban Hayashi és mtsai (2013) tárgyalták, de nem tudjuk, hogy ennek a kölcsönhatásnak a sajátosságai mögött milyen pontos mechanizmus rejlik. A fajbeli különbségeket illetően megfigyeltük a lysenin fehérjék (38 kDa-os és 40 kDa-os sávok) nyilvánvaló eltérését az EaCP és az EfCP között, és az így létrejövő, különböző fehérje koronákat az AgNP-ok körül (**5.3.4.1a ábra**, Western blot, szintén piros nyilakkal jelölve az SDS-PAGE gélen).

Ezen fehérjék, valamint a 45 kDa-os fehérjék azonosítása céljából, (mind az AgNP-ok, mind az AuNP-ok felszínén megtalálható fehérjék), a sávok kivágása után folyadék kromatográfiával kombinált tömegspektrometriát (LC-MS/MS) alkalmaztunk (mindkét fajból, de csak az AgNP-khez kapcsolódó koronafehérjéket képviselő sávokat vágtuk ki). Ez a módszer igazolta a fehérjék azonosságát a lysenin-családból (lysenin és lysenin-rokon protein 2; LRP2), míg a 45 kDa-os sáv valószínűleg az aktin fehérje (**5.3.4. táblázat**). A lysenint, mind az LRP2-t azonos mértékben detektáltuk mindkét faj 38 és 40 kDa-os kivágott sávjában. Lehetséges, hogy a 40 kDa-os sáv megfelel az LRP2-nek, amely a lysenin valamivel nagyobb molekulásúlyú variánsa. Ezt nem tudtuk más módszerrel megerősíteni, mivel a két lysenin fehérje nagy hasonlóságot mutat aminosav-szekvenciában (89% azonosság). Az *E. andrei* esetén csak egyetlen lysenin sáv volt látható a 40 kDa-os tartományban.



**5.3.4.1. ábra.** *Ex situ* protein korona-képződés **(a)** és az *E. andrei*-ből **(b)** és *E. fetida*-ból **(c)** származó coelomasejtek fehérje szekréciós profilja, amelyet SDS-PAGE és Coomassie Brilliant Blue festéssel vagy Western-blot módszerrel vizsgáltunk. Három független kísérlet reprezentatív gélképeit mutatjuk be. A piros nyilak jelzik a lysenin-fehérje család tagjait, feltehetőleg a lysenint (alsó nyíl) és a lysenin rokon fehérje 2-t (LRP) (felső nyíl), amelyet az LC-MS/MS azonosított. A kék nyilak jelzik a lysenint (~ 37-38 kDa), a LRP2-t (~ 40 kDa), más koronafehérjéket (~ 45 kDa, >200 kDa) és a BSA-t (~ 66 kDa). A gélképekhez tartozó grafikonok ezeknek a sávoknak a denszimetriás elemzését mutatják, amelyet úgy számítottunk ki, hogy a sáv intenzitását a megfelelő protein sávra normalizáltuk a referencia fehérje sávokban **(a)** vagy a kontroll sávokban **(b, c)**. Az értékek az átlagokat ( $\pm$  SEM) képviselik. Az AgNP-ok és AuNP-ok fehérje korona-profiljai a 24 órás inkubációt követően CP-vel ellátott sejtenyésző tápoldatban, kiegészítve BSA-val háttérfehérje-forrásként **(a)**. Az *E. andrei* **(b)** és az *E. fetida* coelomasejtek **(c)** fehérje szekréciós profiljai alacsony toxikus koncentrációjú AgNP (*E. andrei*: 2,71  $\mu$ g/mL, *E. fetida*: 2  $\mu$ g/mL) és AuNP (20  $\mu$ g/mL) kezelést követően. Az „RPMI + 1% FBS” minta csak szérumbfehérjéket tartalmaz, coelomasejtek nélküli minta. A Western-blot elemzés igazolta a lysenin és a LRP2 szekréció dinamikus változásait az NP expozíció során.

SDS-PAGE sávtartomány (kDa)	Azonosított fehérjék #	Érték	Protein (accession #)	Faj	Mol. súly <sup>a</sup> (kDa)	pI <sup>a</sup>	Funkciók <sup>b</sup>
35-55	10	323.31	<b>Lysenin</b> (O18423)	<i>Eisenia fetida</i>	33.44	5.86	Haemolízis Citolízis Ion transzport Antimikrobiál.
35-55	11	323.31	<b>Lysenin-rokon protein 2</b> (O18425)	<i>Eisenia fetida</i>	34.14	5.64	Haemolízis Citolízis Ion transzport Antimikrobiál.
35-55	34	323.31	<b>Aktin</b> (A0A2I7YV73)	<i>Eisenia fetida</i>	41.92	5.30	Citoszkeleton Transzport mechan.

**5.3.4. táblázat.** Az *E. andrei* és az *E. fetida* coelomafehérjék tandem tömegspektrometrián alapuló azonosítása (amelyek koronát képeztek az AgNP-ok körül).

<sup>a</sup>Poszt-transzlációs módosítások előtti molekulásúly (Mw) az UniProtKB adatbázis alapján, amely a teljes aminosav-szekvenciákból és az pI (izoelektromos pont)-ból lett kiszámítva az pI/MW számítási módszert (ExpASY) alkalmazva.

<sup>b</sup>A funkciókat az UniProtKB adatbázisból gyűjtöttük.

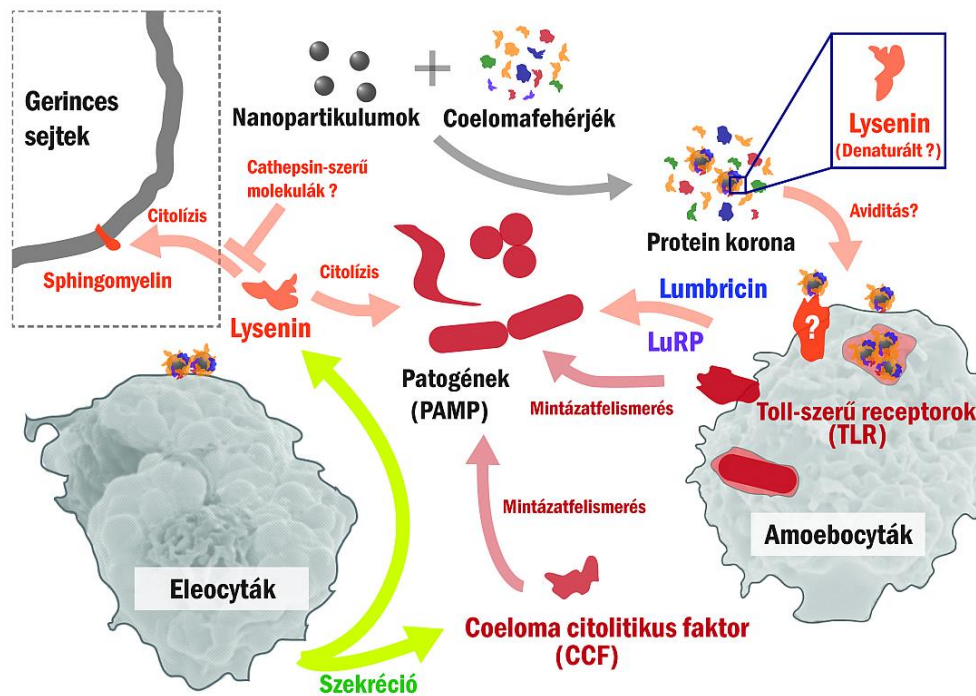
A lysenin fehérjecsaládon kívül az aktin is az AgNP-ok körül kialakult fehérjekoronák egyik alkotóeleme (Hayashi és mtsai., 2013). Az aktint a citoszol fehérjének tekintik, azonban a gerinctelen szervezeteknél feltételezett szerepe van szekretált, extracelluláris fehérjeként is. A sejtmentes haemolimfából származó extracelluláris aktin képes több baktériumtörzs felületéhez kapcsolódni (Tetreau és mtsai., 2017), illetve Alijagic és mtsai., (2019) azonosították az aktint a titán-dioxid NP felületén létrejövő komplex protein koronában is. Ezért feltételezhető a tanulmányban, hogy a giliszták extracelluláris aktinja hasonló szereppel rendelkezik, mint a rovaroknál, puhatestűeknél, és tüskésbőrűeknél talált aktin (pl. fagocitózist és baktériumölő mediátorok) (Sandiford és mtsai., 2015; Alijagic és mtsai., 2019). Az aktin megkötése az AgNP-ok és az AuNP-ok esetében is fennállt, a jövőbeni tanulmányok szempontjából hasznos lehet az extracelluláris aktin jellemzése a veleszületett immunitás összefüggésében, különös tekintettel a mintázatfelismerési mechanizmusokra. Mindazonáltal ez a tanulmány kísérleti bizonyítékkal mutatott rá a protein repertoárban rejlő (lysenin fehérjecsalád összetétele) - a szoros rokonság ellenére is - fajbeli különbségekre. A lysenin specifikus jelenléte AgNP-ok felszínén lévő fehérje-koronában a magas BSA háttér ellenére is azt jelzi, hogy hasonló eredmény feltételezhető a tanulmányban alkalmazott egyéb expozíciós körülmények esetén is (azaz 1% FBS-sel kiegészített tenyésztőoldatok), amelyet korábban nagyobb méretű AgNP alkalmazásánál már kimutattak

(Hayashi és mtsai., 2013). Ezt a feltételezést nagymértékben befolyásolja a lyseninnek *in situ* szekrécija, ezért ezt követően megvizsgáltuk az AgNP-ok és az AuNP-ok hatását a lysenin-szekréción profilra.

Korábban már vizsgálták az alacsony toxikus koncentrációjú, 15 nm-es AgNP-okkal kezelt *E. fetida* coelomasejtek fehérje szekréción profilját, ahol a lysenin szekréción látszólag magasabb szintjét tapasztalták 2 óra elteltével, amely fokozatos csökkenést mutatott 24 óra felé (Hayashi és mtsai., 2016). Hasonló megközelítést alkalmaztunk, de a módszert kiegészítettük Western-blot vizsgálattal a további megerősítés céljából, illetve hogy eredményeinket össze tudjuk hasonlítani a *lysenin* gén differenciális expresszió profiljával. Először megerősítettük, hogy a lysenin szekréción a kontrollokban ugyanolyan tartományba esik, mint a lyseninnek koncentrációját a CP-ekkel ellátott "Referencia protein" kontrollokban (**5.3.4.1b és c ábra**), igazolva az *ex situ* protein korona profil vizsgálat relevanciáját (**5.3.4.1a ábra**). Megjegyzendő, hogy az AgNP vagy AuNP expozíció kezdetben (4 óra elteltével) a lyseninnek fokozott szekréciónját eredményezte a kontrollokhöz képest mindkét gilisztafaj esetében (**5.3.4.1b és c ábra**). Ezt követően 24 órára a lyseninnek mennyisége redukálódott (**5.3.4.1b és c ábra**), mely hasonlóságot mutatott a génextpresszió csökkenésével (ettől a képtől eltér az *E. fetida* coelomasejtek 24 órás AuNP expozícióját) (Bodó és mtsai., elbírálás alatt; S4 ábra). Ez azt jelzi, hogy a lyseninnek szekréción profilja általában a differenciálisan expresszálandó *lysenin* gén mintáját követi, így lyseninben gazdag fehérje korona képződhet az AgNP-ok felszínén a coelomasejtek jelenlétében is. A *lysenin* gén szabályozása és a fehérje szekréciónja általában mind az AgNP, mind az AuNP kezelésekre egyaránt jellemző volt, amellett, hogy az AgNO<sub>3</sub> is jelentős hatással van a gén expressziójára, így a *lyseninek* valószínűleg stressz-szabályozott fehérjék, amelyek immunológiai funkcióval rendelkeznek.

Tekintettel a lysenin feltételezett szerepére a coelomasejtek AgNP felvételében a (Hayashi és mtsai., 2013), a lysenin fehérjék az akut fázis fehérjék közé sorolhatóak, melyek egy negatív visszacsatolás révén befolyásolhatják az NP-ok felvételi kinetikáját *in vitro* és *in vivo* körülmények között *Eisenia* földgilisztákban (**5.3.4.2. ábra**).





**5.3.4.2. ábra.** Mintázatifelismerő stratégiák vázlata a giliszták környezeti kórokozókkal és idegen anyagokkal (NPs) szembeni immunválaszában. A kérdőjelek az eddig kevésbé ismert mechanizmusokat jelentik. (Engelmann és mtsai., (2016b) alapján, módosítva).

#### 5.4. Konklúzió

A NP-ok és az immunválasz kölcsönhatása kevésbé ismert. Jelen tanulmányban vizsgáltuk két szoros rokonságban lévő földigiliszta faj (toxikológiai vizsgálatokban mindkettő régóta alkalmazott) coelomasejtjeinek nemesfém NP-okkal szembeni érzékenységét különböző módszerek alkalmazásával. Általánosságban az *E. fetida* coelomasejték nagyobb érzékenységet mutattak az AgNP-okkal szemben, mint az *E. andrei* coelomasejték, míg a fajok AuNP-okkal szembeni érzékenységét nem tudtuk meghatározni a vizsgált koncentrációtartományban. A génexpressziós profilok azt sugallják, hogy az antioxidáns mechanizmusok, mint például az *SOD* mindkét fajban részt vesznek, emellett a *MT* is tartósan fokozódik az *E. fetida*-ban, alátámasztva a 24 órás kezelés végére a thiolmediált méregtelenítési folyamatok jelentős szerepét. Az immunválaszban szerepet játszó gének (*TLR*) gyors szabályozása szembevetendő volt az *E. fetida* coelomasejtékben. Ez egy NP-specifikus válaszként értelmezhető, amely közös az AgNP és az AuNP-ok esetében is, mely inkább a celluláris interakciókkal lehet összefüggésben az expozíció kezdeti szakaszában, mint a redox/toxikus folyamatokkal. Mindkét fajban megfigyeltük, hogy a *lyseninek* expressziója/szekréciója stressz szabályozottnak tűnik, amely egy összetett visszacsatolási mechanizmust von maga után az AgNP-ok számára. A bazális expresszió szintjében is

különbségek vannak a fajok között, a *lysenin*, *lumbricin*, *SOD* nagyobb mértékű expressziót mutatott *E. andrei* fajban, ezzel ellentétben *E. fetida*-ban a *LuRP*, *TLR* és *MT*-gének erősen indukálhatóak stressz körülmények között. A lyseninek affinitása nagy az AgNP-okhoz, pozitívan járulnak hozzá a felvételi mechanizmusokhoz, emellett *E. fetida* esetén mindkét lysenin izoforma kimutatható volt az AgNP-ok felszínén.

Az egyik lehetséges magyarázat az *E. fetida* nagyobb érzékenységére az, hogy természetes környezete jelentősen különbözik az *E. andrei*-től. Az *E. andrei* mikrobákban gazdagabb komposztban él, míg az *E. fetida* ökológiai preferenciája a nedves erdei talaj. Ezáltal a természetes szelekció alakította ki az immunrendszerük érzékenységének, fogékonyságának és toleranciájának genetikai változásait (Dvořák és mtsai., 2013). Emellett, eredményeink igazolták a *TLR* korai (2 h) indukcióját *E. fetida*-nál, amely összefüggésben lehet az AgNP-ok gyorsabb sejtbe kerülésével. Az *E. fetida* fajnál az AgNP-ok együttesen a lysenin és LRP2 szekrécióját idézik elő, a termelő fehérjék visszacsatolás révén erősítetik a felvétel folyamatát. Rövidebb idő alatt több AgNP kerülhet a sejtekbe, amelyek így mindinkább felborítják a celluláris redox-egyensúlyt és apoptózist indukálnak. Megállapításaink azt mutatják, hogy inkább az *E. fetida*-t kellene előnyben részesíteni a nanorészecskékkel végzett immun-toxikológiai tanulmányokban szemben az *E. andrei*-vel, nemcsak az azonosított fajérzékenység miatt, hanem jobban reprezentálja a talaj ökoszisztémáját is, mint kulcs-fontosságú faj.

## Új eredmények összefoglalása

Az *Eisenia* gyűrűsféreg fajokat elsősorban toxikológiai kísérletekben alkalmazzák, mint modellszervezeteket, azonban egyre elterjedtebbek az összehasonlító immunológiai és fejlődésbiológiai kutatásokban is. Egy egyszerűbb, gerinctelen modellorganizmust használva talán közelebb kerülhetünk a gerincesekben felvetődő, megválaszolatlan kérdésekhez és a még nem teljesen tisztázott immunológiai mechanizmusok megértéséhez.

1. Azonosítottuk a lumbricin homológját *E. andrei* fajban. Egy lumbricin-rokon AMP-et is (LuRP) is karakterizáltunk. Mindkét AMP nagyfokú szekvencia-homológiát mutatott a más fajokban azonosított lumbricinnel, és a prolin gazdag AMP-k családjába tartoznak.
2. Ellentétben a korábbi megfigyelésekkel, mindkét AMP növekvő mRNS-expressziós mintázatot mutatott az ontogenezis során. Továbbá, számos szövetben azonosítottuk ezen molekulák jelenlétét: a coelomasejtekben is.
3. A korábbi tanulmányokkal ellentétben (kivéve: *Hm*-lumbricin) a *Lumbr* és *LuRP* is indukálhatónak bizonyult a 48 órás *in vivo* *S. aureus* kezelést követően.
4. Megfigyeltük az *E. andrei* anterior és posterior regenerációja során végbemenő morfológiai változásokat, a sejtosztódás és programozott sejthalál kapcsolatát, és a folyamat során történő immunbiológiai mechanizmusokat.
5. A legnagyobb mértékű sejtosztódás két hét elteltével volt megfigyelhető, az apoptózis jelensége pedig a teljes regenerációs folyamatban, intenzívebben a sebgyógyulás és a szöveti átrendeződés során volt detektálható.
6. A veleszületett immunrendszer celluláris elemei (coelomasejtek) részt vesznek a regenerációban, és a regenerációs blastemába vándorolnak.
7. Az anterior és posterior regeneráció során az immunválaszban szerepet játszó gének nagyrészt hasonló, de csökkent mértékű mRNS expressziós mintázatot mutattak.
8. Az AgNP és AuNP-ok toxikus hatásait vizsgáltuk *in vitro* két közeli rokon faj (*E. andrei* és *E. fetida*) coelomasejtjein. Eredményeink alapján az AgNP dóziszfüggő sejtpusztulást idézett elő a coelomasejtekben, de az *E. fetida* nagyobb érzékenységet mutatott, mint az *E. andrei*.
9. A génexpresszió vizsgálata során annak ellenére, hogy a transzkripciós válaszok mértéke globálisan eltért, az általános génexpressziós mintázat nem különbözött nagymértékben a két faj között. Például a 24 órás kezelés végére a lumbricin expresszió *E. andrei*-nél és *E. fetida*-nál is csökkenést mutatott, a *LuRP* ezzel ellentétben emelkedést.

10. Az AgNP és AgNO<sub>3</sub> kezelés hatására 2 óra elteltével az *E. andrei* alacsony MT/magas lysenin-profillal, az *E. fetida* pedig magas MT/alacsony lysenin-profillal rendelkezett. Ez a trend eredményezi 24 óra végére a lysenin szupresszióját és a SOD indukcióját, amely a legszembetűnőbb eredménye az *E. fetida* coelomasejtek AgNP kezelésének. Az AuNP toxicitást nem idézett elő, de génexpressziós változást indukált.
11. A biomolekuláris vagy protein korona kialakulását vizsgálva CP-specifikus proteinek feldúsulását (38, 40 és 45 kDa-os sávok) figyeltük meg nemcsak AgNP, hanem AuNP körül képződött protein koronákban is.
12. A Western blot és LC-MS/MS bebizonyította, hogy a lysenin kötődése csak az AgNP-okra korlátozódik. Az *E. fetida* CP-ek vizsgálatakor sikerült kimutatnunk kétféle lysenin izoformát is az AgNP-ok felületén.
13. A lysenin-fehérjecsald mellett az aktin szerepe is jelentős lehet a protein korona kialakulásában.
14. A lysenin fehérjeprofíli vizsgálata során egybevetően a génexpressziós eredményekkel, mindkét fajtánál 4 óra elteltével az AgNP és AuNP kezelés hatására magas lysenin (*E. fetida*-nál mindkét izoforma) szekréció jelenléte volt azonosítható, amely a 24 órás kezelés végére jelentős csökkenést mutatott.
15. Az alacsony koncentrációjú AgNP és AuNP kezelés a vizsgált antimikrobiális hatású peptidek közül leginkább a lysenin expressziót és szekréciót befolyásolta mindkét fajtánál.

## Irodalomjegyzék

- Abnave P., Ghigo E. (2018). Role of the immune system in regeneration and its dynamic interplay with adult stem cells. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **87**, 160-168.
- Adamowicz A. (2005). Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes. *Tissue Cell.* **37**, 125-133.
- Ahamed M., Posgai R., Gorey T. J., Nielsen M., Hussain S. M., Rowe J. J. (2010). Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **242**, 263-9.
- Alijagic A., Benada O., Kofroňová O., Cigna D., Pinsino A. (2019). Sea urchin extracellular proteins design a complex protein corona on titanium dioxide nanoparticle surface influencing immune cell behaviour. *Front. Immunol.* **10**, 2261.
- Allam B. és Raftos D. (2015). Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* **131**, 121-36.
- Asare N., Duale N., Slagsvold H. H., Lindeman B., Olsen A. K., Gromadzka-Ostrowska J., Meczynska-Wielgosz S., Kruszewski M., Brunborg G., Instanes C. (2016). Genotoxicity and gene expression modulation of silver and titanium dioxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology.* **10**, 312-321
- Asharani P. V., Lianwu Y., Gong Z., Valiyaveetil S. (2011). Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology.* **5**, 43-54.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A., Horvath P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* **315**, 1709-12.
- Bely A. E. (2006). Distribution of segment regeneration ability in the *Annelida*. *Integr. Comp. Biol.* **46**, 508–518.
- Bely A. E., Nyberg K. G. (2010). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 161-70.
- Bely A. E., Sikes J. M. (2010). Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **107**, 1464-9.
- Berrill N., J. (1952). Regeneration and budding in worms. *Biol. Rev.* **27**, 401–438.
- Beschin A., Bilej M., Hanssens F., Raymakers J., Van Dyck E., Revets H., Brys L., Gomez J., De Baetselier P., Timmermans M. (1998). Identification and cloning of a glucan-and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J. Biol. Chem.* **273**, 24948-24954.
- Bilej M., Brys L., Beschin A., Lucas R., Vercauteren E., Hanušová R., De Baetselier P. (1995). Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia fetida* earthworms. *Immunol. Lett.* **45**, 123-128.
- Bilej M., De Baetselier P., Beschin A. (2000). Antimicrobial defense of the earthworm. *Folia Microbiol.* **45**, 283-300.
- Bilej M., Procházková P., Silerová M., Josková R. (2010). Earthworm immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **708**, 66-79, 2010.
- Bodó K., Ernszt D., Németh P., Engelmann P. (2018). Distinct immune- and defense-related molecular fingerprints in separated coelomocyte subsets in *Eisenia andrei* earthworms. *ISJ.* **15**, 338-345.
- Bodó K., Boros Á., Rumppler É., Molnár L., Böröcz K., Németh P. Engelmann P. (2019). Identification of novel lumbricin homologues in *Eisenia andrei* earthworms, *Dev. Comp. Immunol.* **90**, 41-46.

- Borase H. P., Patil S. V., Singhal R. S. (2019). *Moina macrocopa* as a non-target aquatic organism for assessment of ecotoxicity of silver nanoparticles: effect of size. *Chemosphere*. **219**,713-723.
- Borm P. J. és Kreyling W. (2004). Toxicological hazards of inhaled nanoparticles –potential implications for drug delivery. *J. of Nanosci. and Nanotechnol.* **4**, 521-531.
- Boros A., Somogyi I., Engelmann P., Lubics A., Reglodi D., Pollák E., Molnár L. (2010). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 (PAC1) receptor is expressed during embryonic development of the earthworm. *Cell Tissue Res.* **339**, 649-53.
- Boros A., Pankovics P., Simmonds P., Reuter G. (2011). Novel positive-sense, single-stranded RNA (+ssRNA) virus with di-cistronic genome from intestinal content of freshwater carp (*Cyprinus carpio*). *PLoS ONE*. **6**, e29145.
- Bosch T. C. (2013). Cnidarian-microbe interactions and the origin of innate immunity in metazoans. *Annu.Rev. Microbiol.* **67**, 499-518.
- Brulle F., Mitta G., Cocquerelle C., Vieau D., Lemièrre S., Leprêtre A., Vandebulcke F. (2006). Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure, *Environ. Sci. Technol.* **40**, 2844-50.
- Bruno R., Maresca M., Canaan S., Cavalier J. F., Mabrouk K., Boidin-Wichlacz C., Olleik H., Zeppilli D., Brodin P., Massol F., Jollivet D., Jung S., Tasiemski A. (2019). Worms' antimicrobial peptides. *Mar. Drugs*. **17**, 9.
- Bulet P., Stöcklin R., Menin L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 169-84.
- Cabuzu D., Cirja A., Puiu R., Grumezescu A. M. (2015). Biomedical applications of gold nanoparticles, *Curr. Top. Med. Chem.* **15**, 1605-13.
- Calisi A., Lionetto G. M., Schettino T. (2009). Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotox. Env. Saf.* **72**, 1369-1377.
- Canesi L., Ciacci C., Betti M., Fabbri R., Canonico B., Fantinati A. (2008). Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environ. Int.* **34**, 1114-1119.
- Canesi L., Ciacci C., Vallotto D., Gallo G., Marcomini A., Pojana G. (2010): *In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C60) fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> on *Mytilus* hemocytes. *Aquat. Toxicol.* **96**, 151–158.
- Castillo M. G., Salazar K. A., Joffe N. R. (2015). The immune response of cephalopods from head to foot. *Fish Shellfish Immunol.* **46**, 145-60.
- Chaves da Silva P. G., Corrêa C. L., de Carvalho S. L., Allodi S.(2013).The crustacean central nervous system in focus: subacute neurodegeneration induces a specific innate immune response. *PLoS One*. **20**, e80896.
- Cang T., Dai D., Yang G., Yu Y., Lv L., Cai L., Wang Q., Wang Y. (2017). Combined toxicity of imidacloprid and three insecticides to the earthworm, *Eisenia fetida* (*Annelida, Oligochaeta*). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **24**, 8722–8730.
- Chen L., DiPietro L. A. (2017). Toll-like receptor function in acute wounds. *Adv. Wound Care.* **6**, 344-355.
- Cho J. H., Park C. B., Yoon Y. G., Kim S. C., (1998). Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* **1408**, 67-76.
- Choi S. Y., Jeong S., Jang S. H., Park J., Park J. H, Ock K. S., Lee S. Y., Joo S. W. (2012). *In vitro* toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol. in vitro.* **26**, 229-37.
- Cooper E. L. és Roch P. (1984).Earthworm leukocyte interactions during early stages of graft rejection. *J. Exp. Zool.* **232**, 67-72.
- Cooper E. L., Kauschke E., Cossarizza A. (2002). Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *BioEssays.* **24**, 319-333.

- Couleau N., Techer D., Pagnout C., Jomini S., Foucaud L., Laval-Gilly P. (2012). Hemocyte responses of *Dreissena polymorpha* following a short-term *in vivo* exposure to titanium dioxide nanoparticles: Preliminary investigations. *Sci. Total Environ.* **438**, 490-497.
- Cunha, N. B., Cobacho, N. B., Viana, J. F., Lima, L. A., Sampaio, K. B., Dohms, S. S., Ferreira, A. C., de la Fuente-Núñez C., Costa, F. F., Franco, O. L., Dias S. C. (2017). The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov. Today.***22**, 234–248.
- Cuvillier-Hot V., Boidin-Wichlacz C., Slomianny C., Salzet M., Tasiemski A. (2011). Characterization and immune function of two intracellular sensors, HmTLR1 and HmNLR, in the injured CNS of an invertebrate. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 214-226.
- Das J. Choi Y. J., Song H., Kim J. H. (2016). Potential toxicity of engineered nanoparticles in mammalian germ cells and developing embryos: treatment strategies and anticipated applications of nanoparticles in gene delivery, *Hum. Reprod. Update.* **22**, 588-619.
- Davidson C. R., Best N. M., Francis J. W., Cooper E. L., Wood T. C. (2008). Toll-like receptor genes (TLRs) from *Capitella capitata* and *Helobdella robusta* (Annelida). *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 608-612.
- Davidson S. K., Powell R. J., Stahl D. A. (2010). Transmission of a bacterial consortium in *Eisenia fetida* egg capsules. *Environ. Microbiol.* **12**, 2277–2288.
- de Lima R., Seabra A. B., Durán N. (2012). Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles, *J. Appl. Toxicol.***32**, 867-79.
- de Jong D. M., Seaver E. C. (2016). A stable thoracic hox code and epimorphosis characterize posterior regeneration in *Capitella teleta*. *PLoS One.* **19**, e0149724.
- Demuyne S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemièrre S., Leprêtre A. (2007). Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Comp. Biochem. Physiol.* **145**, 658-668.
- Dishaw L. J., Leigh B., Cannon J. P., Liberti A., Mueller M. G., Skapura D. P., Karrer C. R., Pinto M. R., De Santis R., Litman G. W. (2016). Gut immunity in a protochordate involves a secreted immunoglobulin-type mediator binding host chitin and bacteria. *Nat. Commun.* **7**, 10617.
- Dvořák J., Mančíková V., Pižl V., D. Elhottová M., Silerová R., Roubalová F., Skanta P., Procházková P., Bilej M. (2013). Microbial environment affects innate immunity in two closely related earthworm species *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida*, *PLoS One.* **8**, e79257.
- Ečimović S., Velki M., Vuković R., Štolfa Čamagajevac I., Petek A., Bošnjaković R., Grgić M., Engelmann P., Bodó K., Filipović-Marijić V., Ivanković D., Erk M., Mijošek T., Lončarić Z. (2018). Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere.* **212**, 307-318.
- Elliott S. A., Alvarado A. S. (2018). Planarians and the history of animal regeneration: paradigm shifts and key concepts in biology. *Methods Mol. Biol.* **1774**, 207-239.
- Eming S. A., Krieg T., Davidson J. M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 514-25.
- Elespru R., Pfuhrer S., Aardema M. J., Chen T., Doak S. H., Doherty A., Farabaugh C. S., Kenny J., Manjanatha M., Mahadevan B., Moore M. M., Ouedraogo G., Stankowski L. F., Tanir J. Y. (2018). Genotoxicity assessment of nanomaterials: recommendations on best practices, assays, and methods, *Toxicol. Sci.* **164**, 391-416.

- Engelmann P., Molnár L., Pálincás L., Cooper E. L., Németh P. (2004). Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell Tissue Res.* **316**, 391-401.
- Engelmann P., Pálincás L., Cooper E. L., Németh P. (2005). Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Dev. Comp. Immunol.* **29**, 599-614.
- Engelmann P., Cooper E. L., Opper B., Németh P. (2011). Earthworm innate immune system. In: Karaca A (ed): Biology of earthworms, *Springer Verlag.* **24**, 229-245.
- Engelmann P., Hayashi Y., Bodó K., Ernszt D., Somogyi I., Steib A., Orbán J., Pollák E., Nyitrai M., Németh P., Molnár L. (2016a). 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.
- Engelmann P., Hayashi Y., Bodó K., Molnár L. (2016b). New aspects of earthworm innate immunity: novel molecules and old proteins with unexpected functions. In: Ballarin L, Cammarata M (eds.) Lessons in immunity: from single cell organisms to mammals. Elsevier-Academic Press, New York Amsterdam, pp. 53-66.
- Engelmann P., Bodó K., Najbauer J., Németh P. (2018). Annelida: Oligochaetes (Segmented Worms): Earthworm immunity, quo vadis? Advances and new paradigms in the omics era In: Edwin, L Cooper (szerk.) Advances in Comparative Immunology Cham (Németország); Springer International Publishing, pp. 135-159.
- Ermolaeva M. A., Schumacher B. (2014). Insights from the worm: the *C. elegans* model for innate immunity. *Semin. Immunol.* **26**, 303-9.
- Fadeel B. (2019). Hide and seek: nanomaterial interactions with the immune system. *Front. Immunol.* **10**, 133.
- Fiołka M., Zagaja M. P., Hulas-Stasiak M., Wielbo J. (2012). Activity and immunodetection of lysozyme in earthworm *Dendrobaena veneta* (Annelida). *J. Invertebr. Pathol.* **109**, 83–90.
- Fjøsne T. F., Stenseth E. B., Myromslien F., Rudi K. (2015). Gene expression of TLR homologues identified by genome-wide screening of the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Innate Immun.* **21**, 161-166.
- Flajnik M. F. (2014). Re-evaluation of the immunological Big Bang. *Curr. Biol.* **24**, R1060-5.
- Foldbjerg R., Olesen P., Hougaard M., Dang D. A., Hoffmann H. J., Autrup H. (2009). PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes, *Toxicol. Lett.* 156-162.
- Ganesan S., Aggarwal K., Paquette N., Silverman N. (2011). NF- $\kappa$ B/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **349**, 25-60.
- Gerencsér G., Szendi K., Berényi K., Varga C. (2015). Can the use of medical muds cause genotoxicity in eukaryotic cells? A trial using comet assay, *Environ Geochem. Health.* **37**, 63-70.
- Ghooshchian M., Khodarahmi P., Tafvizi F. (2017). Apoptosis-mediated neurotoxicity and altered gene expression induced by silver nanoparticles, *Toxicol. Ind. Health.* **33**, 757-764.
- Gieseck R. L., Wilson M. S., Wynn T. A. (2018). Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 62-76.
- Godwin J. W. és Brockes J. P. (2006). Regeneration, tissue injury and the immune response. *J. Anat.* **209**, 423–432.
- Godwin J. W., Pinto A. R., Rosenthal N. A. (2013). Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **110**, 9415–9420.
- Godwin J. W. és Rosenthal N. (2014). Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: immunological influences on regenerative success. *Differentiation.* **87**, 66-75.



- Graf M., Mardirossian M., Nguyen F., Seefeldt A. C., Guichard G., Scocchi M., Innis C. A., Wilson D. N. (2017). Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **34**, 702-711.
- Hale J. D. és Hancock R. E. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **5**, 951-9.
- Hayashi Y., Engelmann P., Foldbjerg R., Szabó M., Somogyi I., Pollák E., Molnár L., Autrup H., Sutherland D. S., Scott-Fordsmand J. J., Heckmann L. H. (2012). Earthworms and humans *in vitro*: characterizing evolutionarily conserved stress and immune responses to silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 4166-73.
- Hayashi Y., Heckmann L. H., Simonsen V., Scott-Fordsmand J.J. (2013). Time-course profiling of molecular stress responses to silver nanoparticles in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotox. Env. Saf.* **98**: 219-226.
- Hayashi Y., Miclaus T., Scavenius C., Kwiatkowska K., Sobota A., Engelmann P., Scott-Fordsmand J. J., Enghild J. J., Sutherland D. S. (2013). Species differences take shape at nanoparticles: protein corona made of the native repertoire assists cellular interaction. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 14367-75.
- Hayashi Y., Miclaus T., Engelmann P., Autrup H., Duncan S., Sutherland D., Scott-Fordsmand J. J. (2016). Nanosilver pathophysiology in earthworms: Transcriptional profiling of secretors proteins and the implication for the protein corona. *Nanotoxicology.* **10**, 303-311.
- He C. és Klionsky D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67-93.
- Heckmann L. H., Sorensen P., Krogh P., Sorensen J. (2011). NORMA-Gene: A simple and robust method for qPCR normalization based on target gene data. *BMC Bioinformatics.* **12**, 250.
- Holstein T. W., Watanabe H., Ozbek S. (2011). Signaling pathways and axis formation in the lower metazoa. *Curr. Top. Dev. Biol.* **97**, 137-77.
- Homa J., Olchawa E., Stürzenbaum S. R., Morgan A. J., Plytycz B. (2005). Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environ. Pollut.* **135**, 275–280.
- Honti V., Csordás G., Kurucz É., Márkus R., Andó I. (2014). The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev. Comp. Immunol.* **42**, 47-56.
- Homa, J. (2018). Earthworm coelomocyte extracellular traps: structural and functional similarities with neutrophil NETs. *Cell Tissue Res.* **371**, 407-414.
- Huang X. M., Tian Q. N., Bao Z. X., Qin Y. F., Chen S. J, Lu P., Zhang X. L, Zhang Y. Z., Zhang S. T. (2012). Cloning and identification of microRNAs in earthworm (*Eisenia fetida*). *Biochem. Genet.* **50**, 1-11.
- Josková R., Silerová M., Procházková P., Bilej M. (2009). Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei*. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 932-938.
- Kalacheva N. V., Eliseikina M. G., Frolova L. T., Dolmatov I. Y. (2017). Regeneration of the digestive system in the crinoid *Himerometra robustipinna* occurs by transdifferentiation of neurosecretory-like cells. *PLoS One.* **12**, e0182001.
- Khadra B. Y., Sugni M., Ferrario C., Bonasoro F., Varela Coelho A., Martinez P., Candia Carnevali M. D. (2017). An integrated view of asteroid regeneration: tissues, cells and molecules. *Cell Tissue Res.* **370**, 13-28.
- Khalil A. M. (2016). Physiological and genotoxicological responses of the earthworms *Aporrectodea caliginosa* exposed to sublethal concentrations of AgNPs. *J. Basic & Appl. Zool.* **74**, 8–15.

- Kim J. E., Choi J., Choi K. H., Chung K., Park, J., Yi D., Ryu Y. (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells, *Toxicol. in vitro.* **23**, 1076–1084.
- Kim S. és Ryu D. Y. (2013). Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues, *J. Appl. Toxicol.* **33**, 78-89.
- Kozin V. V., Kostyuchenko R. P. (2015). *Vasa*, *PL10*, and *Piwi* gene expression during caudal regeneration of the polychaete annelid *Alitta virens*. *Dev. Genes Evol.* **225**, 129-38.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
- Kuo C. J., Hansen M., Troemel E. (2018). Autophagy and innate immunity: Insights from invertebrate model organisms. *Autophagy.* **14**, 233-242.
- Kurek A., Homa J., Kauschke E., Plytycz B. (2007). Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *Eur. J. Soil. Biol.* **43**, 121-126.
- Kvell K., Cooper E. L., Engelmann P., Bovari J., Nemeth P. (2007). Blurring borders: innate immunity with adaptive features. *Clin. Dev. Immunol.* **2007**, 83671.
- Lassalle F., Lassegues M., Roch P. (1988). Protein-analysis of earthworm celomic fluid IV. Evidence, activity induction and purification of *Eisenia fetida andrei* lysozyme (Annelidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **91**, 187-192.
- Lai W., Wang Q., Li Z., Hu Z., Chen J., Fang Q. (2017). Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: Analysis of protein corona reveals specific binding patterns, *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* **152**, 317-325.
- Le S., Josse J., Husson F. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis, *Journal of Statistical Software.* **25**, 1-18.
- Li W., Li S., Zhong J., Zhu Z., Liu J., Wang W. (2011): A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm, *Pheretima guillelmi* (Michaelsen). *Peptides.* **32**, 1146-50.
- Li Q., Yang H., Zhong T. P. (2015). Regeneration across metazoan phylogeny: lessons from model organisms. *J. Genet. Genomics.* **42**, 57-70.
- Liebmann E. (1943). New light on regeneration of *Eisenia foetida* (SAV) *J. Morphol.* **73**, 583-610.
- Liu X., Sun Z., Chong W., Sun Z., He C. (2009). Growth and stress responses of the earthworm *Eisenia fetida* to *Escherichia coli* O157:H7 in an artificial soil. *Microb. Pathog.* **46**, 266-72.
- Lopez-Chaves C., Soto-Alvaredo J., Montes-Bayon M., Bettmer J., Llopis J., Sanchez-Gonzalez C. (2018). Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. *In vitro* and *in vivo* studies, *Nanomedicine.* **14**, 1-12.
- Mainschein J. (2011). Regenerative medicine's historical roots in regeneration, transplantation and translation. *Dev. Biol.* **358**, 278–284.
- Malanovic N. és Lohner K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact of the activity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **1858**, 936-46.
- Mao B. H., Tsai J. C., Chen C. W., Yan S. J., Wang Y. J. (2016). Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology.* **10**, 1021-40.
- Maurer-Jones M. A., Bantz K. C., Love S. A., Marquis B. J., Haynes C. L. (2009). Toxicity of therapeutic nanoparticles. *Nanomedicine.* **4**, 219–241.
- McShan D., Paresch C. R., Hongtao Y. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J. Food Drug Anal.* **22**, 116-127.
- Mescher A. L., és Neff A. W. (2005). Regenerative capacity and the developing immune system. *Adv Biochem. Eng. Biotechnol.* **93**, 39-66.

- Mészáros M., Porkoláb G., L. Kiss A., Pilbat M., Kóta Z., Kupihár Z., Kéri A., Galbács G., Siklós L., Tóth A., Fülöp L., Csete M., Sipos Á., Hülper P., Sipos P., Páli T., Rákhely G., Szabó-Révész P., Deli A. M., Veszélka S. (2018). Niosomes decorated with dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across the blood-brain barrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**, 228-240.
- Milochau A., Lassegues M., Valembos P. (1997). Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1337**, 123-132.
- Molnár L., Engelmann P., Somogyi I., Mácsik L. L., Pollák E. (2012). Cold-stress induced formation of calcium and phosphorous rich chloragocyte granules (chloragosomes) in the earthworm *Eisenia fetida*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **163**, 199-209.
- Molnár L., Pollak E., Skopek Z., Gutt E., Kruk J., Morgan A. J., Plytycz B. (2015). Immune system participates in brain regeneration and restoration of reproduction in the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Dev. Comp. Immunol.* **52**, 269-79.
- Morales R. A., Allende M. L. (2019). Peripheral macrophages promote tissue regeneration in zebrafish by fine-tuning the inflammatory response. *Front. Immunol.* **10**, 253.
- Muñoz A., López-García B., Pérez-Payá E., Marcos J. F. (2007). Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 172-177.
- Müller U., Vogel P., Alber G., Schaub G. A. (2008). The innate immune system of mammals and insects *Contrib. Microbiol.* **15**, 21-44.
- Na-Phatthalung P., Teles M., Tort L., Oliveira M. (2018). Gold nanoparticles exposure modulates antioxidant and innate immune gene expression in the gills of *Sparus aurata*. *Genomics.* **110**, 430-434.
- Nguyen L.T., Haney E. F., Vogel H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends. Biotechnol.* **29**, 464-72.
- Negut I., Grumezescu V., Grumezescu A. M. (2018). Treatment strategies for infected wounds. *Molecules.* **23**, 2392.
- Nicolas P. (2009). Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.* **276**, 6483-96.
- Niva C.C., Lee J. M., Myohara M. (2008). Glutamine synthetase gene expression during the regeneration of the annelid *Enchytraeus japonensis*. *Dev. Genes Evol.* **218**, 39-46.
- Njoroge J. M., Yourick J. J., Principato M. A. (2018). A flow cytometric analysis of macrophage-nanoparticle interaction *in vitro*: induction of altered Toll-like receptor expression. *Int. J. Nanomedic.* **13**, 8365-8378.
- Nonaka M. és Satake H. (2010). Urochordate immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **708**, 302-10.
- Nonaka M. (2014). Evolution of the complement system. *Subcell. Biochem.* **80**, 31-43.
- Novo M., Lahive E., Díez-Ortiz M., Matzke M., Morgan A. J., Spurgeon D. J., Svendsen C., Kille P. (2015). Different routes, same pathways: Molecular mechanisms under silver ion and nanoparticle exposures in the soil sentinel *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* **205**, 385-93.
- Nyberg K.G., Conte M. A., Kostyun J. L., Forde A., Bely A. E. (2012). Transcriptome characterization via 454 pyrosequencing of the annelid *Pristina leidyi*, an emerging model for studying the evolution of regeneration. *BMC Genomics.* **13**, 287
- Novikova E. L., Bakalenko N. I., Nesterenko A.Y., Kulakova M. A. (2013). Expression of Hox genes during regeneration of nereid polychaete *Alitta (Nereis) virens* (Annelida, Lophotrochozoa). *Evodevo.* **4**, 14.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005). Nanotechnology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Env. Health Pers.* **113**, 823-839.

- Ohta N., Shioda S., Sekizawa Y., Nakai Y., Kobayashi H. (2000). Sites of the expression of mRNA for lysenin a protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Cell Tissue Res.* **302**, 263–270.
- Okrzesik J., Kachamakova-Trojanowska N., Jozkowicz A., Morgan A. J., Plytycz B. (2013). Reversible inhibition of reproduction during regeneration of cerebral ganglia and coelomocytes in the earthworm *Dendrobaena venata*. *ISJ.* **10**, 151-161.
- Opper B., Németh P., Engelmann P. (2010). Calcium is required for coelomocyte activation in earthworms. *Mol. Immunol.* **47**, 2047-2056.
- Opper B., Bognar A., Heidt D., Németh P., Engelmann P. (2013). Revising lysenin expression of earthworm coelomocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **39**, 214–218.
- Otvos L. (2002). The short proline-rich antibacterial peptid family. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1138-1150.
- Özpolat B. D., Bely A. E. (2015). Gonad establishment during asexual reproduction in the annelid *Pristina leidy*. *Dev. Biol.* **405**, 123-36.
- Patricia C. S., Nerea G. V., Erik U., Elena S. M., Eider B., Darío D. M. W., Manu S. (2017). Responses to silver nanoparticles and silver nitrate in a battery of biomarkers measured in coelomocytes and in target tissues of *Eisenia fetida* earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **141**, 57-63.
- Peirson S. N., Butler J. N., Foster R. G. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**, e73.
- Petrányi Gy., Gyódi É. (2005). A fő hisztokompatibilitási rendszer (MHC) molekuláris genetikai szerepe a „saját és idegen” felismerésben és jelentősége a fajfejlődésben. *Magyar Tudomány.* **6**, 659-670.
- Pfeifer K., Dorresteijn A. W., Fröbuis A. C. (2012). Activation of *Hox* genes during caudal regeneration of the polychaete annelid *Platynereis dumerilii*. *Dev. Genes Evol.* **222**, 165-79.
- Pfeifer K., Schaub C., Wolfstetter G., Dorresteijn A. (2013). Identification and characterization of a twist ortholog in the polychaete annelid *Platynereis dumerilii* reveals mesodermal expression of Pdu-twist. *Dev. Genes Evol.* **223**, 319-28.
- Procházková P., Silerová M., Felsberg J., Josková R., Beschin A., De Baetselier P., Bilej M. (2006). Relationship between hemolytic molecules in *Eisenia fetida* earthworms, *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 381-92.
- Prochazková P., Roubalova R., Dvorak J., Navarro Pacheco N. I., Bilej M. (2020). Pattern recognition receptors in annelids. *Dev. Comp. Immunol.* **102**, 103493.
- Prajitha N., Athira S. S., Mohanan P. V. (2019). Bio-interactions and risks of engineered nanoparticles. *Environ. Res.* **172**, 98-108.
- Ribeiro M. J., Amorim M. J. B., Scott-Fordsmand J. J. (2019). Cell *in vitro* testing with soil invertebrates- challenges and opportunities toward modeling the effect of nanomaterials: a surface-modified CuO case study. *Nanomaterials (Basel).* **9**, 1087.
- Ringwood A. H., McCarth M., Bates T. C., Carroll D. L. (2010). The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* **69**, S49-51.
- Robichaud C.O., Uyar A. E., Darby M. R., Zucker L. G., Wiesner M. R. (2009). Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO<sub>2</sub> production as a basis for exposure assessment. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 4227–4233.
- Roch P., Valembois P., Davant N., Lassegues M. (1981). Protein-analysis of earthworm celomic fluid. 2. isolation and biochemical-characterization of the *Eisenia-fetida-andrei* factor (EFAF). *Comp. Biochem. Physiol.* **69**, 829-836.
- Roiff J., Schmid-Hempel P. (2016). Perspectives on the evolutionary ecology of arthropod antimicrobial peptides. *Philos. Trans. R. Soc. B.Biol. Scien.* **371**, 1695.

- Roh J. Y., Sim S. J., Yi J., Park K., Chung K. H., Ryu D. Y., Choi J. (2009). Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 3933-40.
- Rorat A., Kachamakova-Trojanowska N., Jozkowicz A., Kruk J., Cocquerelle C., Vandembulcke F., Santocki M., Plytycz B. (2014). Coelomocyte-derived fluorescence and DNA markers of composting earthworm species. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* **321**, 28-40.
- Sandiford S. L., Dong Y., Pike A., Blumberg B. J., Bahia A. C., Dimopoulos G. (2015). Cytoplasmic actin is an extracellular insect immune factor which is secreted upon immune challenge and mediates phagocytosis and direct killing of bacteria, and is a *Plasmodium* antagonist. *PLoS Pathog.* **11**, e1004631.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson, A. R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463–5467.
- Schikorski D., Cuvillier-Hot V., Leippe M., Boidin-Wichlacz C., Slomianny C., Macagno E., Salzet M., Tasiemski A. (2008): Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *J. Immunol.* **15**, 1083-95.
- Schmucker D., Clemens J. C., Shu H., Worby C. A., Xiao J., Muda M., Dixon J. E., Zipursky S. L. (2000). *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell.* **101**, 671-84.
- Sievers F., Higgins D. G. (2014). Clustal omega. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* **48**, 1–16.
- Sikes J. M., Bely A. E. (2010). Making heads from tails: development of a reversed anterior-posterior axis during budding in an acoel. *Dev. Biol.* **338**, 86-97.
- Škanta F., Roubalová R., Dvořák J., Procházková P., Bilej M. (2013). Molecular cloning and expression of TLR in the *Eisenia andrei* earthworm. *Dev. Comp. Immunol.* **41**, 694-702.
- Škanta F., Procházková P., Roubalová R., Dvořák J., Bilej M. (2016). LBP/BPI homologue in *Eisenia andrei* earthworms. *Dev. Comp. Immunol.* **54**, 1-6.
- Smith L. C., Clow L. A., Terwilliger D. P. (2001). The ancestral complement system in sea urchins. *Immunol. Rev.* **180**, 16-34.
- Soni G., Yadav K. S. (2014). Applications of nanoparticles in treatment and diagnosis of leukemia. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **47**, 156-64.
- Soni D., Naoghare P. K., Saravanadevi S., Pandey R. A. (2015). Release, transport and toxicity of engineered nanoparticles. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **234**, 1-47.
- Stein E. A., Avtalion R. R., Cooper E. L. (1977). The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Morphology and phagocytic properties. *J. Morphol.* **153**, 467-476.
- Stein E. A. és Cooper E. L. (1978) Cytochemical observation of coelomocytes from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Histochem. J.* **10**, 657-678.
- Steinmetz P. R., Urbach R., Posnien N., Eriksson J., Kostyuchenko R.P., Brena C., Guy K., Akam M., Bucher G., Arendt D. (2010). Six3 demarcates the anterior-most developing brain region in bilaterian animals. *Evodevo.* **29**, 1-14.
- Stensberg M. C., Wei Q., McLamore E. S., Porterfield D. M., Wei A., Sepulveda M. S., (2011). Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine.* **6**, 879–898.
- Takeo M., Yoshida-Noro C., Tochinai S. (2008). Morphallactic regeneration as revealed by region-specific gene expression in the digestive tract of *Enchytraeus japonensis* (*Oligochaeta*, *Annelida*). *Dev. Dyn.* **237**, 1284-94.
- Takeo M., Yoshida-Noro C., Tochinai S. (2010). Functional analysis of grimp, a novel gene required for mesodermal cell proliferation at an initial stage of regeneration in *Enchytraeus japonensis* (*Enchytraeidae*, *Oligochaeta*). *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 151-60.

- Tadokoro R., Sugio M., Kutsuna J., Tochinali S., Takahashi Y. (2006). Early segregation of germ and somatic lineages during gonadal regeneration in the annelid *Enchytraeus japonensis*. *Curr. Biol.* **16**, 1012-7.
- Tanaka E. M. és Reddien P. W. (2011). The cellular basis for animal regeneration. *Dev. Cell.* **21**, 172-85.
- Tao C. (2018). Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles: research progress, challenges and prospects. *Lett. Appl. Microbiol.* **67**, 537-543.
- Tasiemski A. (2008). Antimicrobial peptides in annelids. *ISJ.* **5**, 75–82.
- Tassanakajon A., Somboonwiwat K., Amparyup, P. (2015). Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **48**, 324–341.
- Tetreau G., Pinaud S., Portet A., Galinier R., Gourbal B., Duval D. (2017). Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate. *Front. Immunol.* **8**, 1249.
- Tessmar-Raible K. és Arendt D. (2003). Emerging systems: between vertebrates and arthropods, the Lophotrochozoa. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 331–340.
- Tettamanti G., Saló E., González-Estévez C., Felix D.A., Grimaldi A., de Eguileor M. (2008). Autophagy in invertebrates: insights into development, regeneration and body remodeling. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 116-25.
- Tourinho P. S., van Gestel C. A., Lofts S., Svendsen C., Soares A. M., Loureiro S. (2012). Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, **31**, 1679-92.
- Unrine J. M., Hunyadi S. E., Tsyusko O. V., Rao W., Shoults-Wilson W. A., Bertsch P. M. (2010). Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). *Environ. Sci Technol.* **44**, 8308-13.
- Vanhoof G., Goossens F., De Meester I., Hendriks D., Scharpé S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* **9**, 736-44.
- Wang X., Wang X., Zhang Y., Qu X., Yang S. (2003). An antimicrobial peptide of the earthworm *Pheretima tschiliensis*: cDNA cloning, expression and immunolocalization. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1317-23.
- Valembois P., Roch P., Lassegues M., Cassand P. (1982). Antibacterial activity of the hemolytic system from the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *J. Invertebr. Pathol.* **40**, 21-27.
- Valembois P., Lasségués M., Roch P., Vaillier J. (1985). Scanning electron-microscopic study of the involvement of coelomic cells in earthworm antibacterial defense. *Cell Tissue Res.* **240**, 479-484.
- Valembois P., Seymour J., Roch P. (1991). Evidence and cellular localization of an oxidative activity in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *J. Invertebr. Pathol.* **57**, 177–183.
- Valembois P., Lasségués M. (1995). *In vitro* generation of reactive oxygen species by free coelomic cells of the annelid *Eisenia fetida andrei*: an analysis by chemiluminescence and nitro blue tetrazolium reduction. *Dev. Comp. Immunol.* **19**, 195-204.
- Van der Ploeg M. J., Handy R. D., Waalewijn-Kool P. L., Van den Berg J. H., Herrera Rivera Z. E., Bovenschen J., Molleman B., Baveco J. H., Tromp P., Peters R. J., Koopmans G. F., Rietjens I. M, Van den Brink N. W. (2014). Effects of silver nanoparticles (NM-300K) on *Lumbricus rubellus* earthworms and particle characterization in relevant test matrices including soil, *Environ. Toxicol. Chem.* **33**, 743-752.
- Várhalmi E., Somogyi I., Kiszler G., Nemeth J., Reglodi D., Lubics A., Kiss P., Tamas A., Pollak E., Molnar L. (2008). Expression of PACAP-like compounds during the caudal regeneration of the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Mol. Neurosci.* **36**, 166-74.

- Vio V., Marchant M.J., Araya E., Kogan M.J. (2017). Metal nanoparticles for the treatment and diagnosis of neurodegenerative brain diseases, *Curr. Pharm. Des.* **23**, 1916-1926.
- Vitulo N., Dalla Valle L., Skobo T., Valle G., Alibardi L. (2017). Downregulation of lizard immuno-genes in the regenerating tail and myogenes in the scarring limb suggests that tail regeneration occurs in an immuno-privileged organ. *Protoplasma.* **254**, 2127-2141.
- Vriz S., Reiter S., Galliot B. (2014). Cell death: a program to regenerate. *Curr. Top. Dev. Biol.* **108**, 121-51.
- Watson F. L., Püttmann-Holgado R., Thomas F., Lamar D. L., Hughes M., Kondo M., Rebel V. I., Schmucker D. (2005). Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science.* **309**, 1874-8.
- Xiao N., Ge F., Edwards C.A. (2011). The regeneration capacity of an earthworms *Eisenia fetida*, in relation to the site of amputation along the body. *Acta Ecol. Sin.* **31**, 197–204.
- Xue Z., Li H., Wang X., Li X., Liu Y., Sun J., Liu C. (2015). A review of the immune molecules in the sea cucumber. *Fish Shellfish Immunol.* **44**, 1-11.
- Zachmann J. E., Molina J. A. (1993). Presence of culturable bacteria in cocoons of the earthworm *Eisenia fetida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1904–1910.
- Zaslhoff M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* **24**, 389-95.
- Zattara E. E., Bely A. E. (2013). Investment choices in post-embryonic development: quantifying interactions among growth, regeneration, and asexual reproduction in the annelid *Pristina leidy*. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* **320**, 471-88.
- Zhang L., Benz R., Hancock R.E. (1999). Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. *Biochemistry.* **38**, 8102-11.
- Zhao X., Zhao H., Yan L., Li N., Shi J., Jiang C. (2019). Recent developments in detection using noble metal nanoparticles. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **27**, 1-14.
- Zolnik B. S., González-Fernandez A., Sadrieh N., Dobrovolskaia M. A. (2010). Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology.* **151**, 458-65.
- Zoroddu M. A., Medici S., Ledda A., Nurchi V. M., Lachowicz J. I., Peana M. (2014). Toxicity of nanoparticles. *Curr. Med. Chem.* **21**, 3837-53.

## Publikációs lista

### A dolgozat alapjául szolgáló tudományos közlemények listája

Engelmann P., Hayashi Y., **Bodó K.**, Ernszt D., Somogyi I., Steib A., Orbán J., Pollák E., Nyitrai M., Németh P., Molnár L. (2016a). 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. *független idézetek száma: 6, IF:3,218.*

Engelmann P., Hayashi Y., **Bodó K.**, Molnár L. (2016b). New aspects of earthworm innate immunity: novel molecules and old proteins with unexpected functions. In: Ballarin L, Cammarata M (eds.) *Lessons in immunity: from single cell organisms to mammals.* Elsevier-Academic Press, New York Amsterdam, pp. 53-66. *független idézetek száma: 2.*

**Bodó K.**, Ernszt D., Németh P., Engelmann P. (2018). Distinct immune- and defense-related molecular fingerprints in separated coelomocyte subsets in *Eisenia andrei* earthworms. *ISJ.* 15:338-345. *független idézetek száma: 2, IF: 0,967.*

Engelmann P., **Bodó K.**, Najbauer J., Németh P. (2018): Annelida: Oligochaetes (Segmented Worms): Earthworm Immunity, Quo Vadis? Advances and New Paradigms in the Omics Era In: Edwin, L Cooper (szerk.) *Advances in Comparative Immunology Cham (Németország);* Springer International Publishing, pp. 135-159. *független idézetek száma: 3.*

**Bodo K.**, Boros A., Rumpler E., Molnar L., Borocz K., Nemeth P., Engelmann. P (2019). Identification of novel lumbricin homologues in *Eisenia andrei* earthworms. *Dev. Comp. Immunol.* 90:41-46. *független idézetek száma: 3, IF: 3,119.*

**Bodó K.**, Hayahi Y., Gerencsér G., László Z., Kéri A., Galbács G., Telek E., Mészáros M., Deli A. M., Tolnai G., Kokhanyuk B., Németh P., Engelmann P. Species-specific sensitivity towards noble metal nanoparticles: a multiparametric *in vitro* study of OECD standard soil sentinels. (Elbírálás alatt).

**Bodó K.**, Kellermayer Z., László Z., Kokhanyuk B., Németh P., Engelmann P. Unravelling the evolutionary conserved cell- and immunobiological mechanisms of tissue renewal in an non-classical invertebrate model organism. (előkészületben).



### Egyéb, a témában megjelent tudományos közlemény

Ećimović S., Velki M., Vuković R., Štolfa Čamagajevac I., Petek A., Bošnjaković R., Grgić M., Engelmann P., **Bodó K.**, Filipović-Marijić V., Ivanković D., Erk M., Mijošek T., Lončarić Z. (2018). Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere*. **212**, 307-318. *független idézetek száma: 4, IF: 4,427.*

### Egyéb tudományos közlemények listája

Szabo M., Sarosi V., Baliko Z., **Bodo K.**, Farkas N., Berki T., Engelmann P. (2017). Deficiency of innate-like T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*. **18**, 197. *független idézetek száma: 4, IF: 3,751.*

Borocz K., Csizmadia Z., Markovics A., Meszaros V., Farkas K., Telek V., Varga V., Maloba G. O., **Bodo K.**, Najbauer J., Berki T., Németh P. (2019). Development of a robust and standardized immunoserological assay for detection of anti-measles IgG antibodies in human sera. *J. Immunol. Methods*. **464**, 1-8. *független idézetek száma: 1, IF: 2,19.*

Kellermayer Z., Vojkovic D., Abu Dakah T., **Bodó K.**, Botz B., Helyes Zs., Berta G., Kajtár B., Schipeers A., Wagner N., Scotto L., O'Connor O. A., Arnold H. H., Balogh P. (2019). IL-22 Independent protection from colitis in the absence of Nkx.2.3 transcription factor in mice. *J. Immunol*. **202**, 1833-1844. *független idézetek száma: 3, IF: 4,718.*

Czigler A., Toth L., Szarka N., Berta G., Amrein K., Czeiter E., Lendvai-Emmert D., **Bodo K.**, Tarantini S., Koller A., Ungvari Z., Buki A., Toth P. (2019). Hypertension Exacerbates Cerebrovascular Oxidative Stress Induced by Mild Traumatic Brain Injury: Protective Effects of the Mitochondria-Targeted Antioxidative Peptide SS-31. *J. Neurotrauma*. **36**, 3309-3315. *független idézetek száma: 0, IF: 3,754.*

Hayden Zs., Böröcz K., Csizmadia Zs., Balogh P., Kellermayer Z., **Bodó K.**, Najbauer J., Berki T. (2019). Single-center study of autoimmune encephalitis-related autoantibody testing in Hungary. *Brain Behav*. **12**, e01454. *független idézetek száma: 0, IF: 2,072.*

*Összes független idézet száma: 25*

*Összesített IF: 28,216*

## A munkához kapcsolódó előadások listája

**K. Bodó,** Á. Boros, Z. László, É. Rumpler, L. Molnár, P. Németh, P. Engelmann. Identifications of novel lumbricins in *E. andrei* earthworms- a missing link of annelid's antimicrobial peptides. XXI Meeting of Italian Association of Developmental and Comparative Immunology, Italy, Varese, 2020.

P. Engelmann, **K. Bodó,** B. Kokhanyuk, P. Németh, Y. Hayashi. Earthworm cellular immunity: an old story re-loaded from the nanoparticle's point of view. XXI Meeting of Italian Association of Developmental and Comparative Immunology, Italy, Varese, 2020.

**K. Bodó,** Z. László, Z. Kellermayer, B. Kokhanyuk, G. Tolnai, P. Németh, P. Engelmann. Conserved tissue restoration and its immunological context in annelids. A Magyar Immunológiai Társaság 48. Vándorgyűlése, Bükkfürdő, 2019.

**Bodó K.,** Y. Hayashi, László Z., Gerencsér G., Kéri A., Galbács G., Telek E., Mészáros M., Tolnai G., B. Kokhanyuk, Németh P., Engelmann P. Evolúciósan konzervált stressz és immuntoxikológiai folyamatok: ezüst és arany nanopartikulumok *in vitro* kölcsönhatásának vizsgálata gerinctelen immunsejteken. TOX'2019 Tudományos Konferencia, Szeged, 2019.

**Bodó K.,** László Z., Kellermayer Z., Tolnai G., Rumpler É., Kokhanyuk B., Németh P., Engelmann P. A regeneráció és a veleszületett immunválasz filogenetikája: megfigyelések egy gerinctelen modellszervezetben. 49. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2019.

**K. Bodó,** Z. László, Á. Boros, É. Rumpler, B. Kokhanyuk, G. Tolnai, P. Németh, P. Engelmann. Uncovering the role of novel antimicrobial molecules in immunity, ontogenesis and segment restoration of *Eisenia andrei* earthworms. XXII. Tavaszai Szél Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia, Debrecen, 2019.

**K. Bodó,** Á. Boros, É. Rumpler, B. Kokhanyuk, Z. László, G. Tolnai, P. Németh, P. Engelmann. Identification of novel antimicrobial molecules in *Eisenia andrei* earthworms and their involvement in immunity, development and regeneration. XVI. János Szentágothai Multidisciplinary Conference and Student Competition, Pécs, 2019.

**K. Bodó,** G. Gerencsér, A. Kéri, G. Galbács, E. Telek, M. Mészáros, G. Tolnai, B. Kokhanyuk, P. Németh, P. Engelmann. Unravelling the hazards of metal nanomaterials: comparative observations on invertebrate phagocytes. A Magyar Immunológiai Társaság 46. Vándorgyűlése, Bükkfürdő, 2018.

**K. Bodó,** G. Tolnai, B. Kokhanyuk, G. Gerencsér, E. Telek, M. Mészáros, P. Németh, P. Engelmann. Unravelling the hazards of metal nanoparticles to *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida* immune cells. 8th International Workshop on Advances of Nanoscience, Szeged, 2018.

**K. Bodó,** É. Rumpler, Á. Boros, P. Németh, P. Characterization of novel antimicrobial molecules in *Eisenia andrei* earthworms and their involvement in immunity, development and regeneration. III. Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Budapest, 2018.

**K. Bodó,** Á. Boros, É. Rumpler, P. Németh, P. Cloning and characterization of potential antimicrobial proteins in *Eisenia andrei* earthworms. VI. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, 2017.

**K. Bodó**, G. Gerencsér, P. Németh, P. Engelmann. Immunotoxicity of metal nanoparticles to earthworm coelomocytes. A Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése, Velence 2015.

#### TDK előadások

PTE TTK Tudományos Diákköri Konferencia Biológia Szekció Pécs, 2016. Fém nanopartikulumok és *Eisenia* coelomasejtek kölcsönhatásának vizsgálata: *in vitro* tanulmányok.

PTE ÁOK Tudományos Diákköri Konferencia Immunológia Szekció Pécs, 2016. Ezüst ion és ezüst nanopartikulumok toxicitásának vizsgálata gerinctelen és gerinces immunsejteken.

XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Biológia Szekció Pécs, 2015. Ezüst és arany nanopartikulumok *in vitro* toxicitásának vizsgálata coelomasejteken.

PTE TTK Tudományos Diákköri Konferencia Biológia Szekció Pécs, 2014. Ezüst és arany nanopartikulumok *in vitro* toxicitásának vizsgálata coelomasejteken.

#### A munkához kapcsolódó poszter prezentációk listája

**Bodó K.**, Tolnai G., Boros Á., László Z., Kellermayer Z., Rumpler É., Kokhanyuk B., Németh P., Engelmann P. A regeneráció immunbiológiai mechanizmusa és a beta-catenin jelátvivő molekula szerepe *Eisenia andrei* giliszta fajban. Sejt,-Fejlődés,-és Össejtbiológusok Országos konferenciája, Gödöllő, 2019.

**K. Bodó**, É. Rumpler, Z. Kellermayer, G. Tolnai, Z. László, B. Kokhanyuk, P. Németh, P. Engelmann. Unravelling the evolutionary conserved cell- and immunobiological mechanisms of tissue renewal in a non-classical invertebrate model organism. Type-2 Immunity in Homeostasis and Disease, Bruges, Belgium, 2019.

B. Kokhanyuk, **K. Bodó**, Németh, P. Engelmann. Restoration kinetics of cellular immune components in earthworms following experimental depletion. Type-2 Immunity in Homeostasis and Disease, Bruges, Belgium, 2019.

B. Kokhanyuk, **K. Bodó**, G. Gerencsér, E. Telek, Németh, P. Engelmann. Uncovering the intricate interactions of metal nanoparticles and *Eisenia andrei* immune cells. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Researches, Pécs, 2018.

G. Tolnai, **K. Bodó**, Á. Boros, É. Rumpler, L. Molnár, B. Kokhanyuk, P. Németh, P. Engelmann. Differential distribution of earthworm  $\beta$ -catenin homologue in embryonic development vs. adult tissues and its involvement in tissue regeneration. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Researches, Pécs, 2018.

G. Tolnai, P. Engelmann, Á. Boros, É. Rumpler, L. Molnár, B. Kokhanyuk, P. Németh, **K. Bodó**. Phylogenesis of  $\beta$ -catenin: Identification and characterization in adult, developing and regenerating earthworms. A Magyar Immunológiai Társaság 46. Vándorgyűlése, Bükfürdő, 2018.

**K. Bodó, É. Rumpler, B. Kokhanyuk, P. Németh, P.** Evolutionary conserved cell- and immunobiological processes during tissue regeneration: comparative studies in an invertebrate model. 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, Hollandia, 2018.

**Bodó K., Kokhanyuk B., Németh P., Engelmann P.** Szöveti regenerációt kísérő, konzervált sejt, -és immunbiológiai folyamatok: összehasonlító vizsgálatok gerinctelen modellszervezetben. 48. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2018.

**Bodó K., Gerencsér G., Telek E., Mészáros M., Németh P., Engelmann P.** Fém nanopartikulumok sejtkárosító hatása *Eisenia andrei* és *Eisenia fetida* immunsejteken. 48. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2018.

**K. Bodó, Á. Boros, É. Rumpler, P. Németh, P. Engelmann.** Novel antimicrobial proteins in *Eisenia andrei* earthworms: implications for immunity, development and regeneration. Next Gen Immunology, Rehovot, Izrael, 2018.

**K. Bodó, A. Steib, É. Rumpler, Z. Kellermayer, P. Németh, P. Engelmann.** Differential expression of immune-related genes during embryogenesis and caudal regeneration in an Annelid, *Eisenia andrei*. A Magyar Immunológiai Társaság 46. Vándorgyűlése, Velence, 2017.

**Bodó K., Boros Á., Rumpler É., Ernszt D., Németh P., Engelmann P.** Antimikrobiális peptidok azonosítása és expressziója *Eisenia andrei* fajban. 47. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2017.

**Bodó K., Gerencsér G., Kengyel A., Németh P., Engelmann P.** Fém nanorészecskék és *Eisenia andrei* immunsejtek kölcsönhatásának vizsgálata: *in vitro* tanulmányok. 47. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2017.

**K. Bodó, Á. Boros, G. Tolnai, P. Németh, P. Engelmann.** Identification of potential antimicrobial molecules in *Eisenia andrei* earthworms. A Magyar Immunológiai Társaság 45. Vándorgyűlése, Velence, 2016.

**Bodó K., Gerencsér G., Németh P., Engelmann P.** Ezüst és arany nanopartikulumok *in vitro* toxicitásának vizsgálata *Eisenia andrei* és *E. fetida* coelomasejteken. 46. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2016.

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik nélkül PhD munkám nem valósulhatott volna.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Engelmann Péternek, aki tudományos diákköri munkámtól kezdve példamutatásával, hasznos gyakorlati és szakmai tanácsaival látott el.

Külön köszönettel tartozom az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet vezetőjének és korábbi vezetőjének, Prof. Dr. Berki Tímeának és Prof. Dr. Németh Péternek a szakmai támogatásukért, illetve az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet munkatársainak (különösen a „Hollóknak”).

Köszönettel tartozom Dr. Boros Ákosnak (PTE, KK, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet) a gyakorlati tanácsokért, a precíz kísérleti kivitelezésekért és az új módszerek megtanulásának a lehetőségéért, illetve Rumpfer Évának a támogatásáért. I am very grateful to Yuya Hayashi for his help and endurance. Továbbá köszönettel tartozom Dr. Gerencsér Gellértnek, a „Comet assay” módszerben nyújtott segítségéért.

Hálás vagyok a PTE TTK Biológiai Intézet munkatársainak, akikhez a mai napig segítségért fordulhatok. Külön köszönettel tartozom Dr. Molnár Lászlónak, hogy a giliszták biztosítása révén kísérleteimet el tudtam végezni, illetve az Állatszervezettani,- és Fejlődésbiológiai Tanszék minden munkatársának. Köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem munkatársainak (Dr. Csősz Éva, Dr. Czimmerer Zsolt) a proteomikai vizsgálatok megvalósításáért, illetve a Szegedi Tudományegyetem (Kéri Albert) és a SzBK (Dr. Mészáros Mária) munkatársainak a NP-ok karakterizálásában nyújtott segítségéért.

Viszont a legnagyobb köszönettel tartozom családomnak, páromnak és Tunának, hogy mindenben támogattak és segítettek, amely nemcsak a PhD tanulmányaimra vonatkozik.

Munkám az alábbi támogatások segítségével valósult meg:

PTE-ÁOK-KA 2017/4

EFOP-3.6.1.-16-2016- 00004

GINOP-2.3.3-15-2016-00020

GINOP 2.3.2-15-2016-00050

Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (Dr. Engelmann Péter)

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP0-19-3-I kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja.



## Phenotypic and functional characterization of earthworm coelomocyte subsets: Linking light scatter-based cell typing and imaging of the sorted populations



Péter Engelmann<sup>a,\*</sup>, Yuya Hayashi<sup>b</sup>, Kornélia Bodó<sup>a</sup>, Dávid Ernszt<sup>c,d</sup>, Ildikó Somogyi<sup>e</sup>, Anita Steib<sup>e</sup>, József Orbán<sup>d,f</sup>, Edit Pollák<sup>e</sup>, Miklós Nyitrai<sup>d,f,g</sup>, Péter Németh<sup>a</sup>, László Molnár<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>b</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark

<sup>c</sup> Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>d</sup> János Szentágothai Research Centre, Pécs, Hungary

<sup>e</sup> Department of Comparative Anatomy and Developmental Biology, Faculty of Sciences, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>f</sup> Department of Biophysics, Faculty of Medicine, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>g</sup> MTA-PTE Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Pécs, Hungary

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 May 2016

Received in revised form

22 June 2016

Accepted 22 June 2016

Available online 24 June 2016

#### Keywords:

FACS

Cytochemistry

Monoclonal antibody

Lectin binding

Phagocytosis

### ABSTRACT

Flow cytometry is a common approach to study invertebrate immune cells including earthworm coelomocytes. However, the link between light-scatter- and microscopy-based phenotyping remains obscured. Here we show, by means of light scatter-based cell sorting, both subpopulations (amoebocytes and eleocytes) can be physically isolated with good sort efficiency and purity confirmed by downstream morphological and cytochemical applications. Immunocytochemical analysis using anti-EFCC monoclonal antibodies combined with phalloidin staining has revealed antigenically distinct, sorted subsets. Screening of lectin binding capacity indicated wheat germ agglutinin (WGA) as the strongest reactor to amoebocytes. This is further evidenced by WGA inhibition assays that suggest high abundance of N-acetyl-D-glucosamine in amoebocytes. Post-sort phagocytosis assays confirmed the functional differences between amoebocytes and eleocytes, with the former being in favor of bacterial engulfment. This study has proved successful in linking flow cytometry and microscopy analysis and provides further experimental evidence of phenotypic and functional heterogeneity in earthworm coelomocyte subsets.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Innate immune responses in earthworms are maintained by humoral and cellular components. Earthworm coelomocytes are free-circulating immune cells in the coelomic cavity (Bilej et al., 2010; Cooper et al., 2002). In the late 19th and 20th century, coelomocytes were typified first based on light-microscopic observations (Liebmann, 1942). Since then, the nomenclature of the distinct coelomocyte subtypes was rather diffuse based on the applied morphological terminology analogous to vertebrate leukocytes

(Jamieson, 1981; Valembos et al., 1985).

In general, earthworm coelomocytes can be divided into amoebocyte and eleocyte subgroups. Amoebocytes are characterized by the relatively large eccentric nucleus and numerous pseudopodia. Using various hematological staining methods and/or based on light- and electron microscopic evaluations amoebocytes can be further classified (Stein et al., 1977; Linthicum et al., 1977). The described subgroups may represent various maturation stages of coelomocytes. In the case of eleocytes the picture is less complicated since these cells represent a more homogeneous group.

These immunocytes have a mesodermal origin (Engelmann et al., 2005; Vetvicka and Sima, 2009), but so far properly defined hematopoietic organs have not been identified in earthworms (Fischer, 1993). Although not confirmed, some believe

\* Corresponding author. Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs, Pécs, H-7643, Szigeti u. 12, Hungary.

E-mail address: [engelmann.peter@pte.hu](mailto:engelmann.peter@pte.hu) (P. Engelmann).

coelomocytes are rather loosely produced by the epithelial lining of the coelomic cavity adjacent to the gut and longitudinal muscle layers (Jamieson, 1981). It is likely that the various subpopulations of coelomocytes have different maturation sites (Liebmann, 1942; Jamieson, 1981). However there is no clear consensus whether the various morphological subtypes are separate lineages or transient cells in the course of maturation.

In contrast, eleocytes (or free-floating chloragocytes) are originated from the chloragogenous tissue covering the alimentary canal (Homa et al., 2013). Eleocytes are considered as a final maturation stage of sessile chloragocytes. This hypothesis is supported mainly by morphological observations of certain intracellular structures (chloragosomes) of eleocytes/chloragocytes (Prentø, 1986). Sometimes these structures are referred to as modified, tertiary lysosomes (Molnár et al., 2012; Varute and More, 1972).

Flow cytometry is a common approach to study the two major subpopulations of earthworm coelomocytes (amoebocytes and eleocytes) as these cells can be separately gated according to their light scatter profiles (corresponding to their size and granularity). Using this approach, several authors have provided valuable data about the different functional aspects (e.g. cytotoxicity, phagocytosis, proliferation, and ecotoxicology) of earthworm coelomocytes (Cossarizza et al., 1996; Fuller-Espie et al., 2008; Homa et al., 2013; Vernile et al., 2007). However, the link between the light scatter-based two subpopulations and microscopy-based phenotyping remains obscured, with no clear consensus on the cell types encompassed in the coelomocyte populations. Here we show, by means of light scatter-based cell sorting, the two major subpopulations can be physically isolated with downstream morphological, cytochemical and functional analysis of sorted populations. Our results confirm the previously documented phenotypic features of amoebocytes and eleocytes, with the first example of performing post-sort functional assays in earthworm coelomocytes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Earthworm husbandry

Breeding stocks of *Eisenia andrei* earthworms were maintained at room temperature and fed with manure complemented soil. Prior to coelomocyte harvesting earthworms were placed onto moist tissue paper for overnight depuration.

### 2.2. Extrusion of coelomocytes

Coelomocytes were collected as described earlier (Engelmann et al., 2004) and cell numbers were evaluated by the trypan-blue exclusion method.

### 2.3. Flow cytometry and cell sorting

Single coelomocyte suspensions isolated from earthworms were sorted according to their forward scatter/side scatter (FSC/SSC) characteristics that reflect the differences in cell size and granularity. Collected coelomocytes were kept in *Lumbricus* balanced salt solution (LBSS) (Engelmann et al., 2005) complemented with 1% fetal bovine serum (FBS, Biowest, Nuaille, France) and 5 mM EDTA (Sigma–Aldrich, Hungary) to avoid cell aggregation. Sorting of amoebocyte and eleocyte subpopulations was performed by FACSAria III (BD Biosciences) cell sorter. Sorted coelomocytes were collected in RPMI-1640 medium supplemented with 1% FBS and 1% penicillin and streptomycin for better survival. Data acquisition and analysis of sorting were executed by FACS DiVa Software. Pre-sort

and post-sort viability was monitored by 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, Biotium) using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). The collected flow cytometry data were analyzed with CellQuest (BD Biosciences), FCS Express (De Novo Software, Los Angeles CA, USA) and FlowJo (Ashland, OR, USA) softwares.

### 2.4. Scanning electron microscopy

Sorted amoebocytes and eleocytes ( $10^5$ /ml) were deposited onto silicon wafers. After 1 h the cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 30 min, and subsequently postfixed with 1% osmium tetroxide for 30 min. Following rounds of gentle washings with PBS, the cells were gradually dehydrated by increasing ethanol concentrations before incubation in 100% bis(trimethylsilyl)amine (hexamethyldisilazane or HMDS) for 3 min and air-dried completely. The samples were then sputtered with gold (nominal 30 nm coating) and imaged by scanning electron microscopy (NovaSEM 600 FEI company, the Netherlands).

### 2.5. Transmission electron microscopy

Sorted amoebocytes and eleocytes were fixed in a mixture of 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde for electron microscopic post-embedding morphological observations. The fixative was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and the specimens were incubated for 2 h at room temperature. Samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h at 4 °C. For post-embedding structural observations, the cells were dehydrated and embedded into epoxy resin (Durcupan ACM, Sigma–Aldrich). Serial ultrathin (60–70 nm) sections were cut with a Reichert ultramicrotome. Grids were then washed in drops of distilled water, counterstained in uranyl acetate and lead citrate. Observation and documentation were carried out with a JEOL-1200 (JEOL USA, Inc, Peabody, MA, USA) transmission electron microscope.

### 2.6. Cytochemistry

Sorted coelomocyte subpopulations (80 µl of  $5 \times 10^5$ /ml) were spread onto glass slides using Cytospin 3 (SHANDON, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA) apparatus. Haematoxylin-eosin and May-Grünwald-Giemsa stainings were performed following standard protocols. For visualization of polysaccharides the cytospin preparations were incubated in 1% periodic acid for 10 min followed by 10 min of incubation in Schiff's reagent.

For lipid visualization the samples were fixed in 10% formalin, and were stained with Oil Red O solution (Sigma–Aldrich) for 10 min. Subsequently, 60% isopropanol was applied for differentiation of the specimens. Following the different staining procedures haematoxylin counterstaining was performed.

### 2.7. Enzyme cytochemistry

For acid phosphatase activity the cytospin samples were fixed in formalin and incubated for 3 h with the reaction mixture. The reaction mixture constituted of 10 mg naphthol AS-BI phosphate (Sigma–Aldrich) in dimethylformamide (DMF), a solution of 4% pararosaniline, 2% aqueous HCl and an aqueous solution of 4% NaNO<sub>2</sub> (Sigma–Aldrich). After the incubation coelomocytes were washed in sodium acetate buffer and counterstained with haematoxylin.

Alkaline phosphatase activity was monitored with the mixture of nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Biotium) in substrate buffer (100 mM Tris–HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) for 20 min. NBT and BCIP were dissolved in 70% and 100% dimethylformamide, respectively. Nuclear

counterstaining was performed with 1% neutral red solution. For cytochrome c oxidase (CCO) activity the coelomocyte subpopulations were incubated with a reaction mixture for 2 h. The reaction mixture constituted of 10 mg cytochrome c, 4 mg catalase and 5 mg 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in 0.1 M phosphate buffer (pH: 7.4). Nuclear counterstaining was performed with haematoxylin.

For succinate dehydrogenase (SDH) activity coelomocyte subgroups were incubated with a reaction mixture (100 mg NBT, 500 mM sodium succinate in 0.1 M phosphate buffer, pH: 7.6) for 15 min at 37 °C. Nuclear counterstaining was performed with 1% neutral red solution.

## 2.8. Phalloidin labeling and immunofluorescence staining of coelomocytes

Cytospins of coelomocyte subpopulations were fixed in 4% paraformaldehyde, followed by washing with PBS/0.1% Triton X-100. Samples were incubated with 5% BSA for 20 min to avoid non-specific binding then incubated with Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA). In double immunofluorescence assays mouse IgG fractions of FITC-conjugated anti-EFCC3, anti-EFCC4 or anti-EFCC5 mAb (1:100) (Engelmann et al., 2005; Oppen et al., 2013) along with Alexa Fluor 568 Phalloidin (Invitrogen) was used. Control slides were incubated with mouse IgG1-FITC (BD Biosciences), otherwise prepared similarly. Propidium iodide (PI, Invitrogen) was applied for counterstaining of Alexa Fluor 488 Phalloidin staining that strongly binds cytoskeletal filaments of actin.

## 2.9. Confocal microscopy and image analysis

Images were captured on a laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM 710 upright microscope and 63 × Plan-Apochromat oil-immersion objective [NA: 1.4], Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) by using ZEN 2010 software (Carl Zeiss Microscopy).

## 2.10. Lectin stainings

Sorted and unsorted coelomocyte subpopulations were labeled with FITC-conjugated *Arachis hypogaea* peanut agglutinin (PNA), *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), *Lens culinaris* agglutinin (LCA) and *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and Alexa Fluor 488 conjugated concanavalin A (ConA), phytohemagglutinin (PHA), wheat germ agglutinin (WGA) (Vector Laboratories). Lectin stainings were performed in PBS complemented with 0.1% BSA and 0.1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution for 30 min. After washing labeled cells were observed in flow cytometry. For inhibition 1 h prior to the staining Alexa Fluor 488 conjugated WGA were preincubated with 10 mM or 100 mM of N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc, Sigma Aldrich) or 10 mM of N-acetylneuraminic acid (sialic acid, Neu5Ac, Sigma Aldrich). For microscopic evaluations the cytopins of sorted coelomocyte subpopulations were prepared. Following acetone fixation 5% BSA was used to inhibit the unspecific binding for 20 min, then Alexa Fluor 488-WGA conjugate was applied for 30 min. Cell nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) and then observed with Olympus BX61 microscope and AnalySIS software (Olympus Hungary, Budapest).

## 2.11. Preparation and treatment of coelomocyte lysate

Sorted amoebocytes, eleocytes and unsorted (total) coelomocytes were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris/HCl; pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5% (w/v) Na-deoxycholate, 5 mM EDTA, 0.1% SDS) complemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-

Aldrich) on ice for 15 min and then centrifuged at 16060g (15 min, 4 °C). Protein concentrations of amoebocyte, eleocyte and unsorted (total) coelomocyte lysates were measured with BCA Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Some aliquots of the samples were subjected to PNGase F (Sigma-Aldrich) digestion according to the manufacturer's protocol.

## 2.12. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and WGA ("Eastern") blots

Proteins were separated on 10% polyacrylamide gels, topped by a 4% stacking gel using Mini-Protean 3 apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Separated proteins were blotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad) in blotting buffer at 4 °C for 2 h. Subsequently, nitrocellulose sheets were incubated in PBS containing 2% (v/v) Tween 20 for 2 min at room temperature (Nagy et al., 2013). Afterwards blots were incubated with HRP-conjugated WGA (1:1000, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Briefly, HRP-conjugated WGA was diluted in PBS containing 0.05% Tween, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> for 16 h at room temperature. ECL reagents (Pierce) were used to visualize the membranes. Chemiluminescent signals were detected with Fuji LAS4000 Imaging System (Fuji, Japan).

## 2.13. In vitro bacterial challenge and detection of phagocytosis after sorting

Sorted coelomocyte subpopulations were incubated with FITC conjugated heat-inactivated *Staphylococcus aureus* (OKI II2001) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) overnight at room temperature. Both amoebocytes and eleocytes (10<sup>6</sup> each) vs. bacteria (10<sup>7</sup>) were mixed in 1 ml final volume of RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin in 24-well plates (Falcon, BD Labware). Following incubations, samples were washed in LBSS. Prior to flow cytometry trypan blue were added to the samples to elucidate bound/ingested bacteria by quenching.

## 2.14. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Microcal Origin (Microcal Software Inc., Northampton, MA USA). Data were calculated from three independent experiments. Results are presented as mean and all error bars represent the standard error of the mean. The effect of treatments was analyzed by one way-ANOVA.  $p < 0.05$  was denoted as statistically significant.

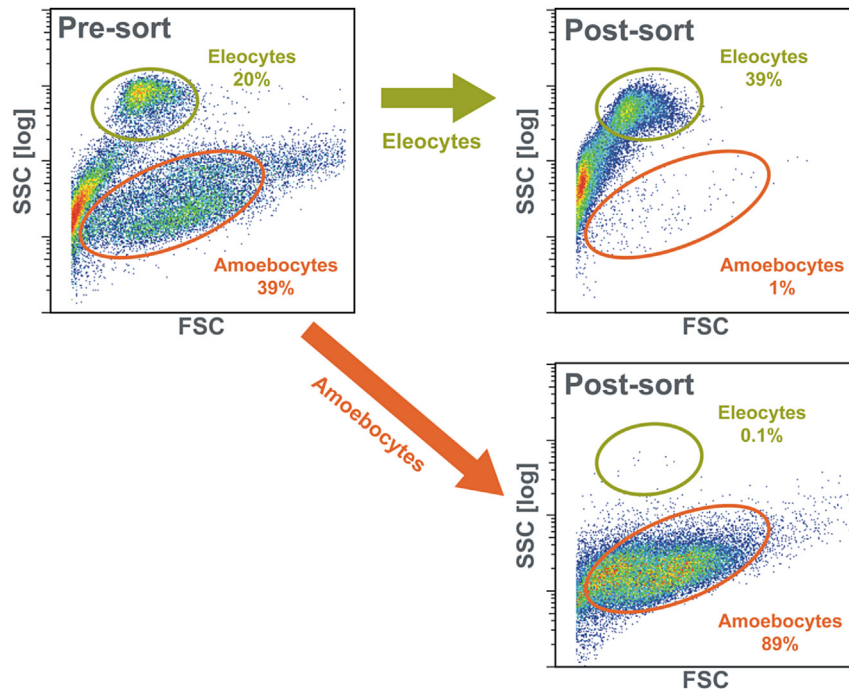
## 3. Results

### 3.1. Separation of coelomocyte subsets by cell sorting

We separated the coelomocyte subpopulations by a FACS device based on their physical manifestations (size and granularity), that is not relying on fluorescence but on the distinct light scatter pattern of amoebocytes and eleocytes (Fig. 1). Post-sort analysis showed enrichment of intact amoebocytes from 39% to 89%, and intact eleocytes from 20% to 39%, giving an enrichment factor of around two in each case. It should be noted, in both cases, cross-contamination was negligible as verified by extremely low fractions of contaminating cells (0.1% intact eleocytes in the sorted amoebocyte population and 1% intact amoebocytes in the sorted eleocyte population). The low recovery percentage of intact eleocytes (39% after sorting) can be reasonably explained by the presence of released chloragosomes derived from eleocytes (as seen in both pre-sort and post-sort analyses in Fig. 1).

Post-sort cell viability assays indicated a high survival rate





**Fig. 1. Presorting and postsorting distributions of coelomocyte subsets.** Freshly collected earthworm coelomocytes demonstrate two major subpopulations (amoebocytes and eleocytes) in flow cytometry. Following sorting the purity of both sorted subpopulations was monitored by conventional flow cytometry measurements. Note the low recovery percentage of intact eleocytes likely due to the release of chloragosomes that appear in the lower FSC and SSC values.

(85–89%) for sorted amoebocytes (**Electronic supplementary material, Fig. S1**), while we could not evaluate the alive/dead eleocyte ratio due to their high endogenous fluorescence that manifested in a wide range of fluorescence spectra.

Subsequently, the sorted coelomocyte subpopulations were further characterized based on their ultrastructural and cytochemical properties (Figs. 2–4, Fig. S2 and Table 1).

### 3.2. Coelomocyte subsets exert distinct antigen and actin-cytoskeleton patterns

Sorted coelomocytes were further studied by fluorochrome-conjugated phalloidin labeling and coelomocyte specific mAb-based immunocytochemistry. Phalloidin binds to actin filaments that build up the microfilament-based cytoskeleton. Binding of the toxin conserves the cellular actin pool in filament state and by the fluorescent labeling it results in high imaging contrast of the bundles of filaments compared to the monomer actin in the cytoplasm. In confocal imaging actin filaments and bundles in the cells are highlighted by Alexa Fluor 488-coupled phalloidin labeling. This feature was especially prominent in the case of filopodium/pseudopodium formation of amoebocytes (Fig. 5a). In contrast, actin patterns were considerably different in eleocytes. Hereby, actin filaments were lined through the cytoplasm and their pattern was determined mostly by smaller and larger chloragosomes (Fig. 5b). There was no extended actin-cluster formation in the eleocytes compared to the amoebocytes.

Earlier we raised a panel of specific mAbs against earthworm coelomocytes (anti-EFCC clones) that were used in several phenotypic and functional assays (Engelmann et al., 2005; Oppen et al., 2013). In this study we combined the phalloidin staining with an immunocytochemical approach applying anti-EFCC3, anti-EFCC4 and anti-EFCC5 mAbs from the aforementioned cluster of *Eisenia* coelomocyte-specific antibodies. As we described earlier anti-EFCC3 mAb marks hyaline amoebocytes that are able to aggregate

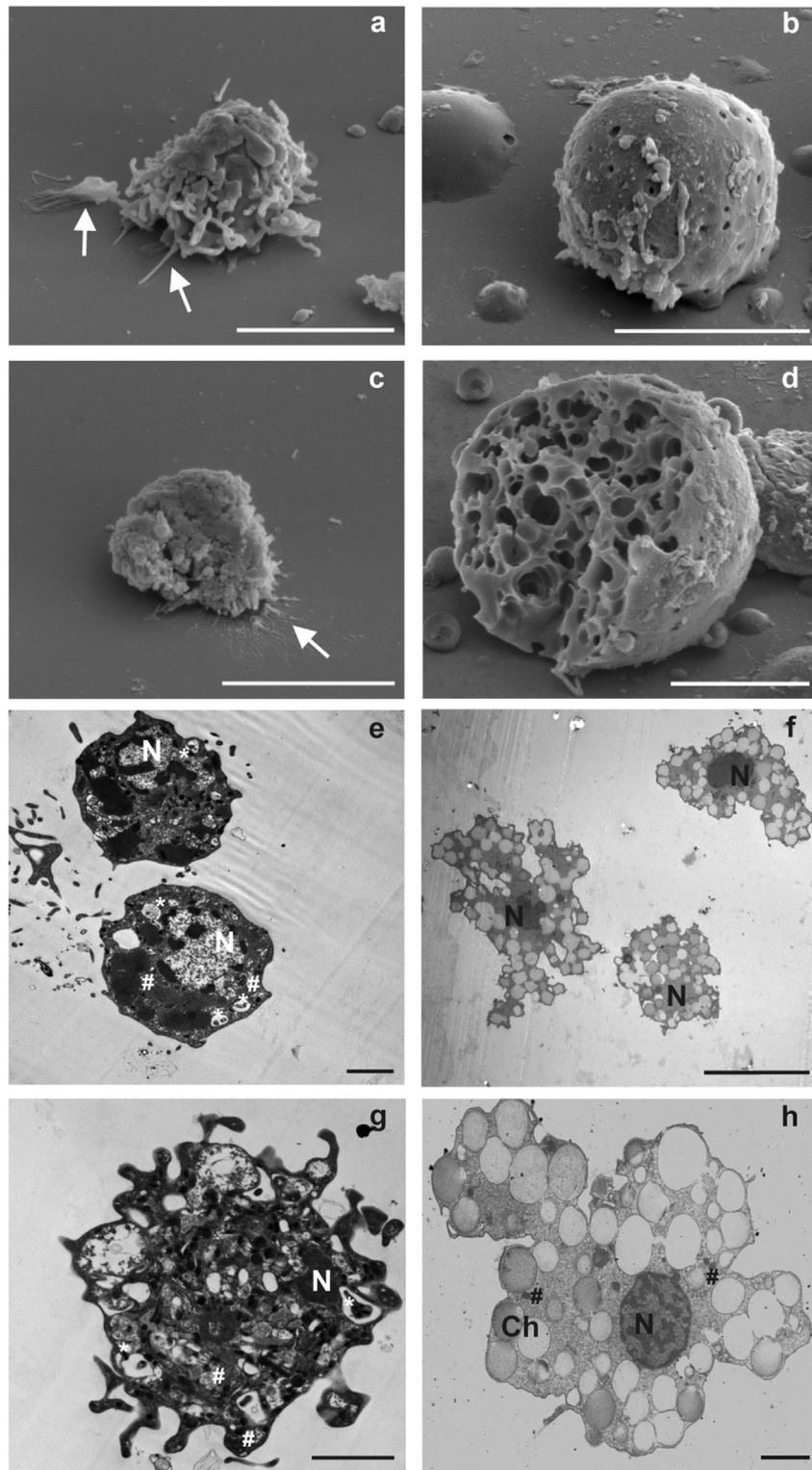
each other and participate mainly in phagocytosis. Indeed, in the sorted populations, FITC-conjugated anti-EFCC3 mAb only resulted in strong intracellular staining only in the amoebocyte subpopulation (Fig. 5c), and eleocytes were consistently negative (Fig. 5d). Anti-EFCC4 mAb stained (characteristic for granular amoebocytes) intracellularly only a fraction of cells from the sorted amoebocyte population (Fig. 5e), while eleocytes were marked only with Alexa Fluor 568 phalloidin conjugate (Fig. 5f). A-EFCC4 and phalloidin positive cells (Fig. 5e) typically showed less pronounced actin bundles compared to the anti-EFCC3 positive cells (Fig. 5c).

In contrast, staining with anti-EFCC5 mAb revealed negative reaction in the amoebocytes population (only the phalloidin staining was observable) (Fig. 5g), while the eleocytes proved to be positive for this antibody staining with a typical granular pattern (Fig. 5h).

### 3.3. Strong WGA binding specifies the amoebocyte subpopulation

Sorted coelomocyte subsets were further characterized regarding to their lectin-binding properties. Several fluorochrome-coupled plant lectins were applied in the flow cytometry-based assays resulting in various staining patterns (Table 2). Among the tested lectins the strongest reaction was revealed by wheat germ agglutinin (WGA) (Fig. 6a and Fig. S3). Robust WGA positivity was observed in the amoebocyte subsets (Fig. 6a), while eleocytes (Fig. 6b) were marked by very low/weak staining for this lectin. In fluorescence microscopy the previous findings were supported since sorted amoebocytes (Fig. 6c) were strongly WGA positive in contrast to eleocytes (Fig. 6d).

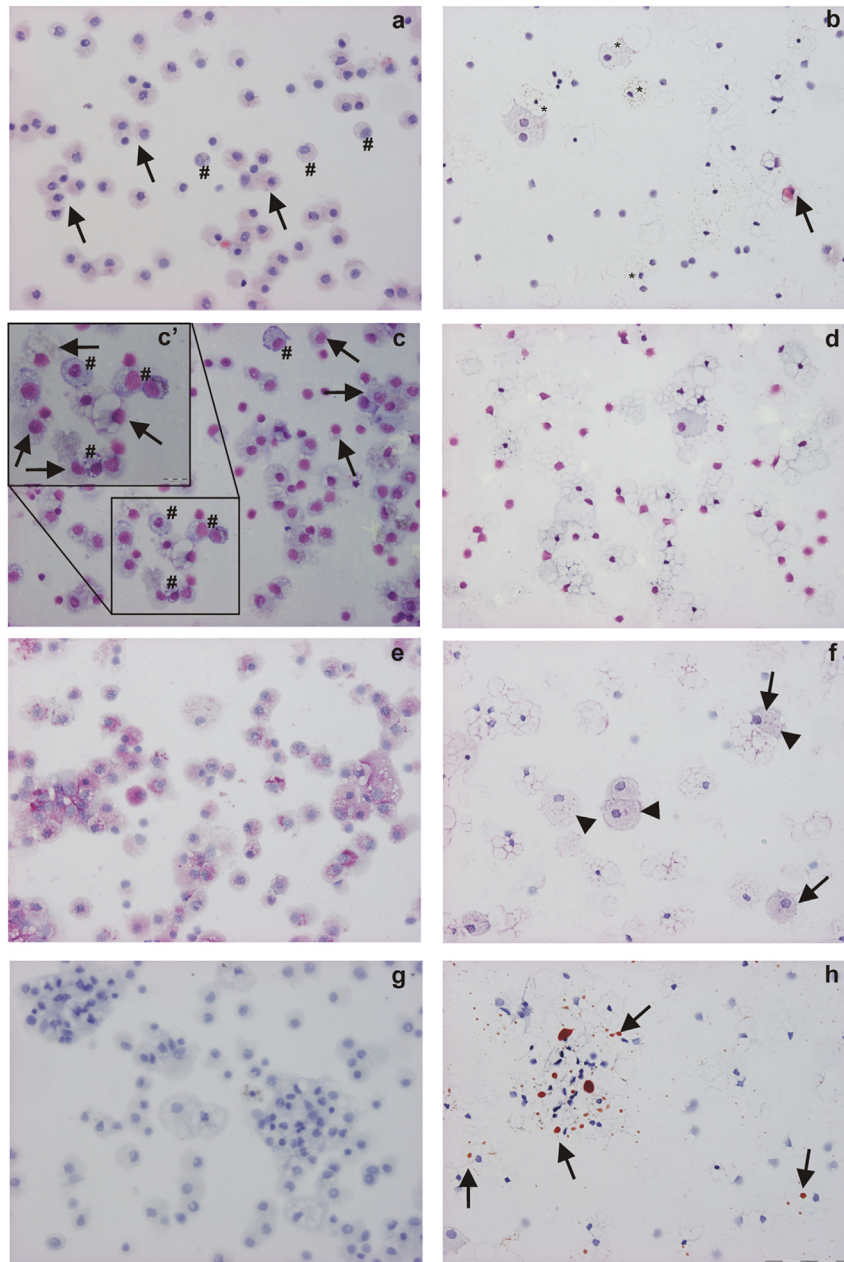
In order to further characterize the WGA-recognized glycosylation pattern of coelomocyte proteins we performed a lectin-blot (Fig. 6e). Proteins of unsorted (total) and sorted coelomocyte cell lysates were separated by SDS-PAGE, blotted and probed with HRP-conjugated WGA. Strong, characteristic isolated bands were recognized at 46 and 58 kDa by WGA. Indeed, these bands were



**Fig. 2. Scanning and transmission electron microscopy images of sorted coelomocyte subpopulations.** (a) Sorted hyaline amoebocytes exert a flattened cell shape and rough cell surface structures with numerous filopodia (arrows) observed by SEM. Granular amoebocytes (c) projects several small pseudopodia (arrow). In contrast to amoebocytes, eleocytes (b) have a round-like cell shape with no cellular extrusions. Intracellular chloragosomes (d) are revealed in the disrupted eleocyte. Hyaline amoebocytes (e) show typical phagocyte-related characteristics by TEM. Several phagolysosomal granules (asterisks) with ingested material can be distinguished (e) and numerous mitochondria (number signs) are also observable in the cytoplasm. Typical granular amoebocyte (g) harbors numerous phagolysosomes (asterisks) and many mitochondria (number signs). Eleocytes (f and h) are easily distinguishable by their polymorphic, large chloragosomes (Ch) small nucleus (N) and few mitochondria (number signs). Scale bars: 5  $\mu\text{m}$  (a–d), 2  $\mu\text{m}$  (e, g, h), and 10  $\mu\text{m}$  (f).

more pronounced in the amoebocyte fraction, compared to the lanes of eleocytes or unsorted (total) samples (Fig. 6e).

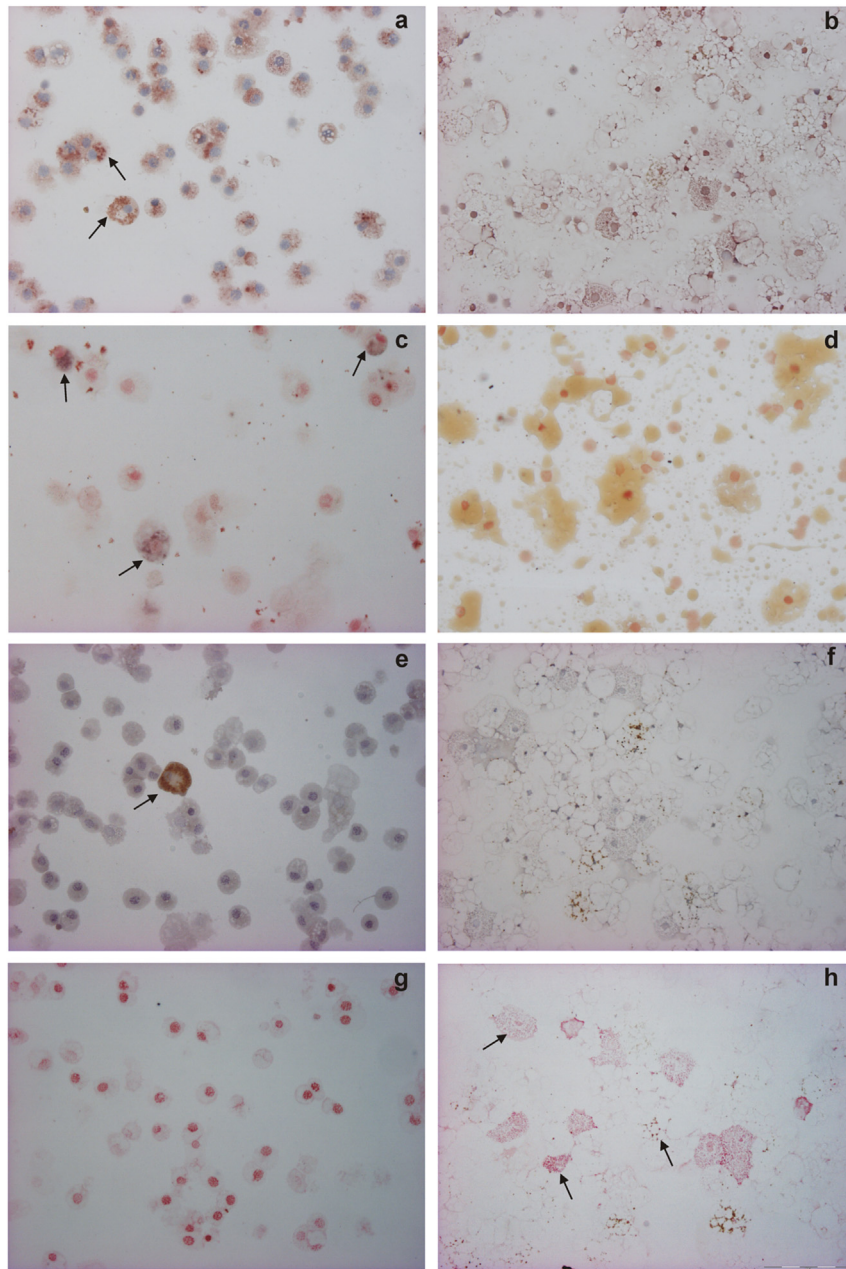
WGA lectin binds predominantly to N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) residues of the proteins. In our next attempt we inhibited



**Fig. 3. Cytochemical features of sorted amoebocytes and eleocytes.** Haematoxylin-eosin staining has proved a homogeneous amoebocyte (a) population with similar morphologic appearance after sorting. Most of the sorted population is made up by the hyaline amoebocytes (arrows), while only a small percentage of granular amoebocytes (number signs) are present. Separated eleocytes (b) were clearly distinguishable by their intracellular, brownish chloragosomes (asterisks) and less or more centrally positioned, small nucleus. Small number of contaminating amoebocytes can be observed (arrow). (c) By means of May-Grünwald-Giemsa staining most separated amoebocytes appeared with pale blue cytoplasm (arrows) that is typical for hyaline amoebocytes. Some amoebocytes have numerous intracellular granules and darkly stained cytoplasm (number signs) that is characteristic for granular amoebocytes (c and c'). Eleocytes evidenced weak staining with May-Grünwald-Giemsa solution (d). Amoebocytes were strongly PAS positive (e) in contrast to eleocytes (f). PAS positive granules are seldom found in eleocytes (arrowheads) and some PAS positivity can be observed surrounding the eleocytes (arrows) as well. Sorted amoebocytes (g) showed no evidence for harboring neutral lipids, while eleocytes (h) contained many lipids (arrows) demonstrated by Oil Red O staining. Haematoxylin nuclear counterstaining was performed following PAS and Oil Red O reactions. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$  (c'), 100  $\mu\text{m}$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the WGA binding toward amoebocytes by pre-incubation of WGA with different concentrations of GlcNAc (10 mM and 100 mM). We observed a dose-dependent inhibition of WGA binding to the amoebocytes compared to the control amoebocytes labeled by untreated WGA (Fig. 6f). Furthermore, we analyzed whether PNGase F digestion would diminish the WGA binding on coelomocyte proteins. We observed that this enzyme digestion totally removed the WGA recognized sugar ligands demonstrated by

subsequent blots (Fig. S3). It is known that WGA is able to recognize sialic acid (*N*-Acetylneuraminic acid, Neu5Ac) residues as well. Employing flow cytometry we tested whether the 10 mM Neu5Ac preincubated WGA still maintain the capability to contact with the sugar residues of amoebocytes. In this experiment we did not observe any inhibition compared to the only WGA incubated positive control or GlcNAc pretreated sample (data not shown).



**Fig. 4. Enzyme cytochemical characteristics of sorted coelomocyte subsets.** Acid phosphatase (AcP) activity was observable in the majority of sorted amoebocytes (**a**, arrows). The AcP reaction concentrates mainly in intracellular granules. In contrast, eleocytes (**b**) exhibit no AcP activity. Alkaline phosphatase (ALP) was also typically active (arrows) in the purified amoebocytes population (**c**), while eleocytes seem not to possess this enzyme activity (**d**). Cytochrome C oxidase (CCO) had evidenced low activity (arrow) in separated amoebocytes (**e**), but not in eleocytes. Succinate dehydrogenase (SDH) enzyme activity was absent in amoebocytes (**g**), but SDH activity could be well monitored (arrows) in eleocytes (**h**). Haematoxylin and 1% neutral red counterstainings were performed following AcP, CCO and ALP, SDH enzyme reactions, respectively. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

#### 3.4. Amoebocytes are the dominant phagocytic cell type within coelomocyte subsets

As a proof-of-concept functional study, we assessed the capability of the sorted subpopulations to mediate phagocytosis as a typical cellular immune mechanism. To verify that the cell sorting process itself does not affect the cell viability, sorted coelomocytes were assessed for their survival rate prior/after to the phagocytosis assays. A high number of sorted amoebocytes survived during the post incubation period (>85%) of phagocytosis (Fig. S4). Sorted amoebocyte and eleocyte subpopulations were cultured *in vitro* in

the presence of FITC-conjugated *E. coli* or *S. aureus* bacteria strains. After 24 h of incubation cells were collected and were measured by flow cytometry using trypan blue quenching to evaluate the bound/engulfed bacteria. Indeed, amoebocytes reflected strong phagocytic activity (Fig. 7a) against both bacteria stains in contrast to separated eleocytes (Fig. 7b). Upon bacterial challenge amoebocytes significantly engulfed the FITC-*E. coli* compared to untreated amoebocytes ( $p = 0.029$ ). In addition, FITC-labeled *S. aureus* were also ingested by the amoebocytes; however, it did not differ significantly from the control amoebocytes (Fig. 7c). In the case of eleocytes we did not observe significant engulfment of either

**Table 1**  
Ultrastructural and cytochemical properties of separated coelomocyte subsets.

	Amoebocytes	Eleocytes
<b>Ultrastructural morphology</b>		
SEM	- <b>hyaline:</b> flattened cells with long filopodia (Fig. 2a) - <b>granular:</b> adherent cells with small filopodia (Fig. 2c)	round cell shape, no filopodium (Fig. 2b), some eleocytes have spherical hollows resembling chloragosomes (Fig. 2d, Fig. S2)
TEM	- <b>hyaline:</b> 6–8 µm large, condensed nucleus with prominent heterochromatin/euchromatin pattern, phagolysosome-rich cytoplasm, fine pseudopodia (Fig. 2e) - <b>granular:</b> several, small pseudopodia, cytoplasm is packed with smaller, and larger granules (Fig. 2g)	centrally located nucleus with heterochromatin clumps, lipid droplets and glycogen-rich cytoplasm filled with chloragosomes that are varied in size and electron-dense (Fig. 2f, h)
<b>Cytochemical characteristics</b>		
Haematoxylin & eosin	large, dark nucleus and pale cytoplasm (Fig. 3a)	no cytoplasm staining, chloragosomes with yellowish, brownish coloration (Fig. 3b)
May-Grünwald-Giemsa	- <b>hyaline:</b> pale blue cytoplasm, centrally located red nucleus (Fig. 3c) - <b>granular:</b> darkly stained cytoplasm filled with granules (Fig. 3c, c')	no cytoplasm staining, shrunken nucleus and merged granules (Fig. 3d)
Periodic Acid-Schiff	strong staining with occasional granular appearance (Fig. 3e)	some weak PAS positive granules in the cytoplasm (Fig. 3f)
Oil Red O	no reaction observed (Fig. 3g)	fine orange droplets varied in size (2–5 µm) (Fig. 3h)
<b>Enzyme characteristics</b>		
AcP	+++ (Fig. 4a)	+/- (Fig. 4b)
ALP	+++ (Fig. 4c)	- (Fig. 4d)
CCO	+ (Fig. 4e)	- (Fig. 4f)
SDH	- (Fig. 4g)	++ (Fig. 4h)

bacteria strain compared to controls (Fig. 7d).

#### 4. Discussion

Free-floating coelomocytes can be easily and non-invasively retrieved from earthworms for an array of downstream applications (Engelmann et al., 2004). Indeed, the different subpopulations have unique phenotypic and functional features that deserve further characterization using various separation techniques as demonstrated for immunocytes from other invertebrate taxa (Tirouvanziam et al., 2004; Cueto et al., 2015).

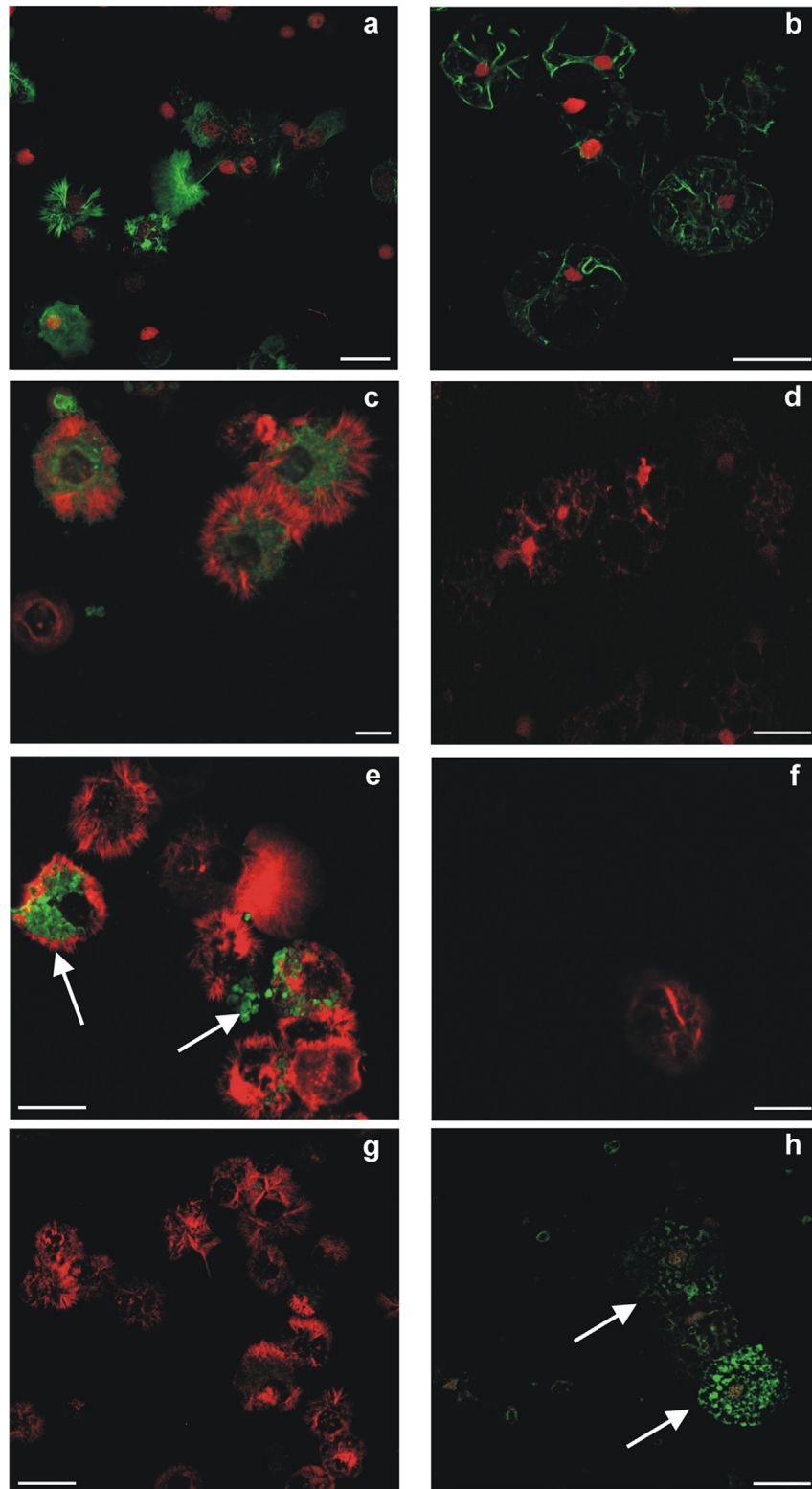
To the best of our knowledge this is the first study that successfully separated earthworm coelomocyte subsets based on cell specific light scattering profiles by a cell sorter for further characterization. We sorted freshly collected coelomocytes into amoebocyte and eleocyte subpopulations and evaluated their purity and cell survival after sorting. The two subpopulations were sorted with high purity (having <1% cross-contamination in both samples), yet in the case of eleocytes release of chloragosomes was evident after sorting of intact eleocytes making the fraction of intact eleocytes low. However, this is a common observation in flow cytometry not specific to cell sorting because chloragosomes can also be detected to the same extent before and after sorting.

Earlier electron microscopical (both SEM and TEM) observations have been attempted for the detailed, ultrastructural characterization of the coelomocytes in different Lumbricidae species (Cooper and Stein, 1981; Linthicum et al., 1977; Valembois et al., 1985). Most of the data was derived from *Eisenia fetida/andrei* species and *Lumbricus terrestris*. According to Valembois et al. (1985) the SEM analysis distinguished small and large leukocytes (amoebocytes) and free-floating chloragocytes (eleocyte) subpopulations in *Eisenia* earthworms while TEM analysis revealed several distinct subtypes. Recent studies of earthworm coelomocytes aimed to match the identified coelomocyte subtypes by electron microscopy with those by light microscopic classifications (Adamowicz, 2005; Kurek et al., 2007). In these reports three main subtypes were suggested such as eleocytes, amoebocytes and granulocytes, or eleocytes, hyaline and granular amoebocytes, respectively. In our earlier flow cytometric analysis (Engelmann et al., 2004, 2005) we were able to resolve three distinct subpopulations that correspond to these aforementioned

subpopulations. In this study, sorted amoebocytes (hyaline and in some cases granular) and eleocytes showed similar morphological features compared to those known from the work of other laboratories (Cooper and Stein, 1981; Kurek et al., 2007; Linthicum et al., 1977; Valembois et al., 1985). In comparison to the earlier studies by others, our approach of combining cell sorting and electron microscopy has proved fruitful in morphology-based phenotyping with confidence. This is because of the technical limitations of electron microscopy. For instance, SEM imaging is well-suited for surface structure analysis but as it lacks intracellular information it is rather difficult to study heterogeneous specimens without prior knowledge. TEM imaging, on the other hand, provides intracellular information usually at the expense for 3D morphological data and thus it is challenging to distinguish the cells without unique intracellular structures. With the application of cell sorting upstream we succeeded in preparation of less heterogeneous (amoebocytes) or highly homogeneous (eleocytes) specimens for both SEM and TEM imaging. The images obtained verified the previous observations and now they can be linked to the light scatter profiles studied in flow cytometry.

Limited number of publication is available about the cytochemical properties (carbohydrates, lipid characteristics) of earthworm coelomocytes (Stein and Cooper, 1978). This report suggests certain amoebocytes (neutrophils, acidophils and granulocytes) of *L. terrestris* were PAS positive and mainly Sudan Black negative, while eleocytes were stained weakly for PAS, but strongly for Sudan Black. Only basophil amoebocytes of *L. terrestris* were variably positive for Sudan Black staining (Stein and Cooper, 1978). Regarding to carbohydrate and lipid characteristics our data is concordant with this previous finding since amoebocytes were predominantly PAS positive, however, eleocytes also exerted PAS positive granules to some extent. Oil Red O droplets were observed exclusively in eleocytes, while there was no reaction in the case of amoebocytes.

More information is available about the enzyme characteristics of earthworm coelomocytes (Engelmann et al., 2004; Hamed et al., 2002; Marks et al., 1981; Stein and Cooper, 1978). All of them agreed that amoebocytes have high acid phosphatase activity in their granules. Acid phosphatase is characteristic marker enzyme for lysosomes and phagolysosomes (Moss et al., 1995). Our AcP data presented in this study is in concert with these previous findings;



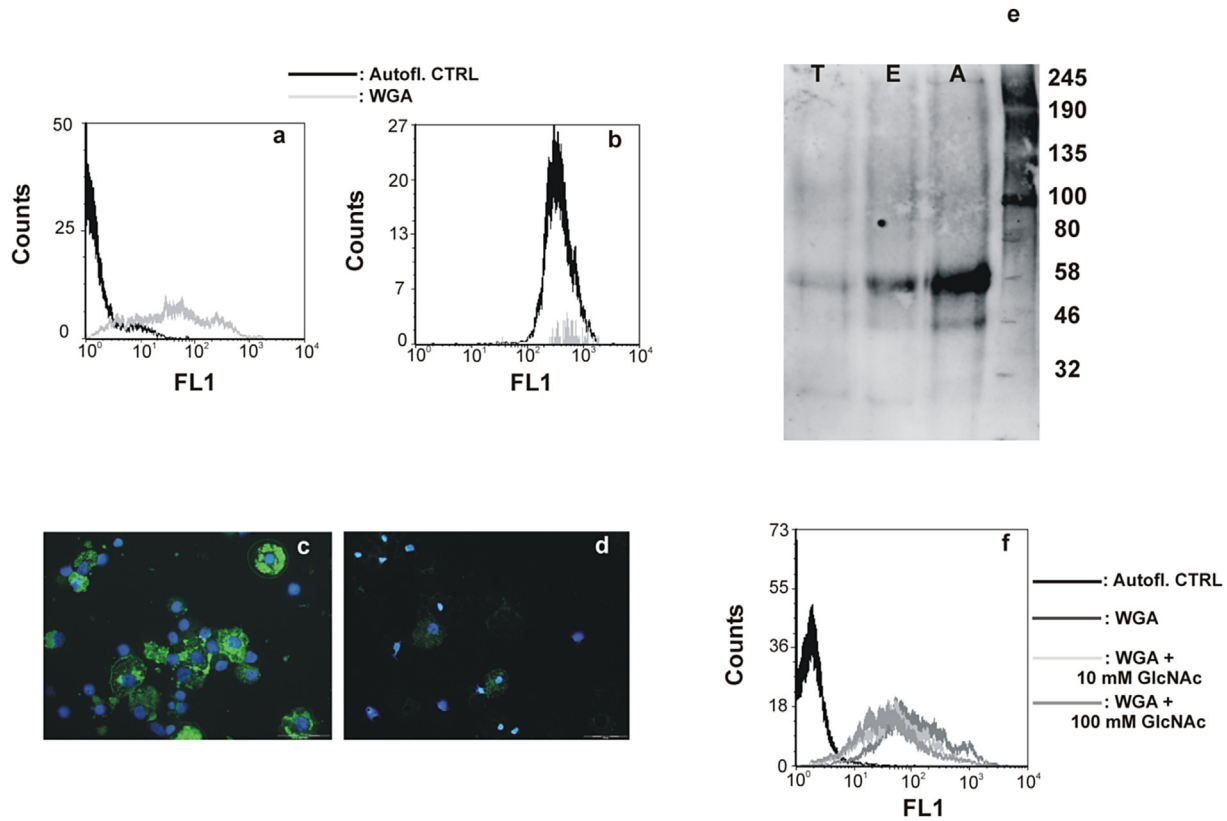
**Fig. 5. Confocal imaging of phalloidin-labeled and anti-EFCC mAb stained coelomocyte subsets.** Sorted amoebocytes (a) and eleocytes (b) were labeled with phalloidin Alexa Fluor 488 conjugate and followed by propidium iodide nuclear counterstaining. For double labeling phalloidin-Alexa Fluor 568 staining followed by FITC-conjugated anti-EFCC3 mAb on sorted amoebocytes (c) and eleocytes (d). Only the amoebocytes (hyaline subgroups) possess positive reactions. Next, sorted amoebocytes (e) and eleocytes (f) fractions were probed with anti-EFCC4 mAb following phalloidin-Alexa Fluor 568 staining. Labeled granular amoebocytes (arrows) can be distinguished from unstained hyaline amoebocytes. In another set up, amoebocytes (g) and eleocytes (h) were stained with the lysenin specific anti-EFCC5-FITC mAb after the incubation with phalloidin-Alexa Fluor 568. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$  (c) and 20  $\mu\text{m}$  (a, b, d-h).

we did not find AcP activity in eleocytes of *Eisenia* as we have reported earlier (Engelmann et al., 2004). In contrast, eleocytes of

**Table 2**  
Characteristics of lectin binding capacity of earthworm coelomocyte subsets.

Lectins	Reaction pattern	
	Amoebocytes	Eleocytes
Phytohemagglutinin (PHA)	++	+/-
<i>A. hypogaea</i> agglutinin (PNA)	+	+/-
Concanavalin A (ConA)	+	+/-
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	+++	+/-
<i>L. culinaris</i> agglutinin (LCA)	+	+/-
<i>U. europeus</i> agglutinin (UEA)	-	+/-
<i>D. biflorus</i> agglutinin (DBA)	-	+/-

since only the sorted amoebocyte subpopulation expressed ALP activity. Until now the existence of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase –by means of cytochemistry– has not yet been reported from earthworm coelomocytes. Indeed, CCO and SDH are ubiquitous enzymes corresponding to the general cellular metabolism of invertebrate immunocytes (Cima et al., 2000). In opposite to our expectations, CCO was only expressed in some amoebocytes, while SDH activity seems to be restricted to eleocytes. In the eleocyte fraction some granules seem to demonstrate the precipitation of DAB chromogen for CCO activity. In this case the possible involvements of other enzymes (e.g. peroxidase, DOPA peroxidase)

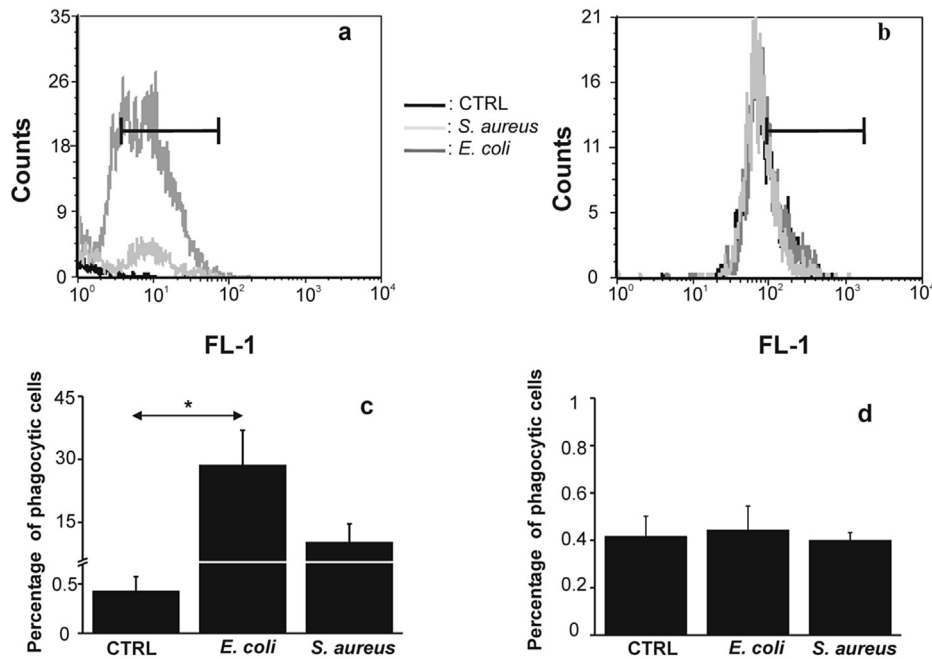


**Fig. 6.** WGA binding patterns of coelomocyte subpopulations. Sorted amoebocytes and eleocytes were subjected to lectin based characterization. Among the tested lectins WGA proved to strongest binding to amoebocytes (a), while this WGA binding was minimal in the case of eleocytes (b) observed by flow cytometry. Lectin (WGA) cytochemistry was performed on the cytopins of sorted amoebocytes (c) and eleocytes (d). DAPI counterstaining, scale bar: 50  $\mu$ m. Glycosylated proteins of unsorted coelomocytes (T-total) and sorted coelomocyte subsets (E-eleocyte, A-amoebocyte) were probed by HRP-conjugated WGA by lectin-blot (e). Specific binding of WGA to the carbohydrates of amoebocytes were proved by the dose dependent inhibition (f) after preincubation with different concentrations of GlcNAc (10 and 100 mM) in a flow cytometry-based assay.

*L. terrestris* possess a weak AcP activity according to a previous report (Stein and Cooper, 1978). Interestingly, sessile chloragocytes of both *Eisenia* and *Lumbricus* were strongly AcP positive (Molnár et al., 2012; Prentø, 1986), but not the free-floating eleocytes of *Eisenia*. This discrepancy could be explained by the different maturation stages represented by sessile chloragocytes and free-floating eleocytes. Indeed, eleocytes are often referred to as end-staged, differentiated chloragocytes released from the chloragogenous tissue. Furthermore species-specific difference might also play a role in the observed AcP activity of *L. terrestris* eleocytes that is not present in eleocytes isolated from *E. andrei*. Alkaline phosphatase is also referred to as another characteristic enzyme of phagocytes that can be localized in the lysosomal or plasma membranes (Cima et al., 2000). ALP activity of earthworm coelomocytes (in basophils) was reported only in one publication (Hamed et al., 2002). Our findings are in concert with this report

of eleocytes cannot be excluded (Fischer, 1978).

Surprisingly, very limited information is available about the characteristics of cytoskeletal microfilaments in earthworm coelomocytes compared to other invertebrate immune cells (Kasschau et al., 2007). According to this report *L. terrestris* coelomocytes form a cortical ring of F-actin at isotonic concentrations (170 mOsm). Filopodium formation only appeared upon hypertonic stress after the disruption of actin cortical ring. The aforementioned publication failed to notice the possible cytoskeletal differences in the distinct coelomocyte subsets. We observed characteristic actin-based cytoskeleton structure variations between amoebocyte and eleocyte subgroups. Amoebocytes have formed typical actin boundaries in the close proximity of plasma membranes, while eleocytes have a random net-like pattern of actin microfilaments mainly determined by the intracellular chloragosomes. Moreover, we co-stained the phalloidin-labeled amoebocytes and eleocytes



**Fig. 7. Phagocytic properties of sorted amoebocytes and eleocytes.** Sorted amoebocytes (a) and eleocytes (b) were incubated with gram+ and gram– bacteria for phagocytosis evaluation. Amoebocytes (a and c) taken up FITC-conjugated *E. coli* and *S. aureus* compared to control samples. In the case of eleocytes (b and d) we could not detect any significant differences to the control eleocytes ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SEM).

with our previously described anti-EFCC3, anti-EFCC4 and anti-EFCC5 mAbs (Engelmann et al., 2005; Oppen et al., 2013) proving their separate lineages.

Lectin staining is also a common approach (if specific monoclonal antibodies are not available) to characterize the phenotype of distinct immune cells. Currently there is no information about systematic lectin-based classification of earthworm coelomocyte subsets. There are certain publications claiming that various lectins bind to coelomocytes, however, those reports paid more attention to the mitogenic effects of lectin binding (Homa et al., 2013). Hereby, to the best of our knowledge we tested methodically first, the engagement of various types of lectins to earthworm coelomocyte subsets. WGA showed the strongest binding to amoebocytes and we proved the specificity of this binding by inhibition assays with enzymatic deglycosylation or pre-treatment with competitive carbohydrates. By means of lectin blotting we detected a major band recognized by WGA in the amoebocyte fraction, however, an identical band can be observed in the eleocyte fraction that is in contrast with the data derived from flow cytometry measurements. One explanation for this discrepancy could be that eleocytes fraction was contaminated with some amoebocytes (at least 1%) during the sorting. Moreover, the blotting technique has a higher sensitivity compared to the flow cytometry detection. In this regard, the lectin binding capacity of amoebocytes is in concert with their strong PAS positivity.

It is known that invertebrate immunocytes with different phenotypes exert diverse immunological functions (Cossarizza et al., 1996; Engelmann et al., 2005). Several reports claimed that earthworm coelomocytes are capable of phagocytosis, cytotoxicity and encapsulation (Cossarizza et al., 1996; Dales and Kalaç, 1992; Engelmann et al., 2005; Stein et al., 1977; Valembois et al., 1992). Amoebocytes are mainly involved in the cellular immune functions. They are able to engulf different foreign particles (e.g. bacteria, fungi, etc.) by phagocytosis or help to remove the injured body parts/tissues. In addition, amoebocytes combat against multicellular intruders, such as nematode parasites through a specialized

type of nodule formation or encapsulation (so called “brown body” development) (Valembois et al., 1992). Free-floating or sessile chloragocytes have multiple roles including trophic, excretory and immunological functions through releasing agglutinating, opsonizing, antimicrobial and cytotoxic factors into the coelomic fluid (Valembois et al., 1985; Oppen et al., 2013). Due to these functional characteristics of coelomocytes as a mixed population it is difficult to observe and evaluate the direct and indirect effects of any *in vitro* treatments targeting solely either amoebocytes or eleocytes. To address this problem a number of separation techniques have been applied to date. Gradient centrifugation using a Percoll enrichment technique is a possible option (Kauschke et al., 2001). Indeed the obtained cell populations are viable and can be applied in different functional assays, however, the cell purity and yield is much lower than those achieved by modern cell sorting with digital cell sorters. We performed phagocytosis assay of the sorted coelomocyte subsets to prove that their viability and functional competence are not biased by the sorting procedure. Indeed, sorted amoebocytes engulfed the FITC-coupled gram-negative/-positive bacteria, in contrast to eleocytes that is in agreement with our previous findings (Engelmann et al., 2005). Valembois et al. (1985) have observed that eleocytes have agglutinated the pathogenic *B. megaterium* at the early stage of interaction among bacteria and earthworm immune cells. It was suggested that some released endogenous opsonins enhance the efficiency of phagocytosis (Dales and Kalaç, 1992). In our previous experiment we observed that the accumulation of nanoparticles (NPs) was enhanced by a corona of endogenous proteins native to the cells. The protein corona was formed of the secretory proteins (in the supernatant) of cultured coelomocytes that show a great similarity to the needle-aspirated coelomic fluid proteins (Hayashi et al., 2013). Major constituent of the protein corona was lysenin, one of the major proteins harbored and secreted by eleocytes evidenced by high anti-EFCC5 positivity (Oppen et al., 2013). Furthermore, we described that lysenin expression is up-regulated upon bacterial exposure (Oppen et al., 2013). Lysenin is likely one important, new factor in opsonization



of foreign structures to enhance their engulfment (Engelmann et al., 2016).

Our paper is the first to report the selective separation of coelomocyte subsets in earthworms using an optical cell sorting approach. This method exploits cell-specific light scatter characteristics inherent to the two subpopulations; amoebocytes and eleocytes. This enables robust and highly reproducible means of physical separation of mixed coelomocyte populations, offering more reliable phenotyping than morphological identification that are rather of subjective nature. In those experiments where amoebocytes and eleocytes should be observed as individual subsets (e.g. Irizar et al., 2015) a cell sorting-based approach would be principal as a starting point. Furthermore, such a method in hand could be applied to greatly improve our understanding of the specific molecular fingerprints of the sorted coelomocyte subpopulations.

**Acknowledgements**

We acknowledge the financial support of Medical School Research Foundation, University of Pécs (PTE-ÁOK-KA 2013/09), the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (BO/00774/14/8, PE), and the Danish Council for Independent Research (4093-00137B, YH). We are grateful for reagent contributions provided by I. Andó (BRC, Szeged, Hungary), B. Kocsis, T. Nagy and B. Polgár (University of Pécs, Hungary). The present scientific contribution is dedicated to the 650<sup>th</sup> anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

**Appendix ASupplementary data**

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.017>.

**References**

Adamowicz, A., 2005. Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes. *Tissue Cell* 37, 125–133.

Bilej, M., Prochazkova, P., Silerova, M., Joskova, R., 2010. Earthworm immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 66–79.

Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G., Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterization. *Fish. Shellfish Immunol.* 10, 677–693.

Cooper, E.L., Kauschke, E., Cossarizza, A., 2002. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *BioEssays* 24, 319–333.

Cooper, E.L., Stein, E.A., 1981. Oligochaeta. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press, San Diego, pp. 75–140.

Cossarizza, A., Cooper, E.L., Suzuki, M.M., Salvioli, S., Capri, M., Gri, G., Quaglino, D., Franceschi, C., 1996. Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react several human epitopes can kill human tumor cell lines. *Exp. Cell Res.* 224, 174–182.

Cueto, J.A., Rodriguez, C., Vega, I.A., Castro-Vazquez, A., 2015. Immune defenses of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): phagocytic hemocytes in the circulation and the kidney. *PLoS One* 10, e0123964.

Dales, R.P., Kalaç, Y., 1992. Phagocytic defense by the earthworm *Eisenia foetida* against certain pathogenic bacteria. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A, 487–490.

Engelmann, P., Molnár, L., Pálincás, L., Cooper, E.L., Németh, P., 2004. Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell Tissue Res.* 316, 391–401.

Engelmann, P., Pálincás, L., Cooper, E.L., Németh, P., 2005. Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 599–614.

Engelmann, P., Hayashi, Y., Bodó, K., Molnár, L., 2016. New aspects of earthworm innate immunity: novel molecules and old proteins with unexpected functions. In: Ballarin, L., Cammarata, M. (Eds.), *Lessons in Immunity: from Single Cell Organisms to Mammals*. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, pp. 53–66.

Fischer, E., 1978. DOPA peroxidase activity in the chloragogen cells of the

earthworm *Lumbricus terrestris*. *Acta Histochem.* 63, 219–223.

Fischer, E., 1993. The myelo-erythroid nature of the chloragogenous-like tissues of the annelids. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A, 449–453.

Fuller-Espie, S.L., Goodfield, L., Hill, K., Grant, K., DeRogatis, N., 2008. Conservation of cytokine-mediated responses in innate immunity: a flow cytometric study investigating the effects of human proinflammatory cytokines on phagocytosis in the earthworm *Eisenia hortensis*. *Inv. Surv. J.* 5, 124–134.

Hamed, S.S., Kauschke, E., Cooper, E.L., 2002. Cytochemical properties of earthworm coelomocytes enriched by Percoll. In: Cooper, E.L., Beschin, A., Bilej, M. (Eds.), *A New Model for Analyzing Antimicrobial Peptides with Biomedical Applications*. IOS Press, Amsterdam Berlin Oxford Tokyo Washington DC, pp. 29–37.

Hayashi, Y., Miclaus, T., Scavenius, C., Kwiatkowska, K., Sobota, A., Engelmann, P., Scott-Fordsmand, J., Enghild, J.J., Sutherland, D.S., 2013. Species differences take shape at nanoparticles: protein-corona made of the native repertoire assists cellular interaction. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14367–14375.

Homa, J., Zorska, A., Wesolowski, D., Chadzinska, M., 2013. Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of *Eisenia andrei*. *J. Comp. Physiol. B* 183, 313–322.

Irizar, A., Rivas, C., Garcia-Velasco, N., Goñi de Cerio, F., Etxebarria, J., Marrigómez, I., Soto, M., 2015. Establishment of toxicity thresholds in subpopulation of coelomocytes (amoebocytes vs. eleocytes) of *Eisenia fetida* exposed in vitro to a variety of metals: implications for biomarker measurements. *Ecotoxicol* 24, 1004–1013.

Jamieson, B.G.M., 1981. Coelomocytes. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.), *The Ultrastructure of the Oligochaete*. Academic Press, New York, pp. 62–95.

Kasschau, M.R., Ngo, T.D., Sperber, L.M., Tran, K.L., 2007. Formation of filopodia in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomocytes in response to osmotic stress. *Zoology* 110, 66–76.

Kauschke, E., Komiya, K., Moro, I., Eue, I., König, S., Cooper, E.L., 2001. Evidence for perforin-like activity associated with earthworm leukocytes. *Zoology* 104, 13–24.

Kurek, A., Homa, J., Kauschke, E., Plytycz, B., 2007. Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *Eur. J. Soil Biol.* 43, S121–S126.

Liebmann, E., 1942. The coelomocytes of Lumbricidae. *J. Morphol.* 71, 221–249.

Linthicum, D.S., Stein, E.A., Marks, D.H., Cooper, E.L., 1977. Electron-microscopic observations of normal coelomocytes from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Cell Tissue Res.* 185, 315–330.

Marks, D.H., Stein, E.A., Cooper, E.L., 1981. Acid phosphatase changes associated with response to foreign tissue in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68A, 681–683.

Molnár, L., Engelmann, P., Somogyi, I., Mácsik, L.L., Pollák, E., 2012. Cold-stress induced formation of calcium and phosphorous rich chloragocytes granules (chloragosomes) in the earthworm. *Eisenia Fetida*. *Comp. Biochem. Physiol.* 163A, 199–209.

Moss, D.W., Raymond, F.D., Wilem, D.B., 1995. Clinical and biological aspects of acid phosphatase. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 32, 431–467.

Nagy, T., Frank, D., Kátai, E., Yahiro, R.K., Poór, V.S., Montskó, G., Zrínyi, Z., Kovács, G.L., Miseta, A., 2013. Lithium induces ER stress and N-glycan modification in galactose-grown Jurkat cells. *PLoS One* 8, e70410.

Opper, B., Bognár, A., Heidt, D., Németh, P., Engelmann, P., 2013. Revising lysenin expression of earthworm coelomocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 214–218.

Prentø, P., 1986. Cellular and intracellular localization of catalase and acid phosphatase in the midgut of *Lumbricus terrestris* L.: a cell fractionation study. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B, 385–390.

Stein, E.A., Avtalion, R.R., Cooper, E.L., 1977. The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. *J. Morphol.* 153, 467–478.

Stein, E.A., Cooper, E.L., 1978. Cytochemical observations of coelomocytes from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Histochem. J.* 10, 657–678.

Tirouvanziam, R., Davidson, C.J., Lipsick, J.S., Herzenberg, L.A., 2004. Fluorescence activated cell sorting (FACS) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2012–2017.

Valembois, P., Lasségues, M., Roch, P., Vaillier, J., 1985. Scanning electron-microscopic study of the involvement of coelomic cell in earthworm antibacterial defense. *Cell Tissue Res.* 240, 479–484.

Valembois, P., Lasségues, M., Roch, P., 1992. Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 95–101.

Varute, A.T., More, N.K., 1972. Are chloragosomes in earthworm chloragogen cells lysosomes? *Acta Histochem.* 44, 144–151.

Vernile, P., Fornelli, F., Bari, G., Spagnuolo, M., Minervini, F., de Lillo, E., Ruggiero, P., 2007. Bioavailability and toxicity of pentachlorophenol in contaminated soil evaluated on coelomocytes of *Eisenia andrei* (Annelida: Lumbricidae). *Toxicol. Vitro* 21, 302–307.

Vetvicka, V., Sima, P., 2009. Origins and functions of annelid immune cells: the concise survey. *Inv. Surv. J.* 6, 138–143.

# LESSONS IN IMMUNITY

From Single-Cell Organisms to Mammals



Edited by  
Loriano Ballarin  
Matteo Cammarata



# Lessons in Immunity: From Single-Cell Organisms to Mammals

---

This page intentionally left blank

# Lessons in Immunity: From Single-Cell Organisms to Mammals

---

*Edited by*

**Loriano Ballarin**

University of Padova, Padova, Italy

**Matteo Cammarata**

University of Palermo, Palermo, Italy



**ELSEVIER**

AMSTERDAM • BOSTON • HEIDELBERG • LONDON  
NEW YORK • OXFORD • PARIS • SAN DIEGO  
SAN FRANCISCO • SINGAPORE • SYDNEY • TOKYO

Academic Press is an imprint of Elsevier



Academic Press is an imprint of Elsevier  
125 London Wall, London EC2Y 5AS, UK  
525 B Street, Suite 1800, San Diego, CA 92101-4495, USA  
50 Hampshire Street, 5th Floor, Cambridge, MA 02139, USA  
The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK

Copyright © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. Details on how to seek permission, further information about the Publisher's permissions policies and our arrangements with organizations such as the Copyright Clearance Center and the Copyright Licensing Agency, can be found at our website: [www.elsevier.com/permissions](http://www.elsevier.com/permissions).

This book and the individual contributions contained in it are protected under copyright by the Publisher (other than as may be noted herein).

### Notices

Knowledge and best practice in this field are constantly changing. As new research and experience broaden our understanding, changes in research methods, professional practices, or medical treatment may become necessary.

Practitioners and researchers must always rely on their own experience and knowledge in evaluating and using any information, methods, compounds, or experiments described herein. In using such information or methods they should be mindful of their own safety and the safety of others, including parties for whom they have a professional responsibility.

To the fullest extent of the law, neither the Publisher nor the authors, contributors, or editors, assume any liability for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions, or ideas contained in the material herein.

The cover image for this book was inspired by the Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology (IADCI) logo.

### British Library Cataloguing-in-Publication Data

A catalogue record for this book is available from the British Library

### Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

A catalog record for this book is available from the Library of Congress

ISBN: 978-0-12-803252-7

For information on all Academic Press publications  
visit our website at <https://www.elsevier.com/>



Working together  
to grow libraries in  
developing countries

[www.elsevier.com](http://www.elsevier.com) • [www.bookaid.org](http://www.bookaid.org)

Typeset by TNQ Books and Journals  
[www.tnq.co.in](http://www.tnq.co.in)

# Contents

List of Contributors	xiii
Preface	xv
<b>1. Ciliate Pheromones: Primordial Self-/Nonself-Recognition Signals</b>	
<i>Adriana Vallesi, Claudio Alimenti and Pierangelo Luporini</i>	
Introduction	1
Pheromone Identification	2
Pheromone Structures	2
Pheromone Activity	8
Pheromone Structure–Function Relationships With Other Signaling Proteins	10
Conclusions	12
References	13
<b>2. Cell Death Pathways in an Unconventional Invertebrate Model</b>	
<i>Enzo Ottaviani and Davide Malagoli</i>	
Introduction	17
Signaling Pathways in Apoptotic Cell Death of the IPLB-LdFB Insect Cell Line	18
Autophagy-Mediated Cell Death in IPLB-LdFB	22
Concluding Remarks	23
References	24
<b>3. Immunotoxicology Approaches in Ecotoxicology: Lessons From Mollusks</b>	
<i>Valerio Matozzo and François Gagné</i>	
Mollusk Hemocytes: Types and Functions	29
Interaction Between Hemocytes and Toxicants: The Immunomarker Approach	32
Mollusk Immunomarkers: The Role of Confounding Factors	41
References	46

**4. New Aspects of Earthworm Innate Immunity:  
Novel Molecules and Old Proteins With  
Unexpected Functions**

*Péter Engelmann, Yuya Hayashi, Kornélia Bodó and László Molnár*

<b>Essentials of Earthworm Immunity: A Concise Introduction</b>	53
Earthworms as a Research Model in Life Sciences	53
Historical Foundation of Earthworm Immunity Research	54
Major Constituents of Earthworm Immune Response	54
<b>“Stars and Stripes” or Pattern Recognition in Earthworms</b>	55
Coelomic Cytolytic Factor: The Unique Earthworm Pattern	
Recognition Receptors	55
Variations on a Theme: Not Just Coelomic Cytolytic Factor Anymore	57
Toll-like Receptors Expression in Nonimmune Tissues	57
<b>Lysenin: A Multitasking Protein in <i>Eisenia</i> Earthworms</b>	57
Cellular Expression of Lysenin	57
Antimicrobial Induction of Lysenin	58
Inhibitors and Possible Regulators of Lysenin-Mediated Cell Lysis	59
<b>Lysenin Meets Nanoparticles: Unexpected Rise of a New Function</b>	59
Lysenin and the Concept of the Biomolecular Corona	59
The High Affinity of Lysenin for Silver Nanoparticles	60
The Unexpected Role of Lysenin in the Accumulation of Nanoparticles	60
<b>Conclusions and Perspectives</b>	62
<b>Acknowledgments</b>	62
<b>References</b>	63

**5. Neuroprotection and Immunity in the Medicinal Leech  
*Hirudo medicinalis*: What About Microglia?**

*Jacopo Vizioli, Francesco Drago and Christophe Lefebvre*

<b>The Medicinal Leech Central Nervous System</b>	67
Microglia as Brain Immune Cells	68
Immune Response Against Pathogens	69
Microglia Recruitment	70
Neuroinflammatory Markers	73
Toward Nerve Repair: Microglia/Neurons Crosstalk	
Into the Spotlight	74
<b>Conclusions</b>	75
<b>References</b>	75

**6. Specificity of Innate Immunity in Bivalves:  
A Lesson From Bacteria**

*Laura Canesi and Carla Pruzzo*

<b>Innate Immunity in Bivalves: Diversity and Complexity</b>	79
Bivalves and Marine Bacteria	80
Immune Recognition	82
Immune Signaling	83
Immune Effectors	85



Specificity of the Immune Response to Pathogenic Vibrios:	
Role of Surface Interactions and Serum-Soluble Components	85
Conclusions	87
References	88
<b>7. Immune-Related Signaling in Mussel and Bivalves</b>	
<i>Paola Venier, Stefania Domeneghetti, Nidhi Sharma, Alberto Pallavicini and Marco Gerdol</i>	
List of Abbreviations	93
Premise	94
Multiple Layers of Biological Signaling	94
Immune Signaling and Related Cell Processes	97
How Small RNAs Can Influence the Immune Host Response	100
Perspectives	100
Acknowledgments	101
References	101
<b>8. Crustacean Immunity: The Modulation of Stress Responses</b>	
<i>Chiara Manfrin, Alberto Pallavicini, Silvia Battistella, Simonetta Lorenzon and Piero G. Giulianini</i>	
Sources of Stress	107
Indicators of Stress	108
Stress Responses Mediated by Neuropeptides	108
Upstream Modulators Triggering CHHs	109
The Crustacean Hyperglycemic Hormone Neuropeptides	111
Perspectives	112
References	112
<b>9. How Insects Combat Infections</b>	
<i>Małgorzata Cytryńska, Iwona Wojda and Teresa Jakubowicz</i>	
Characteristics of Insect Immune Response	117
Antibacterial and Antifungal Response	117
Antiviral Response	120
Specificity of Immune Response, Memory, and Immune Priming	121
<b>Interaction Between Insect Host and Pathogen</b>	122
Getting Into the Insect Body	122
Inside the Hemocoel	123
References	124
<b>10. <i>Aedes aegypti</i> Immune Responses to Dengue Virus</b>	
<i>Cole Schonhofer, Heather Coatsworth, Paola Caicedo, Clara Ocampo and Carl Lowenberger</i>	
Introduction	129
Transmission to Human Hosts: Vectors	130
Dengue Virus in the Vector: Innate Immune Responses	130
Toll Pathway	131

Immune Deficiency Pathway	133
Janus Kinase—Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway	133
RNA Interference	134
Autophagy	135
Apoptosis	135
Interactions Among Pathways	136
Dengue Virus in the Vector: Midgut Microbes	137
Refractory <i>A. aegypti</i>	137
<b>Mitigating Dengue: Control Measures</b>	139
<b>Conclusion</b>	139
<b>References</b>	140
<b>11. Protective Responses in Invertebrates</b>	
<i>Magda de Eguileor, Annalisa Grimaldi and Gianluca Tettamanti</i>	
Background	145
Mediators of Immune Responses	145
Degree of Intercellular Reactive Oxygen Species Levels and Immune Responses	147
Prophenol Oxidase System Activation	147
Cellular Responses	148
Emerging Concepts About New Players Involved in Protective Responses	149
References	153
<b>12. Echinoderm Antimicrobial Peptides: The Ancient Arms of the Deuterostome Innate Immune System</b>	
<i>Vincenzo Arizza and Domenico Schillaci</i>	
Introduction	159
Echinoderm Immunity	160
Antimicrobial Peptides	162
Mode of Action	163
Antimicrobial Peptides in Echinoderms	163
Antimicrobial Biofilm Peptides in Echinoderms	166
Conclusion	170
References	170
<b>13. Inflammatory Response of the Ascidian <i>Ciona intestinalis</i></b>	
<i>Parrinello Nicolò, Cammarata Matteo, Parrinello Daniela and Vizzini Aiti</i>	
Introduction	177
Self/Nonself Recognition	177
Inflammatory Responses	178
Inflammatory Reaction in the Tunic	179
Encapsulation	180

The Pharynx Is Promptly Involved in the Inflammatory Reaction	182
C-Type Lectins	183
Galectins	184
Cytokines	185
Prophenoloxidase	186
Fibril-Associated Collagen With Interrupted Triple Helix-Like Collagen	186
Catabolite Activator Protein	187
<b>Conclusions</b>	187
<b>Acknowledgments</b>	188
<b>References</b>	188
<b>14. Cytotoxic Cells of Compound Ascidians</b>	
<i>Nicola Franchi and Lorian Ballarin</i>	
Introduction	193
Ascidian Circulation	194
Hemocytes of Compound Ascidians	194
Cytotoxic Cells	195
Cytotoxicity	195
Phenoloxidase	196
Allorecognition and Inflammation	196
Immunorecognition and Immunomodulation	197
Future Perspectives: New Roles for Old Cells	198
References	199
<b>15. Fish Transcriptomics</b>	
<i>Francesco Buonocore and Giuseppe Scapigliati</i>	
Introduction	205
Transcriptomics Analysis of Fish Leukocytes	206
Physiological Processes	206
Parasite Response	208
Transcripts in Specific Tissues	209
Bacterial Infection	210
Virus Infection	210
Evolution Biology	210
<b>Conclusion</b>	211
<b>References</b>	212
<b>16. Developmental Biology of Teleost Lymphocytes</b>	
<i>Luigi Abelli</i>	
List of Abbreviations	215
Introduction	215
T Cell Development	218
B Cell Development	220
Perspectives	222
References	222

**17. Cathelicidins: An Ancient Family of Fish Antimicrobial Peptides**

*Marco Scocchi, Michela Furlan, Paola Venier and Alberto Pallavicini*

The Presence of Cathelicidin in Bony Fish Genomes	227
Structure of Cathelicidin Gene and Transcripts	230
Cathelicidin Gene Expression	231
Protein Processing and Expression	232
Biological Activity of the C-Terminal Peptides	232
Conclusions	234
Acknowledgments	235
References	235

**18. Evolution and Immune Function of Fish Lectins**

*Matteo Cammarata, Maria G. Parisi and Gerardo R. Vasta*

Introduction	239
Fish Lectins	240
The Lectin Repertoires in Fish: Genomic, Structural, and Functional Diversity	240
Rhamnose-Binding Lectins	241
Rhamnose-Binding Lectins in Fish: Biochemical and Molecular Features	241
Rhamnose-Binding Lectin—Molecular Structure, Phylogeny, and Evolution	244
Fucose-Binding Lectins	245
Fish FTLs: Biochemical and Molecular Features	245
F-Type Lectins—Phylogeny and Evolution	247
Galectin Structure and Evolution	248
C-Type Lectins	249
Mannose-Binding Lectins in Fish	249
Mannose-Binding Lectin Phylogeny and Evolution	250
Acknowledgments	251
References	251

**19. Teleost Immunoglobulins**

*Maria R. Coscia, Stefano Giacomelli and Umberto Oreste*

List of Abbreviations	257
Introduction	257
Teleost IgM	258
Teleost IgD	262
Teleost IgT	264
Teleost IgL Chain	266
Conclusions	269
References	269

**20. Immunity and Wound Healing: Regeneration or Repair?***Antonella Franchini*

Introduction	275
Injury-Induced Inflammation and Its Regulation	
During Tissue Repair in Diverse Model Organisms	276
Inflammation Is Not All Bad for Repair	279
The Relationship Between Immune System Development and Regenerative Capacity	280
Role of Lymphocytes in Repair Mechanisms	280
Conclusion	281
References	282

**21. Marine Mammal Immunity Toward Environmental Challenges***Annalaura Mancía*

Adaptation of Mammals to the Marine Environment	287
Marine Mammals, Sentinels for the Health of the Ecosystem	287
Immunotoxic Effects of Environmental Challenges	289
Molecular Effects of Environmental Changes on Marine Mammal Immunity	290
References	293

Index	295
-------	-----

This page intentionally left blank

# List of Contributors

- Luigi Abelli** University of Ferrara, Ferrara, Italy
- Vizzini Aiti** University of Palermo, Palermo, Italy
- Claudio Alimenti** University of Camerino, Camerino, Macerata, Italy
- Vincenzo Arizza** University of Palermo, Palermo, Italy
- Loriano Ballarin** University of Padova, Padova, Italy
- Silvia Battistella** University of Trieste, Trieste, Italy
- Kornélia Bodó** University of Pécs, Pécs, Hungary
- Francesco Buonocore** University of Tuscia, Viterbo, Italy
- Paola Caicedo** CIDEIM, Cali, Valle del Cauca, Colombia
- Matteo Cammarata** University of Palermo, Palermo, Italy
- Laura Canesi** University of Genova, Genova, Italy
- Heather Coatsworth** Simon Fraser University, Burnaby, BC, Canada
- Maria R. Coscia** Institute of Protein Biochemistry, National Research Council of Italy, Naples, Italy
- Małgorzata Cytryńska** Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland
- Parrinello Daniela** University of Palermo, Palermo, Italy
- Magda de Eguileor** University of Insubria, Varese, Italy
- Stefania Domeneghetti** University of Padova, Padova, Italy
- Francesco Drago** University of Lille – Science and Technology, Villeneuve D’Ascq, France
- Péter Engelmann** University of Pécs, Pécs, Hungary
- Antonella Franchini** Modena and Reggio Emilia University, Modena, Italy
- Nicola Franchi** University of Padova, Padova, Italy
- Michela Furlan** University of Trieste, Trieste, Italy
- François Gagné** Emerging Methods Section, Aquatic Contaminants Research Division, Environment Canada, Montréal, QC, Canada
- Marco Gerdol** University of Trieste, Trieste, Italy
- Stefano Giacomelli** Institute of Protein Biochemistry, National Research Council of Italy, Naples, Italy
- Piero G. Giulianini** University of Trieste, Trieste, Italy

- Annalisa Grimaldi** University of Insubria, Varese, Italy
- Yuya Hayashi** Aarhus University, Aarhus, Denmark; Karlsruhe  
Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany
- Teresa Jakubowicz** Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland
- Christophe Lefebvre** University of Lille – Science and Technology, Villeneuve  
D’Ascq, France
- Simonetta Lorenzon** OGS (National Institute of Oceanography and Experimental  
Geophysics), Sgonico (TS), Italy
- Carl Lowenberger** Simon Fraser University, Burnaby, BC, Canada
- Pierangelo Luporini** University of Camerino, Camerino, Macerata, Italy
- Davide Malagoli** University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy
- Annalaura Mancia** University of Ferrara, Ferrara, Italy
- Chiara Manfrin** University of Trieste, Trieste, Italy
- Valerio Matozzo** University of Padova, Padova, Italy
- Cammarata Matteo** University of Palermo, Palermo, Italy
- László Molnár** University of Pécs, Pécs, Hungary
- Parrinello Nicolò** University of Palermo, Palermo, Italy
- Clara Ocampo** CIDEIM, Cali, Valle del Cauca, Colombia
- Umberto Oreste** Institute of Protein Biochemistry, National Research Council  
of Italy, Naples, Italy
- Enzo Ottaviani** University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy
- Alberto Pallavicini** University of Trieste, Trieste, Italy
- Maria G. Parisi** University of Palermo, Palermo, Italy
- Carla Pruzzo** University of Genova, Genova, Italy
- Giuseppe Scapigliati** University of Tuscia, Viterbo, Italy
- Domenico Schillaci** University of Palermo, Palermo, Italy
- Cole Schonhofer** Simon Fraser University, Burnaby, BC, Canada
- Marco Scocchi** University of Trieste, Trieste, Italy
- Nidhi Sharma** University of Padova, Padova, Italy
- Gianluca Tettamanti** University of Insubria, Varese, Italy
- Adriana Vallesi** University of Camerino, Camerino, Macerata, Italy
- Gerardo R. Vasta** University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD,  
United States
- Paola Venier** University of Padova, Padova, Italy
- Jacopo Vizioli** University of Lille – Science and Technology,  
Villeneuve D’Ascq, France
- Iwona Wojda** Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland



# Preface

Animals constitute the greatest part of eukaryotic biodiversity, with more than 2 million known species grouped in approximately 35 phyla.

The exploitation of only a limited part of this great variety of species was fundamental for the advancement of immunobiology, starting with the original experiments of Elie Metchnikoff with sea star larvae, which posed the basis for the phagocytosis theory, up to the recent studies on Toll receptors in *Drosophila* by Jules A. Hoffmann, which led to comprehension of the role of Toll-like receptors in innate immunity.

Animals have evolved a wide range of approaches to cope with foreign, potentially pathogenic organisms, and today, the increasing need to extend our knowledge of immune responses requires new, suitable, and simple model organisms for the study of the variety of defense strategies present in metazoans, besides the few species investigated so far. This is of general biological interest and might reveal new adaptive solutions and unknown recognition and effector mechanisms, useful for further progresses in immunology. It also has an applied interest, as a solid knowledge of invertebrate immunity is fundamental for setting up biological methods to control invertebrates, which are vectors of diseases or pests for crops. In addition, a better knowledge of the immune system of farmed species can be of great help in the optimization of the rearing strategies in cattle breeding and aquaculture. Furthermore, focusing on mammals only, as most immunologists do, does not allow for the study of the evolution of immune defense and host–parasites coevolution.

This book stems from the activity of the Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology, born in 1997, which coordinates the activity of many research teams on the common theme of immune responses in *no mouse, no man* models through periodic scientific meetings. We invited part of its members and other international collaborators with consolidated competence in their respective fields to write on specific aspects of their research. The outcome is a series of short chapters (lessons), in the form of overviews, in which a wealth of new and reviewed information, concerning many aspects of immunity in invertebrates and vertebrates, can be found. The aim is to provide scientists and teachers with an easy and updated tool reporting, in an evolutionary perspective, the state of the art in relevant fields of immunobiology.

We thank all the authors and reviewers for their important contributions and their patience with the process that, finally, brought this book to fruition.

**Matteo and Loriano**

This page intentionally left blank

## Chapter 4

# New Aspects of Earthworm Innate Immunity: Novel Molecules and Old Proteins With Unexpected Functions

Péter Engelmann

*University of Pécs, Pécs, Hungary*

Yuya Hayashi

*Aarhus University, Aarhus, Denmark; Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany*

Kornélia Bodó, László Molnár

*University of Pécs, Pécs, Hungary*

## ESSENTIALS OF EARTHWORM IMMUNITY: A CONCISE INTRODUCTION

### Earthworms as a Research Model in Life Sciences

Invertebrates are the major components of marine, freshwater, and terrestrial communities. Some invertebrates such as earthworms (Annelida, Clitellata, Oligochaeta) are frequently referred to as ecosystem engineers for their pivotal role in maintaining ecosystem wellness. Indeed, the mystery of earthworms' key role in soil formation was what excited Charles Darwin most in his late scientific career.<sup>1</sup> Earthworms are found worldwide, their life cycles are short, and they have a wide temperature and moisture tolerance range,<sup>2</sup> which has made them a popular research model in environmental biology. They are also sensitive to environmental contamination,<sup>3–5</sup> and together these factors are favored by researchers and regulators in ecotoxicology. To this end, the two closely related species *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida* have been recommended by the Organisation for Economic Co-operation and Development since 1984 for toxicity testing of chemicals in soil environments.<sup>6</sup> Earthworms are, however, less evident research subjects in other life science areas. For instance, several

studies have attempted to dissect the immune components of earthworms, but the precise molecular data are relatively limited compared to other “classical” invertebrate model organisms such as the *Drosophila* fruit fly or the nematode *Caenorhabditis elegans*.<sup>7,8</sup> In this chapter, we focus on this facet of earthworms, and by reviewing the state of the art, we aim to present the knowledge gap as well as future perspectives in earthworm innate immunity.

## Historical Foundation of Earthworm Immunity Research

Historically, earthworm immunity was established upon the morphological observations and descriptions of the cellular elements harbored in the coelomic cavity (so-called coelomocytes) by Cuénot, Rosa, and Liebmann.<sup>9</sup>

Earthworm immune mechanisms were further evidenced in connection with transplantation experiments. As one of the pioneers in invertebrate immunology, Edwin L. Cooper observed graft rejections when body wall tissues were exchanged as allograft or xenograft in earthworms.<sup>10,11</sup> Interestingly, in the course of graft rejection, mononuclear cells invaded the grafting area indicating the direct involvement of immune cells in this process.<sup>12</sup>

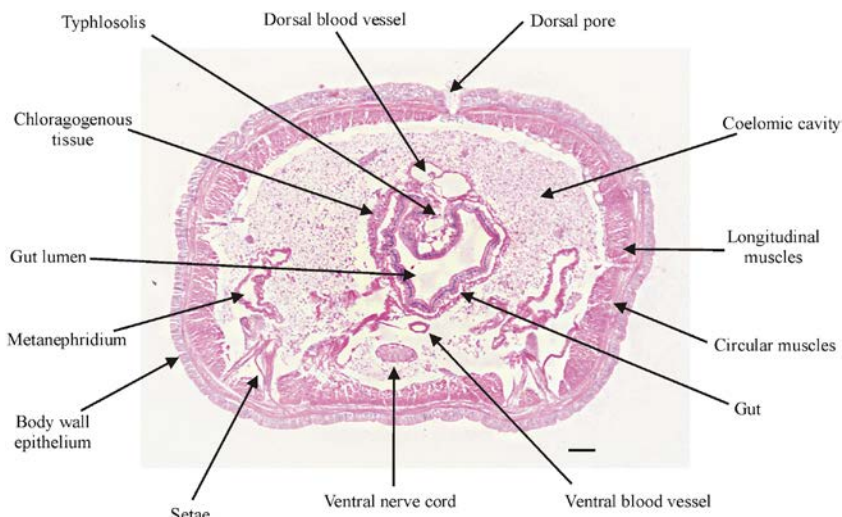
In contrast to other invertebrate models (cnidarians and ascidians) that provided precise data about the molecular recognition involved during tissue rejection,<sup>13,14</sup> the molecular basis of the self/nonself recognition of grafted tissues in earthworms is largely unexplored.

Following the established roots, several research groups have been organized in different locations (France, Germany, Czech Republic).<sup>15–17</sup>

## Major Constituents of Earthworm Immune Response

Earthworm immune components consist of cellular and humoral elements (antimicrobial and pattern recognition molecules)<sup>7,8,18–20</sup> located in the coelomic cavity (Fig. 4.1). Previously, we have characterized the coelomocyte subpopulations (hyaline amoebocytes, granular amoebocytes, and eleocytes) using cytochemical, immunological (applying specific monoclonal antibodies, mAbs), and functional approaches.<sup>21–25</sup> With respect to the functions, hyaline and granular amoebocytes are capable of phagocytosis<sup>26</sup> and encapsulation although granular amoebocytes engulf less foreign particles than hyaline cells do<sup>27</sup> (Fig. 4.2A). Eleocytes show no phagocytic activities,<sup>28</sup> but they undertake metabolic functions as well as the production of bioactive molecules.<sup>29,30</sup> In addition, cellular cytotoxic effects of coelomocytes have been demonstrated in xenogeneic and allogeneic cultures.<sup>31,32</sup>

In parallel to those cellular studies, the humoral counterpart—molecular components of coelomic fluid—have been examined extensively. For example, it is now known that earthworm coelomic fluid possesses a wide range of biological functions in addition to antimicrobial activities,<sup>20</sup> including mitogenic, antioxidative, proteolytic, hemolytic, cytotoxic, and nutritive activities.<sup>8,33,34</sup>



**FIGURE 4.1** Cross section of an *Eisenia andrei* earthworm. Main organs and tissues are marked. Hematoxylin-eosin staining. Note that the coelomic cavity is filled with coelomocytes. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

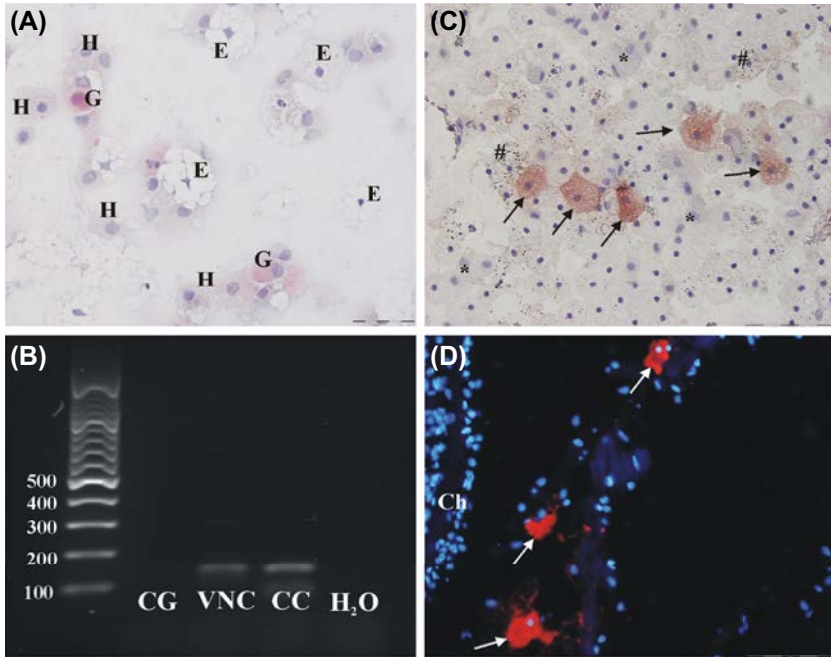
In the following sections, we provide a quick snapshot of the novel findings that have drastically advanced our understanding of cellular and humoral immune functions in earthworms.

## “STARS AND STRIPES” OR PATTERN RECOGNITION IN EARTHWORMS

### Coelomic Cytolytic Factor: The Unique Earthworm Pattern Recognition Receptors

Innate immune response is the first line of active defense against infections. Germ line-encoded receptors are the key elements to initiate the immune response by recognizing conserved molecular motifs from both exogenous and endogenous sources. Pattern recognition receptors (PRRs) can be subdivided into various classes<sup>35</sup>: Toll-like receptors (TLRs), peptidoglycan recognition receptors (PGRPs), nucleotide-binding leucine-rich repeat containing receptors (NLRs), retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs), C-type lectins, and scavenger receptors (SRs).

Until recently, only one unique type of PRR was known from *Eisenia* earthworms, and it has been designated as coelomic cytolytic factor 1 (CCF1).<sup>36</sup> Interestingly, this 42 kDa protein contains lipopolysaccharide, peptidoglycan, and  $\beta$ -1,3-glucan/N,N'-diacetylchitobiose-binding domains. Basically, this means CCF is able to bind a wide range of microbes, including gram-positive and



**FIGURE 4.2** Elements of earthworm immunity: coelomocytes, pattern recognition receptors, and humoral factors. (A) Free-floating coelomocyte subtypes harbored in the coelomic cavity: hyaline amoebocytes (H), granular amoebocytes (G), and eleocytes (E). Hematoxylin-eosin staining, scale bar: 50  $\mu$ m. (B) Toll-like receptor expression is demonstrated (targeting the Toll/interleukin-1 receptor domain) in the neural tissues and coelomocytes of *Eisenia* earthworms by semiquantitative RT-PCR. (To avoid any contamination, sequential isolation steps were performed: first, coelomocytes were isolated. Next the chloragogenous tissue was removed, and then the gut was detached. At last the nerve cord was removed. Between the steps careful washings with a *Lumbricus*-balanced salt solution buffer were performed.) CG, cerebral ganglion; VNC, ventral nerve cord; CC, coelomocytes. (C) Lysenin expression is restricted mainly to eleocytes (arrows) among free-floating coelomocytes, while some eleocytes are negative (number signs). Hyaline amoebocytes are consistently negative (asterisks). Immunocytochemical staining is performed by lysenin specific a-EFCC5 monoclonal antibody. Hematoxylin counterstaining, scale bar: 100  $\mu$ m. (D) Sessile chloragocytes (Ch) are negative for lysenin demonstrated by immunofluorescence staining on the earthworm cross section. Only free-floating coelomocytes (arrows) were labeled with the polyclonal antilysenin antibody. DAPI counterstaining, scale bar: 200  $\mu$ m.

gram-negative bacteria and yeast.<sup>36</sup> Homologues of CCF have been described for other earthworm species such as *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus rubellus*, and *Dendrobaena veneta* with certain differences in the domain structures compared to *Eisenia* sp. that could be explained by the different ecology of this species.<sup>37</sup> It has been postulated that CCF initiates the prophenoloxidase cascade; however, this effector mechanism seems to be not so efficient in earthworms compared to other invertebrates (eg, arthropods).<sup>38,39</sup>

## Variations on a Theme: Not Just Coelomic Cytolytic Factor Anymore

In contrast to other invertebrate models, TLRs were described relatively belatedly in annelids.<sup>40</sup> The first evidence of the presence of TLRs in annelids was derived during the genome analysis of *Capitella* polychaeta and *Helobdella* hirudean species.<sup>41</sup> In addition, neural regeneration experiments revealed the expression of TLR (and NLR) in leeches.<sup>42</sup> Finally, diverse coding sequences of TLRs were cloned from the coelomocytes of *E. andrei*.<sup>43</sup> Protein prediction analysis has presumed that this earthworm TLR contains seven extracellular leucine-rich repeats. Bacterial challenge modulated the level of TLR transcripts; however, it was only significant in the case of the *Bacillus subtilis* treatment.<sup>43</sup> Besides this information, the exact ligand specificity of these TLRs is not yet known.

Meanwhile, genome amplification experiments of *D. veneta* revealed several homologous sequences that proved the conservation of TLRs among various earthworm species.<sup>44</sup>

### Toll-like Receptors Expression in Nonimmune Tissues

It is known that the expression of TLRs (and other PRRs) is not restricted to the hematopoietic tissues, but it is present in the central nervous system (CNS) as well.<sup>45</sup> Similar trends can be observed in invertebrates, as we mentioned earlier (TLR molecules are present in leech CNS).<sup>42</sup> In fact, several different organs express TLRs in earthworms,<sup>43</sup> but whether these molecules are located in extracellular and/or intracellular membranes remains unanswered. Our initial results correspond to the TLR expression in the coelomocytes of *E. andrei* (Fig. 4.2B). Additionally, we confirmed Toll/interleukin-1 receptor (TIR) transcript expression in the peripheral nerve cord but not in the cerebral ganglion. This result complements those findings in leech that also demonstrated PRR expression in nonimmune tissues.<sup>46</sup>

Another interesting question relates to the task of TLRs. The function of this ectopic TLR is still a matter to be investigated. This book is dedicated entirely to the evolution of immunity; yet we should not forget that Toll was initially described as a dorsoventral body plan determining factor involved in fruit fly development.<sup>47</sup> Until now, very limited information has been available for the evolutionary conservation of Toll in this developmental process.<sup>48</sup>

## LYSENIN: A MULTITASKING PROTEIN IN *EISENIA* EARTHWORMS

### Cellular Expression of Lysenin

Earthworm coelomic fluid is rich in bioactive molecules; however, its exact nature and full spectrum is still only partly understood. One major constituent of the coelomic fluid is a sphingomyelin (and phosphocholine)-binding

protein family<sup>49</sup> consisting of lysenin, lysenin-related proteins, and fetidin. They are known to have cytotoxic, hemolytic, and smooth muscle contraction activities.<sup>51</sup> Initially, lysenin was described as a smooth muscle contraction protein from coelomic fluid. Following studies revealed that lysenin mediates (temperature-dependent) hemolysis, and it strongly targets erythrocytes of sheep rather than those of humans or rats. Its cytotoxicity was reported for insect hemocytes, vertebrate fibroblasts, and tumor cells but not against *Lumbricus* coelomocytes or molluscan hemocytes.<sup>50</sup> An interesting remark is, however, that the presence of sphingomyelin is limited to vertebrate taxa, and all those sphingomyelin-targeted activities of lysenin demand further explanations in an ecophysiological context in earthworms. An *in situ* hybridization study showed that its expression was restricted to the central chloragocytes (chloragocytes located in the typhlosolis, as opposed to peripheral chloragocytes facing to the coelomic cavity).<sup>51</sup> In contrast, our immunohistochemical analysis (applying in-house-raised a-lysenin mAb designated as a-EFCC5) revealed that subgroups of free-floating coelomocytes (in particular the eleocytes) were lysenin-expressing cells (Fig. 4.2C).<sup>52</sup> Central chloragocytes located in the typhlosolis were consistently negative in our experiments when we applied our mAb or the commercially available a-lysenin polyclonal antibody (Fig. 4.2D). To resolve this discrepancy, one could hypothesize that the expression of lysenin mRNA in the central chloragocytes exists only during their maturation, and the mature, free-floating chloragocytes (eleocytes) undertake its transcription. Indeed, this is an option to consider, however, there is no experimental evidence to prove this idea. Moreover, the exact origin of eleocytes was debated.<sup>9</sup> Some literature claims that eleocytes are free-floating chloragocytes derived from the sessile chloragogenous tissue<sup>53</sup>; yet this hypothesis needs to be supported by robust experimental observations.<sup>54</sup>

## Antimicrobial Induction of Lysenin

In parallel to lysenin, another bioactive protein harbored in the coelomic fluid was described and named fetidin.<sup>55</sup> Although it was thought to be a new molecule, it turned out that this molecule shared strong molecular homology with lysenin. Now it is considered that in earthworms, lysenin belongs to a multiprotein family with at least four members sharing molecular homology.<sup>56</sup> Little is known about lysenin's antimicrobial activity, but the bacterial challenge of the coelomocytes seems to trigger the expression of lysenin. Interestingly, gram-positive bacteria exposure evoked increased lysenin expression in coelomocytes, while exposure to gram-negative bacteria attenuated the level of lysenin expression.<sup>53</sup> In support of our observation of the latter, a mass spectrometry-based proteomic study revealed that the expression of lysenin was also suppressed *in vivo* upon *Escherichia coli* challenge.<sup>57</sup> Furthermore, when different culture (soil) conditions were applied to earthworms, there was a fluctuation in the transcriptional profile of lysenin suggesting that lysenin is a stress-induced factor.<sup>4</sup>



## **Inhibitors and Possible Regulators of Lysenin-Mediated Cell Lysis**

Screening of natural products has uncovered candidates for possible inhibitors of lysenin oligomerization and lysenin-evoked cell lysis.<sup>58</sup> Among 1580 samples a plant- and a microorganism-derived compound retain the potential inhibition of lysenin's action. Interestingly enough, it is not known what type of inhibitory molecules exist in the earthworms themselves to rescue self-structures from unintended pore formation by lysenin. Indeed, the lack of sphingomyelin in the membranes would explain this issue. Yet, earthworms are equipped with inhibitors of pore-forming molecules (eg, eiseniapore) in general.<sup>59</sup> Amoebapores and perforin are among the functional homologues of lysenin. Perforin is a well-known lytic protein secreted by NK-cells and cytotoxic T-lymphocytes.<sup>60</sup> Indeed, effector immune cells should be rescued from self-damage after releasing the cytotoxic content of their cytoplasmic granules. Now, it is known that lysosomal proteases are anchored to the membrane of the effector immune cells, and these proteases, namely cathepsins, are able to diminish the self-destruction effect of the secreted perforin.<sup>60</sup> Cathepsins are a conserved group of proteases described in many species. Cathepsin B is the most typical member of this extensive molecular family involved in this process; however, other cathepsins also participate in the immune response (eg, intracellular antigen processing). Cathepsin L from the leech *Theromyzon tessulatum* is involved in the phagocytic response,<sup>61</sup> and homologues with a similar role probably exist in other annelids including earthworms. However, whether any of the postulated cathepsins have a regulatory role in the inhibition of the lysenin-mediated cytotoxic process is only a hypothesis that should be experimentally proven.

## **LYSENIN MEETS NANOPARTICLES: UNEXPECTED RISE OF A NEW FUNCTION**

### **Lysenin and the Concept of the Biomolecular Corona**

It was a great surprise when the multitasking protein lysenin revealed yet another role in immunity toward nanoparticles. This relatively new finding was first uncovered by a simple experiment in which nanosized particles of silver were incubated with secretory proteins from *E. fetida*.<sup>62</sup> The study sought a unique interaction of earthworm proteins with nanoparticles, for we knew that an array of different types of biomolecules (mainly proteins) binds to a nanoparticle spontaneously forming a biomolecule–nanoparticle complex or a “biomolecular corona.” The theory and experimental evidence of biomolecular coronas around nanoparticles have been an active area of bionanoscience research and are well documented elsewhere.<sup>63</sup> Although those observations were limited to mammalian proteins (mostly human plasma/serum proteins and fetal bovine serum (FBS) proteins), the universal tendency seems to be preferential binding of lipoproteins and immunological proteins such as opsonins (immunoglobulins and complement proteins), coagulation proteins, and acute-phase proteins.<sup>64</sup>

Much less known, however, is how proteins from invertebrate organisms behave when they meet nanoparticles. The proteomes that nanoparticles encounter can differ in many aspects from the spatiotemporal profile of the animal's physiology to species differences in the protein repertoire. To examine the latter in this context using earthworms, we focused on the immune-competent fluid in which immunocytes reside and circulate: the coelomic fluid in comparison to FBS.<sup>62</sup>

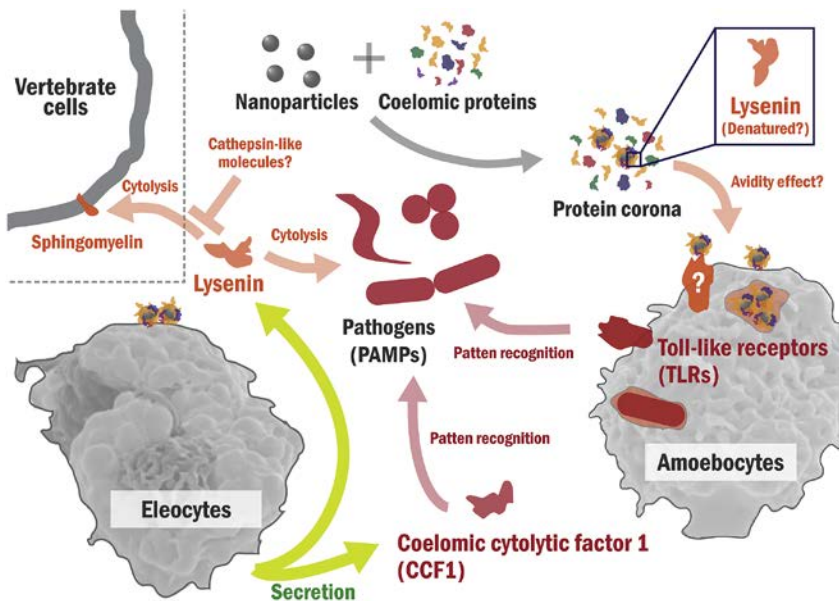
## The High Affinity of Lysenin for Silver Nanoparticles

Two methods were examined for the harvesting of coelomic fluid proteins, and we concluded that secreted proteins from a primary culture of *E. fetida* coelomocytes were favored for our experimental purposes and reproducibility rather than the conventional method of needle-aspiration of the coelomic fluid.<sup>62</sup> In both cases, lysenin was one of the two major constituents of the coelomic fluid proteins, as anticipated from the relative abundance of lysenin-producing eleocytes among the coelomocyte subpopulations.<sup>52</sup> More striking is the selective enrichment of lysenin at silver nanoparticles following incubation of the nanoparticles in the secretory proteins from the coelomocytes.<sup>62</sup> The strong binding of lysenin was surprisingly explicit since it was only the family of lysenin and a few minor proteins that were “fished” by silver nanoparticles leaving the other major proteins behind. In general, abundant proteins are frequently found in the nanoparticle's coronas as they have higher chances to encounter the nanoparticle surface than minor proteins do. The classical theory of the Vroman effect<sup>65</sup> can be readily applied here, by which sequential replacement of bound proteins occurs according to the relative abundance and the affinity for the surface. To test the high affinity of lysenin, we incubated the nanoparticles in a biased mixture of secretory coelomic proteins (low abundance) and FBS (high abundance) and observed a gradual accumulation of lysenin over time, likely displacing the early arriving proteins such as serum albumin.<sup>62</sup> The implication is that lysenin is not adsorbing to silver nanoparticles purely by its relative abundance but rather by a specific parameter, which makes it favorable to adsorb. Currently, we do not know the mechanism behind this selective binding, as lysenin's crystal structure (RCSB Protein Data Bank ID: 3ZXD)<sup>49</sup> does not provide any clues on particular sites of potential silver-specific association (eg, via cysteine-rich pockets). We do, however, speculate that the unique hydrophobicity profile of lysenin (eg, alternate hydrophilic/hydrophobic residue sequence<sup>49</sup>) may allow the local enrichment of the protein at silver nanoparticles.

## The Unexpected Role of Lysenin in the Accumulation of Nanoparticles

As mentioned earlier, earthworms have acquired an ability to opsonize microbial particles by means of the extracellular receptor protein CCF, of which two motifs encompass a versatile pattern recognition repertoire.<sup>7</sup> The production of melanin downstream of the CCF-triggered phenoloxidase cascade has

been considered responsible for the subsequent phagocytosis of the opsonized particles.<sup>7</sup> Surprisingly, upon incubation of synthetic particles in the coelomic fluid, CCF was also deposited onto the particle surface in a manner that was recognizable by CCF-specific monoclonal antibodies (ie, CCF was adsorbed without a significant loss of its native conformation).<sup>66</sup> This adhesion capability of CCF was an early (and to our knowledge, only) example of pattern recognition-independent opsonization of nonbiological particles. Using secretory proteins from coelomocytes (which were comparable to needle-aspirated coelomic fluid proteins), we preformed coronas of the coelomic proteins (or recombinant lysenin) on silver nanoparticles and showed that coelomocytes accumulated those nanoparticles significantly more than when the coronas were preformed of FBS.<sup>62</sup> Notably, when recombinant lysenin was used in place of the coelomic proteins, the accumulation was even greater in eleocytes in comparison to amoebocyte populations (capable of phagocytosis).<sup>62</sup> In our previous transmission electron microscopic study, similar-sized silver nanoparticles were clearly visible in the intracellular compartments of amoebocytic cells but not in eleocytes, suggesting the importance of phagocytic activities over receptor-mediated endocytosis.<sup>67</sup> Although the precise mechanism remains unclear, it seems likely that lysenin is involved in opsonization-induced cellular interactions of silver nanoparticles and that the related mechanism may not be the same between amoebocytes and eleocytes (Fig. 4.3). The local enrichment of lysenin



**FIGURE 4.3** A schematic illustrating the novel and known pattern recognition strategies involved in earthworm immunity toward environmental pathogens and foreign materials (nanoparticles). Headings with question marks represent the mechanisms that are less understood in the course of immune response in earthworms.

at silver nanoparticles would certainly facilitate the presentation of repetitive motifs (or avidity effect<sup>68</sup>) that may possibly be detected by known or unidentified pattern recognition machinery of the coelomocytes. Interestingly, our latest study revealed a negative feedback cycle of *lysenin* expression and time-lagged induction of the *TLR* in the coelomocytes exposed to a low-cytotoxic concentration of silver nanoparticles.<sup>69</sup> As yet, we do not know whether there is a biological link between the two phenomena or if the contrasting regulation of the two genes is simply an independent response. Given that lysenin is a pore-forming protein that works in an oligomerization state,<sup>67</sup> it may be interesting to study whether it could act as a “find-me/eat-me” signal to guide scavenger cells for immediate phagocytic clearance. Lysin is an old molecule into which many researchers have long dug in search of novel medicine, but its original role in earthworm immunity is much less understood. This unexpected finding of lysenin’s role toward nanoparticles begins to illuminate its unexplored facet in immunity.

## CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Undoubtedly, these new discoveries have given a tremendous boost to earthworm immunity research. Although rapidly emerging, the available molecular data are as yet scarce. For instance, the aforementioned novel findings related to Toll would certainly advance the research of earthworm immunity to discover Toll ligands and mediators of intracellular signaling following Toll receptor/ligand engagements. Moreover, TLRs are just one characteristic group of PRRs, and we should keep in mind that the other PRRs (eg, PGRPs, NLRs, RLRs, and SRs) are also conserved in the course of evolution. They can be considered as potential but undiscovered candidates involved in earthworm immunity against extracellular and intracellular pathogens. Last, the unexpected observation of lysenin’s strong interaction with silver nanoparticles and subsequent cellular association has driven us to rethink its original role in earthworm immunity. The emergence of new earthworm PRRs would also offer intriguing insights into how nanoparticles are detected via ligand–receptor interactions. The unique and conserved recognition strategies reviewed here have certainly opened up new research avenues and potentially harbor an intriguing clue for better elucidating the vertebrate immune response toward various antigens.

## ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the financial support of the Medical Faculty Research Foundation, University of Pécs (PTE-ÁOK-KA 34039/10-06 and 2013/09), the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences, and the Danish Council for Independent Research. The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary. We also thank the helpful comments of the anonymous reviewer to improve our work.

**REFERENCES**

1. Darwin CR. In: Murray J, editor. *The formation of vegetable mould, through the action of worms*. 1883. London.
2. Dominguez J. State-of-the-art and new perspectives on vermicomposting research. In: Edwards CA, editor. *Earthworm ecology*. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 401–24.
3. Spurgeon DJ, Hopkin SP. Tolerance to zinc in populations of the earthworms *Lumbricus rubellus* from uncontaminated and metal-contaminated ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999;**37**:332–7.
4. Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C, Vieau D, Lemière S, Leprêtre A, et al. Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. *Environ Sci Technol* 2006;**40**:2844–50.
5. Ricketts HJ, Morgan AJ, Spurgeon DJ, Kille P. Measurement of annetocin gene expression: a new reproductive biomarker in earthworm ecotoxicology. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;**57**: 4–10.
6. OECD. *OECD guideline for testing chemicals. Section 2: effects on biotic systems. Method, 207. Earthworm, acute toxicity tests*. Paris (France). 1984.
7. Bilej M, Procházková P, Silerová M, Josková R. Earthworm immunity. *Adv Exp Med Biol* 2010;**708**:66–79.
8. Cooper EL, Kauschke E, Cossarizza A. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays* 2002;**24**:319–33.
9. Liebmann E. The coelomocytes of Lumbricidae. *J Morphol* 1942;**71**:221–49.
10. Cooper EL. Transplantation immunity in annelids-I. Rejection of xenografts exchanged between *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida*. *Transplantation* 1968;**6**:322–37.
11. Cooper EL. Chronic allograft rejection in *Lumbricus terrestris*. *J Exp Zool* 1969;**171**:69–73.
12. Cooper EL, Roch P. Earthworm leukocyte interactions during early stages of graft rejection. *J Exp Zool* 1984;**232**:67–72.
13. Voskoboinik A, Newman AM, Corey DM, Sahoo D, Pushkarev D, Neff NF, et al. Identification of a colonial chordate histocompatibility gene. *Science* 2013;**341**:384–7.
14. Rosengarten RD, Nicotra ML. Model systems of invertebrate allorecognition. *Curr Biol* 2011;**21**:82–92.
15. Roch P, Valembois P. Evidence for concanavalin A-receptors and their redistribution on lumbricid leukocytes. *Dev Comp Immunol* 1978;**2**:51–63.
16. Mohrig W, Kauschke E, Ehlers M. Rosette formation of the coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. with sheep erythrocytes. *Dev Comp Immunol* 1984;**8**:471–6.
17. Tucková L, Rejnek J, Síma P, Ondřejová R. Lytic activities in coelomic fluid of *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris*. *Dev Comp Immunol* 1986;**10**:181–9.
18. Jarosz J, Gliński Z. Earthworm immune responses. *Folia Biol (Krakow)* 1997;**45**:1–9.
19. Cooper EL. Earthworm immunity. *Prog Mol Subcell Biol* 1996;**15**:10–45.
20. Bilej M, De Baetselier P, Beschin A. Antimicrobial defense of the earthworm. *Folia Microbiol (Praha)* 2000;**45**:283–300.
21. Engelmann P, Molnár L, Pálinkás L, Cooper EL, Németh P. Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell Tissue Res* 2004;**316**:391–401.
22. Engelmann P, Pálinkás L, Cooper EL, Németh P. Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Dev Comp Immunol* 2005;**29**:599–614.
23. Opper B, Németh P, Engelmann P. Calcium is required for coelomocyte activation in earthworms. *Mol Immunol* 2010;**47**:2047–56.

24. Engelmann P, Cooper EL, Opper B, Németh P. Earthworm innate immune system. In: Karaca A, editor. *Biology of earthworms*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2011. p. 229–45.
25. Engelmann P, Cooper EL, Németh P. Anticipating innate immunity without a Toll. *Mol Immunol* 2005;**42**:931–42.
26. Fuller-Espie SL. Using flow cytometry to measure phagocytic uptake in earthworms. *J Microbiol Biol Educ* 2010;**11**:144–51.
27. Cooper EL, Stein EA. Oligochaeta. In: Ratcliffe NA, Rowley AF, editors. *Invertebrate blood cells*. San Diego: Academic Press; 1981. p. 75–140.
28. Stein E, Avtalion RR, Cooper EL. The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. *J Morphol* 1977;**153**:467–77.
29. Valembois P, Roch P, Lasségués M, Cassand P. Antibacterial activity of the haemolytic system from the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *J Invertebr Pathol* 1982;**40**:21–7.
30. Çotuk A, Dales RP. Lysozyme activity in the coelomic fluid and coelomocytes of the earthworm *Eisenia foetida* Sav., in relation to bacterial infection. *Comp Biochem Physiol* 1984;**78A**:469–74.
31. Cossarizza A, Cooper EL, Suzuki MM, Salvioli S, Capri M, Gri G, et al. Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines. *Exp Cell Res* 1996;**224**:174–82.
32. Suzuki MM, Cooper EL. Allogeneic killing by earthworm effector cells. *Nat Immun* 1995;**14**:11–9.
33. Hrzenjak T, Hrzenjak M, Kasuba V, Efenberger-Marinculić P, Levanat S. A new source of biologically active compounds—earthworm tissue (*Eisenia foetida*, *Lumbricus rubellus*). *Comp Biochem Physiol* 1992;**102A**:441–7.
34. Kauschke E, Mohrig W, Cooper EL. Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms. *Eur J Soil Biol* 2007;**43**:110–5.
35. Bryant CE, Monie TP. Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity. *Open Biol* 2012;**2**:120015.
36. Beschin A, Bilej M, Hanssens F, Raymakers J, Van Dyck E, Drevets H, et al. Identification and cloning of a glucan- and LPS-binding protein from *Eisenia fetida* earthworms involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J Biol Chem* 1998;**273**:24948–54.
37. Silerová M, Procházková P, Josková R, Josens G, Beschin A, De Baetselier P, et al. Comparative study of the CCF-like pattern recognition protein in different Lumbricid species. *Dev Comp Immunol* 2006;**30**:765–71.
38. Procházková P, Silerová M, Stijlemans B, Dieu M, Halada P, Josková R, et al. Evidence for proteins involved in prophenoloxidase cascade *Eisenia fetida* earthworms. *J Comp Physiol B* 2006;**176**:581–7.
39. Beschin A, Bilej M, Brys L, Torreele E, Lucas R, Magez S, et al. Convergent evolution of cytokines. *Nature* 1999;**400**:627–8.
40. Cooper EL, Kvell K, Engelmann P, Nemeth P. Still waiting for the toll? *Immunol Lett* 2006;**104**:18–28.
41. Davidson CR, Best NM, Francis JW, Cooper EL, Wood TC. Toll-like receptor genes (TLRs) from *Capitella capitata* and *Helobdella robusta* (Annelida). *Dev Comp Immunol* 2008;**32**:608–12.
42. Cuvillier-Hot V, Boidin-Wichlacz C, Slomianny C, Salzet M, Tasiemski A. Characterization and immune function of two intracellular sensors, HmTLR1 and HmNLR, in the injured CNS of an invertebrate. *Dev Comp Immunol* 2011;**35**:214–26.
43. Škanta F, Roubalová R, Dvořák J, Procházková P, Bilej M. Molecular cloning and expression of TLR in the *Eisenia andrei* earthworm. *Dev Comp Immunol* 2013;**41**:694–702.

44. Fjøsne TF, Stenseth EB, Myromslien F, Rudi K. Gene expression of TLR homologues identified by genome-wide screening of the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Innate Immun* 2015;**21**:161–6.
45. Kielian T. Overview of toll-like receptors in the CNS. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;**336**:1–14.
46. Schikorski D, Cuvillier-Hot V, Boidin-Wichlacz C, Slomianny C, Salzet M, Tasiemski A. Deciphering the immune function and regulation by a TLR of the cytokine EMAPII in the lesioned central nervous system using a leech model. *J Immunol* 2009;**183**:7119–28.
47. Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985;**42**:791–8.
48. Imler JL, Zheng L. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *J Leukoc Biol* 2004;**75**:18–26.
49. De Colibus L, Sonnen Andreas FP, Morris Keith J, Siebert CA, Abrusci P, Plitzko J, et al. Structures of lysenin reveal a shared evolutionary origin for pore-forming proteins and its mode of sphingomyelin recognition. *Structure* 2012;**20**:1498–507.
50. Kobayashi H, Ohta N, Umeda M. Biology of lysenin, a protein in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Int Rev Cytol* 2004;**236**:45–99.
51. Ohta N, Shioda S, Sekizawa Y, Nakai Y, Kobayashi H. Sites of expression of mRNA for lysenin, a protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Cell Tissue Res* 2000;**302**:263–70.
52. Opper B, Bognár A, Heidt D, Németh P, Engelmann P. Revising lysenin expression of earthworm coelomocytes. *Dev Comp Immunol* 2013;**39**:214–8.
53. Jamieson BGM. Chloragocytes. In: Jamieson BGM, editor. *The ultrastructure of the oligochaete*. New York: Academic Press; 1981. p. 96–118.
54. Homa J, Bzowska M, Klimek M, Plytycz B. Flow cytometric quantification of proliferating coelomocytes non-invasively retrieved from the earthworm, *Dendrobaena veneta*. *Dev Comp Immunol* 2008;**32**:9–14.
55. Lassegues M, Milochau A, Doignon F, Du Pasquier L, Valembois P. Sequence and expression of an *Eisenia fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40-kDa fetidin antibacterial protein. *Eur J Biochem* 1997;**246**:756–62.
56. Bruhn H, Winkelmann J, Andersen C, Andrä J, Leippe M. Dissection of the mechanisms of cytolytic and antibacterial activity of lysenin, a defence protein of the annelid *Eisenia fetida*. *Dev Comp Immunol* 2006;**30**:597–606.
57. Wang X, Chang L, Sun Z, Zhang Y. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the earthworm *Eisenia fetida* during *Escherichia coli* O157:H7 stress. *J Proteome Res* 2010;**9**:6547–60.
58. Sukumwang N, Umezawa K. Earthworm-derived pore-forming toxin lysenin and screening of its inhibitors. *Toxins* 2013;**5**:1392–401.
59. Lange S, Kauschke E, Mohrig W, Cooper EL. Biochemical characteristics of Eiseniapore, a pore-forming protein in the coelomic fluid of earthworms. *Eur J Biochem* 1999;**262**:547–56.
60. Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 2002;**196**:493–503.
61. Lefebvre C, Vandenbulcke F, Bocquet B, Tasiemski A, Desmons A, Verstraete M, et al. Cathepsin L and cystatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum*. *Dev Comp Immunol* 2008;**32**:795–807.
62. Hayashi Y, Miclaus T, Scavenius C, Kwiatkowska K, Sobota A, Engelmann P, et al. Species differences take shape at nanoparticles: protein corona made of the native repertoire assists cellular interaction. *Environ Sci Technol* 2013;**47**:14367–75.

63. Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nano* 2012;**7**:779–86.
64. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nano* 2013;**8**:772–81.
65. Vroman L, Adams A, Fischer G, Munoz P. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood* 1980;**55**:156–9.
66. Bilej M, Brys L, Beschin A, Lucas R, Vercauteren E, Hanušová R, et al. Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* earthworms. *Immunol Lett* 1995;**45**:123–8.
67. Hayashi Y, Engelmann P, Foldbjerg R, Szabó M, Somogyi I, Pollák E, et al. Earthworms and humans in vitro: characterizing evolutionarily conserved stress and immune responses to silver nanoparticles. *Environ Sci Technol* 2012;**46**:4166–73.
68. Shemetov AA, Nabiev I, Sukhanova A. Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles. *ACS Nano* 2012;**6**:4585–602.
69. Hayashi Y, Miclaus T, Engelmann P, Autrup H, Sutherland DS, Scott-Fordsmand JS. Nanosilver pathophysiology in earthworms: transcriptional profiling of secretory proteins and the implication for the protein corona. *Nanotoxicology* 2015:1–9 (Epub ahead of print).



# LESSONS IN IMMUNITY

From Single-Cell Organisms to Mammals

Edited by

Loriano Ballarin and Matteo Cammarata

***Lessons in Immunity: From Single-Cell Organisms to Mammals***

stems from the activity of the Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology (IADCI), represented by the editors. This book is presented as a series of short overviews that report on the current state of various relevant fields of immunobiology from an evolutionary perspective. The overviews are written by authors directly involved in the research, and most are members of the IADCI or have otherwise been involved in the related research for their respective overview. This publication offers scientists and teachers an easy and updated reference tool.

**Key Features:**

- Provides simple and updated reviews on the immunobiology of a wide spectrum of organisms, considered in an evolutionary context.
- Focuses on both cells and humoral components of a variety of nonclassical model organisms.
- Offers the possibility to have in a single volume, many contributions which can help to understand the evolution of immune responses and the main adaptations in animal phyla.
- Presents a very valuable holistic cross-sectional approach in the teaching of immunology and its applications.



**ACADEMIC PRESS**

An imprint of Elsevier  
elsevier.com

ISBN 978-0-12-803252-7



9 780128 032527

## SHORT COMMUNICATION

**Distinct immune- and defense-related molecular fingerprints in separated coelomocyte subsets of *Eisenia andrei* earthworms****K Bodó<sup>1</sup>, D Ernszt<sup>2</sup>, P Németh<sup>1</sup>, P Engelmann<sup>1,\*</sup>**<sup>1</sup>*Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Medical School, University of Pécs*<sup>2</sup>*Department of Physiology, Medical School, University of Pécs*

Accepted September 4, 2018

**Abstract**

During phylogenesis different types of immunocytes such as amoebocytes and eleocytes have developed in earthworms to defend the host against microbial pathogens.

Previously we applied a cell sorting-based approach to untangle the morphological and functional properties of these aforementioned coelomocyte subsets. In order to compare their constitutive gene expression patterns, cell-sorting was performed and followed by semiquantitative RT-PCR in the distinct, separated coelomocyte subpopulations of unmanipulated *Eisenia andrei* earthworms. We targeted a variety of genes with diverse functions ranging from pattern recognition through intracellular signaling to oxidative stress.

Several immune-related genes (*CCF*, *TLR*, *lumbricin*, *LuRP*, *MyD88*) were only manifested in the amoebocytes. In contrast, other immune response genes (*lysozyme*, *lysenin*), lysosomal hydrolases (*cathepsin L* and *cathepsin C*) and *cystatin B* were expressed in both subpopulations. In addition, cell signaling molecules (*MyD88*, *PKC1*) and oxidative stress-related genes (*Cu/ZnSOD*, *MnSOD*) were mainly observed in amoebocytes, while other stress-related genes (*Cd-metallothionein*, *catalase*) were apparent in both subsets.

We conclude that these characteristic differences of the molecular signatures manifest in the functional heterogeneity of distinct coelomocyte subtypes.

**Key Words:** *Eisenia andrei*, coelomocytes, cell sorting, gene expression, immune response, oxidative stress**Introduction**

Evolutionary conserved immune mechanisms are reported from diverse invertebrate organisms (Loker *et al.*, 2004). A surprising complexity and close cooperation between cellular and humoral immune components can be observed in several invertebrate models including earthworms (Cooper *et al.*, 2002; Cooper and Roch 2003; Bilej *et al.*, 2010; Engelmann *et al.*, 2016b). Earthworm coelomocytes are divided into amoebocyte and eleocyte subpopulations. Similarly to other invertebrate immunocytes, these cells are derived from the mesoderm (eleocytes are considered to be originated from the gut surface-located, liver equivalent chloragogenous tissue), and possess various functions during the immune response (Engelmann *et al.*, 2005). In this regard,

amoebocytes are mainly involved in the phagocytosis and encapsulation (Fuller-Espie, 2010), while eleocytes have no phagocytic properties, but they produce a handful of bioactive molecules (Stein *et al.*, 1977; Valembois *et al.*, 1985).

Recently we applied a cell-sorting-based approach to separate these distinct coelomocyte subsets upon their light-scatter properties (from the perspective of physical parameters; size and granularity). After separation we characterized their differences in morphological, cytochemical, functional and lectin-binding properties (Engelmann *et al.*, 2016a).

In the last two decades several immune proteins have been identified in earthworms; however, little is known about their differential gene expression in the coelomocyte subgroups (Bilej *et al.*, 2010; Engelmann *et al.*, 2016b).

Aware of the phenotypic and functional differences in the coelomocyte subsets, we aimed to analyze the distinct expression patterns of several immune and stress-related target genes in the separated amoebocytes and eleocytes.

*Corresponding author:*

Péter Engelmann  
Department of Immunology and Biotechnology  
Clinical Center, Medical School, University of Pécs  
Pécs, H-7643, Szigeti u. 12, Hungary  
E-mail: engelmann.peter@pte.hu

**Table 1** List of primers were applied for semi-quantitative RT-PCR experiments

Target Gene	Gene Bank accession #	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Amplicon size (bp)
<i>TLR</i>	JX898685	ATT GTG TCA AAC GCC TTC GC GTC GGC GAT CTC TTC CAA CA	123
<i>CCF</i>	AF030028	CAT TAA GCC GAC GTT GCT GG CGT CCT GTA GCA TCC GTT GT	145
<i>LBP/BPI</i>	JQ407018	GGT TCG ACC TCC GAC GAT AC GGT CAA CAG GGC GTC CAT TA	107
<i>Lysozyme</i>	DQ339138	GTC GCA TGG ATG TCG GAT CT GCG AGC AGT CCA TCT GAG TT	120
<i>Lumbricin</i>	KX816866	ACT CGG AAC GCA AGA ACC AA GGT TCT GCG TGA CCT CCT TC	139
<i>LuRP</i>	KX816867	GGT CGA GAG AAT CAA CCC AAC TA CTT GTG AGC GAT GTC GGC TA	133
<i>Lysenin</i>	D85846	TGA TCC ACA CTG GTG CTT CC CAG GTG CCA AGG AGA AGA AG	117
<i>MyD88</i>	EH670202	TGC GAG TAC AGG CTC GTT AAC CGT GCA GAT GTG GTT TAG GA	100
<i>MEKK 1</i>	EH672240	CAA GGA ACG ATC CCA TTC AT GTA TCA TGG TGC AAC CAA CG	147
<i>PKC1</i>	DQ286716	TTT TAT GCG GCC GAA GTC A GTC GGC GAT TTT GCA GTG A	120
<i>Mt</i>	AJ236886	CTT GTT GCT GCA CAA ACT GC TTT CCA CAT TTG CCC TTC TC	129
<i>Catalase</i>	DQ286713	TAC AAA CTG GTG AAC GCC GA AAA GGT CAC GGG TCG CAT AG	139
<i>Cu/ZnSOD</i>	KR106132	TGC CAA GTT TGA AGT GAC GG TTT GCC AAG ATC GTC CAC CA	103
<i>MnSOD</i>	KU057379	CCG AAG AAA AGC TGG CTG AA TGT CCT CCG CCG TTG AAT	91
<i>Cystatin B</i>	BP524680	TGG AGG GGA TGC TTT GCA TT ACG CAG ACA AGG TAC GAA GA	123
<i>Cathepsin B</i>	HO001247	TCC TGC CTT TCC AGA TTC ATT T GAA CCA CAG GAG CCC TGA TC	90
<i>Cathepsin C</i>	GR228740	CGG CTA CTT CCG CAT CGT T AGC GCC TGC TCA GAA GGA	120
<i>Cathepsin L</i>	EY892565	CAA CGG CTG TTT CCT ATC CAA GAA AAC ACA CGA TGC AAT GCA	110
<i>COI</i>	HQ534065	GGA TTT GGA AAC TGA CTT C TCG TTC TAG TCG AAG CCC AC	312
<i>18S</i>	AY365460	ATT AAG CCA TGC ATG TCT AAG CAC CTT TGT GGC ATG TAT TAG CTC CAG	135
<i>RPL17</i>	BB998250	GCA GAA TTC AAG GGA CTG GA CTC CTT CTC GGA CAG GAT GA	159
<i>β-actin</i>	JQ038870	ATG TGG ATC AGC AAG CAG GAG TA ATC GCC GAG ATC GGA ATC TT	90

<sup>a</sup>Upper and lower sequences represent forward and reverse primers

## Materials and methods

### Earthworm husbandry

Adult *Eisenia andrei* earthworms were maintained in breeding stocks at standard conditions (Molnár *et al.*, 2012). Prior to coelomocyte harvesting, earthworms were placed onto moist tissue paper allowing defecation to avoid contamination during coelomocyte collections.

### Coelomocyte harvesting

Coelomocytes were isolated as we described earlier (Engelmann *et al.*, 2004) and enumerated by 0.14% trypan-blue dye-based exclusion.

### Cell sorting and flow cytometry

Collected coelomocytes were resuspended in *Lumbricus* balanced salt solution (LBSS) (Engelmann *et al.*, 2005) supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS, Biowest, Nuaille, France) and 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Hungary) to prevent cell aggregation. Coelomocytes were sorted according to their basic forward and side scatter (FSC/SSC) characteristics reflecting their cell size and granularity, respectively. Sorting procedure was performed by a FACSAria III (BD Biosciences) cell sorter as we described earlier (Engelmann *et al.*, 2016a). The efficacy of sorting and the coelomocyte viability was controlled by 7-amino-actinomycin D (7-AAD) using a FACSCalibur flow cytometer.

### Hematoxylin-eosin staining

Sorted coelomocyte subsets (80  $\mu$ l of  $5 \times 10^5$ /ml) were spread onto glass slides using Cytospin 3 (SHANDON, ThermoScientific, Waltham, MA, USA) apparatus. Hematoxylin-eosin staining was employed following standard protocols.

### RNA isolation, cDNA synthesis and semiquantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from unseparated coelomocyte, sorted amoebocyte and eleocyte samples using NucleoSpin® RNA isolation kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. The quality and quantity of RNA samples were measured by NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoScientific). Following DNase I digestion (Sigma-Aldrich) the reverse transcription reaction was performed by Hi-Capacity Reverse Transcription Kit applying random hexamers (ThermoScientific). DNase I-treated total RNA was reverse transcribed and subsequently used in the PCR reactions. Gene specific primers were designed based on the available sequences from NCBI GenBank Database and their major characteristics are detailed in Table 1.

The following PCR conditions were applied: an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 54 °C for 30 s, and elongation at 72 °C

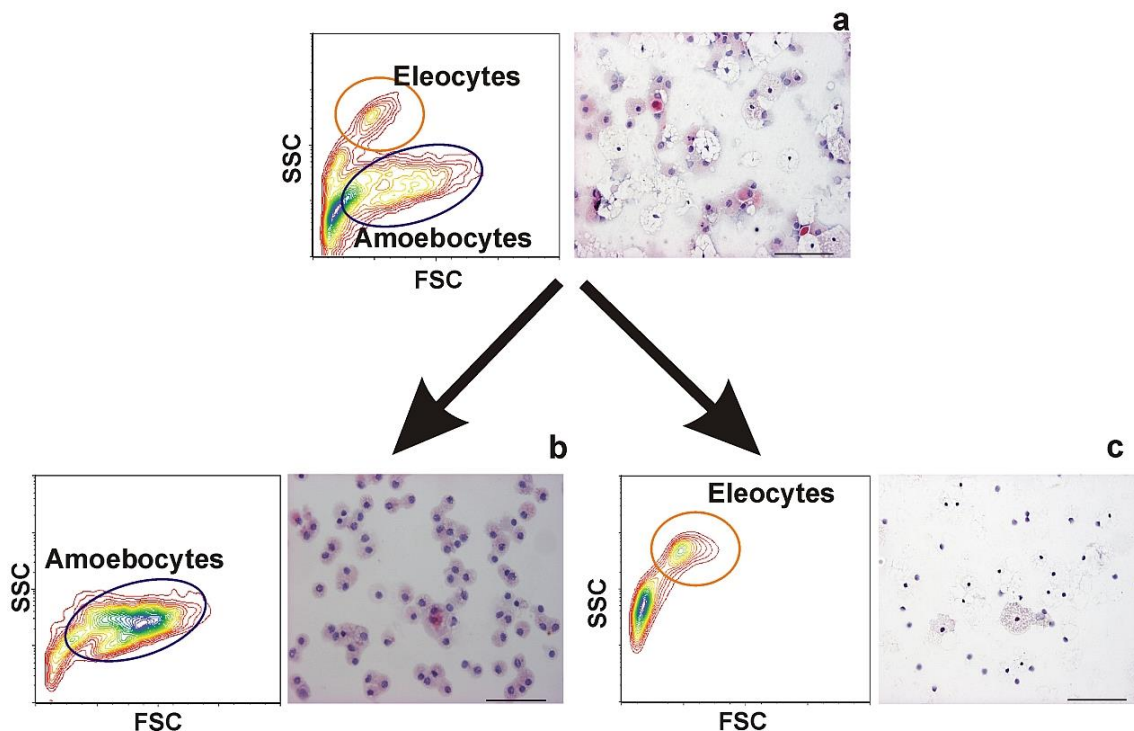
for 30 s. Amplification cycles were terminated by a final extension at 72 °C at 10 min. Finally, PCR mixtures were analyzed on 1% (w/v) agarose gel, and PCR products were visualized by GelRed (Biotium, Inc., Fremont, CA, USA) dye. Gel pictures were photographed by GelDoc XR system (BioRad, Hercules, CA, USA).

### Results and Discussion

#### *Pattern recognition receptors (PRRs) are attributed to separated amoebocytes*

To analyze the distinct gene expression patterns we separated the coelomocyte subpopulations based on their physical manifestation (size and granularity) (Fig. 1a). Post-sort cell viability measurements (7-AAD staining) indicated a high survival rate (82-85%) for sorted amoebocytes, while we were not able to evaluate the ratio of alive/dead eleocyte due to their high autofluorescence.

Hematoxylin and eosin staining was performed to check the efficacy of the sorting process. Majority of the sorted population was composed by hyaline amoebocytes (Fig. 1b), whereas a small percentage of granular amoebocytes appeared as well. Separated eleocytes (Fig. 1c) were easily perceptible by their small nucleus and the cytoplasm filled with chloragosomes.



**Fig. 1** Pre- and post-sorting analyses of coelomocyte subsets and cytochemical properties of sorted populations. Total coelomocyte population (a) was separated to amoebocyte (b) and eleocyte (c) subpopulations upon their physical manifestations. Post-sort analyses demonstrated that amoebocytes were mainly undamaged; however, eleocytes showed a certain fragility evidenced by the increased amount of debris. Hematoxylin-eosin staining revealed mixed total coelomocytes prior to sorting while homogenous amoebocytes (b) and eleocyte subpopulations (c) can be observed following the separation. Scale bars: 100  $\mu$ m. Representative dot-plots are presented from three independent experiments.

Innate immunity operates with a panel of PRRs to discriminate between non-self and self structures. Recently, some unique and evolutionary conserved PRR molecules have been identified in *E. andrei* earthworms (Bilej *et al.*, 2010; Engelmann *et al.*, 2016b). First, we investigated the expression of pattern recognition receptor (PRR) genes including *coelomic cytolytic factor (CCF)*, *toll-like receptor (TLR)*, and *LPS-binding protein/bacterial permeability-increasing protein (LBP/BPI)*. CCF is an unique LPS, peptidoglycan and  $\beta$ -1,3-glucan/N,N'-diacetylchitobiose-binding protein that is expressed at higher level in the chloragogenous tissue and lower level in large coelomocytes (Beschlin *et al.*, 1998). In the case of coelomocyte subsets, we found that CCF was only expressed in separated amoebocyte subpopulation, but it was not present in sorted eleocytes (Fig. 2a).

First evidence of annelid TLRs was emerged from the analyses of polychaete and hirudean species (Davidson *et al.*, 2008; Cuviller-Hot *et al.*, 2011). Shortly, the coding sequence of TLR was identified in *E. andrei* (*EaTLR*). *EaTLR* expression level was relatively low in coelomocytes (Škanta *et al.*, 2013) and -according to our observation- only occurred in amoebocytes (Fig. 2a), however its presence is not restricted exclusively to immunocompetent tissues (Škanta *et al.*, 2013; Engelmann *et al.*, 2016b). Further genomic investigations have shown the high diversity of TLRs in annelid earthworms (Fjøsne *et al.*, 2015).

Recently, a homologue of evolutionarily conserved LBP/BPI molecule was isolated from *E. andrei*. The highest expression level of *EaLBP/BPI* was observed in coelomocytes, seminal vesicles, while the lowest level appeared in the intestine (Škanta *et al.*, 2016). We observed that *LBP/BPI* expression only occurred in amoebocytes, but not in eleocytes (Fig. 2a).

These findings confirmed the notion that molecular recognition of pathogens is dedicated mainly to the amoebocyte subpopulation. In comparison to the earlier functional studies (Valembos *et al.*, 1985; Valembos and Lasséques, 1995), our results support the concept that amoebocyte subpopulation is priorly involved in the pathogen-triggered phagocytic response.

#### *Distinct antimicrobial molecular fingerprints of coelomocyte subsets*

Nowadays, antimicrobial proteins (AMPs) are recognized as the first line of defense against microbial pathogens (Boman, 1991; Zasloff, 2002).

Lysozyme is a highly conserved AMP present in many different organisms ranging from plants to human. Previous investigations have revealed that *E. andrei* lysozyme represents strong sequence similarity with other invertebrate lysozymes (Josková *et al.*, 2009). Furthermore its expression is increased in coelomocytes upon Gram-positive and Gram-negative bacteria exposure. We found that both separated coelomocyte subpopulation expressed this AMP, however we observed a more augmented lysozyme expression in separated amoebocytes compared to eleocytes (Fig. 2b).

Lumbricin is a distinctive earthworm AMP that was initially isolated from *Lumbricus rubellus*. So far

several additional lumbricin homologues have been described from other annelid species (Cho *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003; Schikorski *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). Its expression was observed in several tissues, but not in coelomocytes (Li *et al.*, 2011). Recently, we have identified the coding sequence of lumbricin and its novel-related peptide (LuRP) in *E. andrei*. Lumbricin and LuRP show close relationship with other lumbricin homologues (Bodó *et al.*, 2019). Additionally, we observed that *lumbricin* and *LuRP* exert ubiquitous expression in several earthworm tissues (including coelomocytes), but their highest expression was evidenced in the foregut. Among other tissues *Lumbricin* and *LuRP* expression was the lowest in coelomocytes. As for their distribution in the subpopulations we observed that only amoebocyte subpopulation turned out to be weakly positive, but eleocytes were negative for these genes (Fig. 2b).

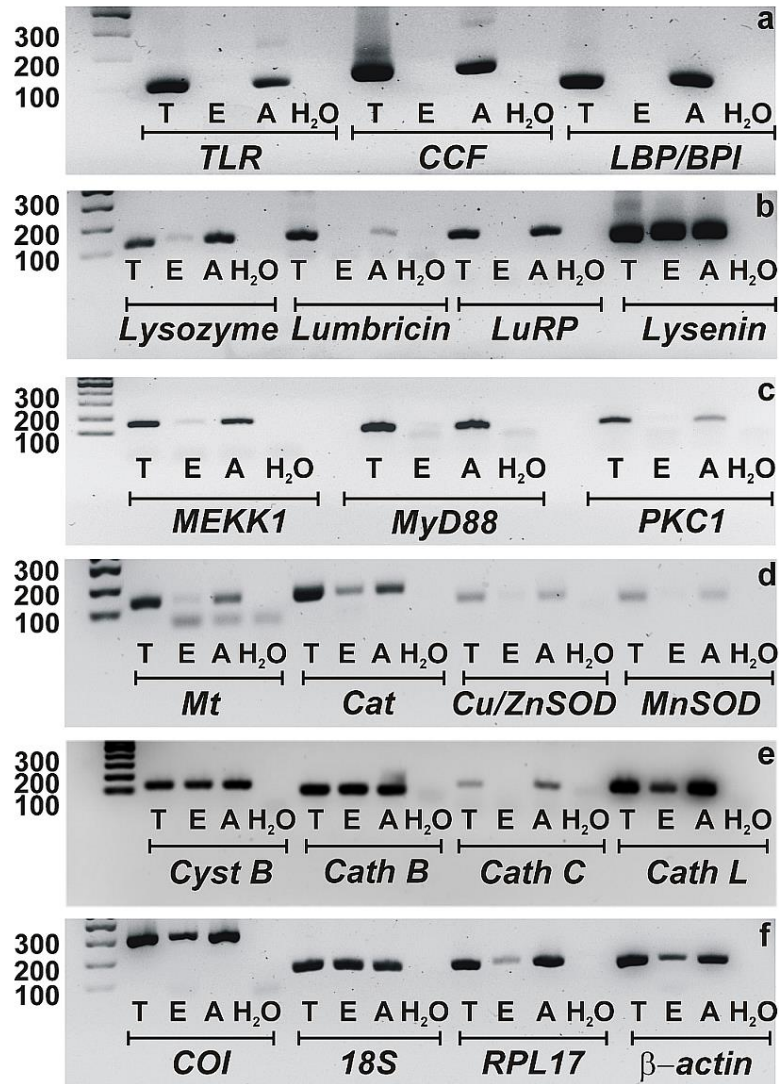
A species-specific bioactive molecule lysenin has been described from *Eisenia* earthworms. Lysenin protein family consists of sphingomyelin- (and phosphocholine)-binding molecules, and possess diverse biological activities (cytotoxicity, antimicrobial activity, and opsonization) (Engelmann *et al.*, 2016a). Our immunohistochemical analysis showed that mostly eleocytes were the lysenin expressing cells (Opper *et al.*, 2013), in contrast to previous observations where chloragocytes were suggested as the major players in lysenin production (Ohta *et al.*, 2000). *Lysenin* expression was manifested in both subpopulations (Fig. 2b) that is concordant with our previous flow cytometry-based observations (Opper *et al.*, 2013).

#### *Conserved signaling molecules in coelomocyte subsets*

Our knowledge is very limited concerning on the intracellular signaling in earthworm immunity (Engelmann *et al.*, 2011). We gained recent knowledge of different signaling pathways and we tested their expression pattern in the separated coelomocyte subsets. Certain signaling pathways such as MAPK cascade are fundamental and evolutionarily conserved; since several publications are available from various organisms (Sakaguchi *et al.*, 2004; Ragab *et al.*, 2011). Hayashi *et al.*, 2012 observed down-regulation of *MEKK1* level in silver nanoparticle (AgNP)-exposed *Eisenia* coelomocytes. We measured that *MEKK1* expression is present in the isolated amoebocytes, besides we found a very weak signal in the eleocyte population (Fig. 2c).

Innate immunity is largely dependent on the engagement of TLRs. Following PAMP recognition intracellular molecular events are initiated by the cytosolic components of TLR signaling pathway, one such is the MyD88. Hayashi *et al.*, 2012 have observed a delayed induction of *MyD88* gene in coelomocytes upon AgNP exposure. *MyD88* was only expressed in the amoebocyte subpopulation that is relevant with the amoebocyte-restricted TLR expression (Fig. 2c).

Protein kinase C (PKC) has fundamental functions in cellular homeostasis, and its role is well implicated in the immune response (Larsen *et al.*, 2002). Earthworm *PKC1* and *PKC2* were recently



**Fig. 2** Expression patterns of (a) pattern recognition receptors; PRRs, (b) antimicrobial peptides AMP, (c) signaling pathway genes, (d) metal-, oxidative stress-induced molecules, (e) hydrolytic proteases, and (f) housekeeping genes in coelomocytes of *Eisenia andrei*. (a) *TLR*, *CCF*, and *LBP/BPI*; (b) *Lysozyme*, *Lumbricin*, *LuRP* and *Lyseinin*; (c) *MEKK 1*, *MyD88*, and *PKC1*; (d) *Mt*, *Cat*, *Cu/ZnSOD* and *MnSOD*; (e) *Cyst B*, *Cath B*, *Cath C*, and *Cath L*; (f) *COI*, *18S*, *RPL17* and  $\beta$ -*actin*. Total coelomocytes (T), and separated eleocytes (E) and amoebocytes (A), with H<sub>2</sub>O as PCR negative control. Representative images are presented from three independent experiments.

partially cloned (Brulle *et al.*, 2006). Homa *et al.*, (2013) found that a phorbol ester (PMA), a potent activator of PKC caused the proliferation of earthworm coelomocytes. Interestingly, in the course of *in vitro* PMA administration we observed that PKC is not involved in the Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of coelomocytes (Opper *et al.*, 2010; Engelmann *et al.*, 2011). Among coelomocyte subgroups only the separated amoebocytes evidenced the expression of *PKC* (Fig. 2c). In fact, the amoebocyte subpopulation has a crucial role in the pathogen recognition, and in the downstream inflammatory response evidenced by the selective expression of signal transduction molecules and antimicrobial factors.

#### *Expression of oxidative, metal stress genes in separated coelomocyte subsets*

In addition to immune response-related genes, we examined the expression patterns of other defense-related genes involved in metal- and oxidative stress. Metallothioneins (Mt) are intensively studied metal-sequestering proteins and ubiquitously expressed in a wide variety of organisms including earthworms (Calisi *et al.*, 2014; Kowald *et al.*, 2016). In recent years, earthworms are frequently applied as a sentinel organism to evaluate metal contaminations in soil (Calisi *et al.*, 2014). Homa *et al.*, (2005) previously described that *E. fetida* coelomocytes are able to accumulate various metal ions. Earlier results demonstrated that

*Mt* expression is mostly attributed to chloragocytes (Morgan *et al.*, 2004); however we found that *Mt* manifestation occurred in both separated amoebocyte and eleocyte (free-floating chloragocyte) subpopulations. In contrast to the previous data we observed weak signal in eleocytes, while amoebocytes had a stronger *Mt* expression (Fig. 2d).

All living organisms possess a diversity of antioxidant defense mechanisms (Wang *et al.*, 2015). Catalase (Cat) is one conserved key enzyme of oxidative stress, and it exists in many different cell types including earthworm coelomocytes (Brulle *et al.*, 2006). *Cat* expression was observed in both sorted coelomocyte subpopulations (Fig. 2d). Amoebocytes are involved in the early immune response against pathogens, but probably both subpopulations participate in maintaining the normal cellular homeostasis.

Another oxidative stress-related enzyme, Cu/Zn-SOD has been recently cloned and characterized in *E. fetida* (Xiong *et al.*, 2012). The predicted amino acid sequence was excavated that genetic distance of Cu/Zn-SOD in *E. fetida* was far from other invertebrate SOD molecules. Indeed, it showed strong sequence similarity with homologue sequences from *Tubifex tubifex* and *L. rubellus* (Xiong *et al.*, 2012). In addition, the sequence of MnSOD has been recently assessed in *E. andrei* (Roubalová *et al.*, 2018). Interestingly, its role in innate immune responses now has been elucidated (Wang *et al.*, 2015). In contrast to *Mt* and *Cat* expression Cu/Zn-SOD and MnSOD were only manifested in separated amoebocyte subpopulation (Fig. 2d). Indeed, following the phagocytosis the intracellular “killing” in amoebocytes is mediated by the free reactive oxygen (and nitrogen) species that needs to be terminated by certain antioxidative enzymes (e.g. Cat, SOD).

#### *Hydrolytic endopeptidases and their inhibitor are present in coelomocyte subsets*

Cathepsins (Cath) are ubiquitous lysosomal proteases involved in many aspects of the cell life cycle. Cath B, Cath L and Cath C have been identified in several invertebrate organisms. Undoubtedly, Cath B is one of the most typical member of this molecular family that takes essential part in the immune response against bacterial infections (Balaji *et al.*, 2002). Cath B is involved in the regulation of apoptosis, and this lysosomal protease is implicated to be involved in the immune mechanisms of the echinoderm, *Apostichopus japonicus* (Chen *et al.*, 2016). Cath L is also identified in several invertebrates including the leech *Theromyzon tessulatum*. Cath L was involved in the phagocytic responses of leeches (Lefebvre *et al.*, 2008).

Cystatin B (Cyst B) is an endogenous cathepsin inhibitor, which localization was observed in the cytosol, mitochondria and nucleus (Kopitar-Jerala, 2015). Previously, cystatin B gene was described in the leech *T. tessulatum*, and upregulated after bacterial challenge (Lefebvre *et al.*, 2004). Interestingly, leech coelomocytes possess a differential expression of cathepsin L (in chloragocytes and amoebocytes) and cystatin B

(only in chloragocytes) (Lefebvre *et al.*, 2008). According to our results all of the observed cathepsins (Cath B, C and L) were present in the sorted amoebocyte subpopulation, while only Cath C is absent from the sorted eleocytes (Fig. 2e). Interestingly, Cath C expression evidenced a low expression in total coelomocytes, while it appeared relatively higher in isolated amoebocytes. The inhibitor of these lysosomal proteases, Cyst B was expressed in both coelomocyte subpopulations (Fig. 2e). Their immune function in *E. andrei* is still unknown; however we cannot rule out the option that these proteases might be the possible regulators of lysenin-mediated cell lysis and also involved in the phagocytic machinery (Engelmann *et al.*, 2016a).

We have chosen four „housekeeping” genes to prove the intact RNA quality of the sorted coelomocyte subsets. All of tested genes including *COI*, *18S*, *RPL17* and  $\beta$ -*actin* expressed in both populations, however *RPL17* and  $\beta$ -*actin* genes showed a lower level in eleocytes (Fig. 2f).

## Conclusions

Taken together, hereby we report initially the differential expression patterns of immune and defense-related genes in sorted coelomocyte subsets of *E. andrei*. Our results verify the previously observed cytochemical, immunological and functional differences of coelomocyte subsets at the molecular level. Accordingly, amoebocytes are the main effector cells participating in pathogen recognition, and elimination. Eleocyte subpopulation is mainly involved in the stress response and production of bioactive molecules. These results provide fine details about the substantial molecular functions of separated coelomocyte subsets.

## Acknowledgement

We acknowledge the financial support of Medical School Research Foundation (PTE-ÅOK-KA 2017/04), University of Pécs, the GINOP-232-15-2016-00050 and EFOP-361-16-2016-00004 grants. P.E. was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. The present scientific contribution is dedicated to the 650<sup>th</sup> anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

## References

- Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.* 196: 493-503, 2002.
- Beschin A, Bilej M, Hanssens F, Raymakers J, Van Dyck E, Revets H, *et al.* Identification and cloning of a glucan-and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J. Biol. Chem.* 273: 24948-24954, 1998.
- Bilej M, Procházková P, Silerová M, Josková R. Earthworm immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708: 66-79, 2010.

- Bodó K, Boros Á, Rumpler É, Molnár L, Böröcz K, Németh P, *et al.* Identification of novel lumbricin homologues in *Eisenia andrei* earthworms. *Dev. Comp. Immunol.* 90: 41-46, 2019.
- Boman HG. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell.* 65: 205-207, 1991.
- Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C, Vieau D, Lemièrè S, Leprêtre A, *et al.* Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. *Environ. Sci. Technol.* 40: 2844-2850, 2006.
- Calisi A, Lionetto MG, De Lorenzis E, Leomanni A, Schettino T. Metallothionein induction in the coelomic fluid of the earthworm *Lumbricus terrestris* following heavy metal exposure: a short report. *Biomed. Res. Int.* 2014: 109386, 2014.
- Chen H, Lv M, Lv Z, Li C, Xu W, Zhang W, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of cathepsin B from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 60: 447-457, 2016.
- Cho JH, Park CB, Yoon YG, Kim SC. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1408: 67-76, 1998.
- Cooper EL, Kauschke E, Cossarizza A. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays.* 24: 319-333, 2002.
- Cooper EL, Roch P. Earthworm immunity: a model of immune competence *Pedobiologia.* 47: 676-688, 2003.
- Cuvillier-Hot V, Boidin-Wichlacz C, Slomianny C, Salzet M, Tasiemski A. Characterization and immune function of two intracellular sensors, HmTLR1 and HmNLR, in the injured CNS of an invertebrate. *Dev. Comp. Immunol.* 35: 214-226, 2011.
- Davidson CR, Best NM, Francis JW, Cooper EL, Wood TC. Toll-like receptor genes (TLRs) from *Capitella capitata* and *Helobdella robusta* (Annelida). *Dev. Comp. Immunol.* 32: 608-612, 2008.
- Engelmann P, Hayashi Y, Bodó K, Ernszt D, Somogyi I, Steib A *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, 2016a.
- Engelmann P, Hayashi Y, Bodó K, Molnár L. New aspects of earthworm innate immunity: novel molecules and old proteins with unexpected functions. In Ballarin L, Cammarata M (eds): *Lessons in immunity: from single cell organisms to mammals.* Academic Press, Elsevier 53-66, 2016b.
- Engelmann P, Molnár L, Pálkás L, Cooper EL, Németh P. Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell Tissue Res.* 316: 391-401, 2004.
- Engelmann P, Opper B, Németh P. Interactions of intracellular calcium and immune response in earthworms. *Inv. Survival J.* 8: 78-84, 2011.
- Engelmann P, Pálkás L, Cooper EL, Németh P. Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 599-614, 2005.
- Fjøsne TF, Stenseth EB, Myromslien F, Rudi K. Gene expression of TLR homologues identified by genome-wide screening of the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Innate Immun.* 21:161-166, 2015.
- Fuller-Espie SL. Using flow cytometry to measure phagocytic uptake in earthworms. *J. Microbiol. Biol. Educ.* 11: 144-151, 2010.
- Hayashi Y, Engelmann P, Foldbjerg R, Szabó M, Somogyi I, Pollák E. *et al.* Earthworms and humans *in vitro*: characterizing evolutionarily conserved stress and immune responses to silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 46: 4166-4173, 2012.
- Homa J, Olchawa E, Stürzenbaum SR, Morgan AJ, Plytycz B. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environ. Pollut.* 135: 275-280, 2005.
- Homa J, Zorska A, Wesolowski D, Chadzinska M. Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of *Eisenia andrei*. *J. Comp. Physiol.* 183: 313-322, 2013.
- Josková R, Silerová M, Procházková P, Bilej M. Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei*. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 932-938, 2009.
- Kowald GR, Stürzenbaum SR, Blindauer CA. Earthworm *Lumbricus rubellus* MT-2: metal binding and protein folding of a true cadmium-MT. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 65, 2016.
- Kopitar-Jerala N. Innate Immune Response in Brain, NF-Kappa B Signaling and cystatins. *Front. Mol. Neurosci.* 8: 73, 2015.
- Larsen EC, Ueyama T, Brannock PM, Shirai Y, Saito N, Larsson C, Loegerring D *et al.* A role of PKC- $\epsilon$  in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis by RAW 264.7 cells. *J. Cell Biol.* 159: 939-944, 2002.
- Lefebvre C, Cocquerelle C, Vandenbulcke F, Hot D, Huot L, Lemoine Y *et al.* Transcriptomic analysis in the leech *Theromyzon tessulatum*: involvement of cystatin B in innate immunity. *Biochem. J.* 380: 617-625, 2004.
- Lefebvre C, Vandenbulcke F, Bocquet B, Tasiemski A, Desmons A, Verstraete M, Salzet M *et al.* Cathepsin L and cystatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum*. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 795-807, 2008.
- Li W, Li S, Zhong J, Zhu Z, Liu J, Wang W. A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm, *Pheretima guillelmi* (Michaelsen). *Peptides.* 32: 1146-1150, 2011.
- Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler T. Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol. Rev.* 198: 10-24, 2004.
- Molnár L., Engelmann P, Somogyi I, Mácsik LL, Pollák E. Cold-stress induced formation of calcium and phosphorous rich chloragocytes



- granules (chloragosomes) in the earthworm *Eisenia fetida*. *Comp. Biochem. Physiol.* 163A: 199-209, 2012.
- Morgan AJ, Stürzenbaum SR, Winters C, Grime GW, Aziz NA, Kille P. Differential metallothionein expression in earthworms (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotox. Env. Saf.* 57: 11-19, 2004.
- Ohta N, Shioda S, Sekizawa Y, Nakai Y, Kobayashi H. Sites of expression of mRNA for lysenin, a protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Cell Tissue Res.* 302: 263-270, 2000.
- Opper B, Németh P, Engelmann P. Calcium is required for coelomocyte activation in earthworms. *Mol. Immunol.* 47: 2047-2056, 2010.
- Opper B, Bognár A, Heidt D, Németh P, Engelmann P. Revising lysenin expression of earthworm coelomocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 39: 214-218, 2013.
- Ragab A, Buechling T, Gesellchen V, Spirohn K, Boettcher AL, Boutros M. *Drosophila* Ras/MAPK signalling regulates innate immune responses in immune and intestinal stem cells. *EMBO J.* 30: 1123-1136, 2011.
- Roubalová R, Dvořák J, Procházková P, Škanta F, Navarro Pacheco NI, Semerád J, *et al.* The role of CuZn- and Mn-superoxide dismutases in earthworm *Eisenia andrei* kept in two distinct field-contaminated soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 159: 363-371, 2018.
- Sakaguchi A, Matsumoto K, Hisamoto N. Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* 136: 7-11, 2004.
- Schikorski D, Cuvillier-Hot V, Leippe M, Boidin-Wichlacz C, Slomianny C, Macagno E *et al.* Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *J. Immunol.* 181: 1083-1095, 2008.
- Škanta F, Roubalová R, Dvořák J, Procházková P, Bilej M. Molecular cloning and expression of TLR in the *Eisenia andrei* earthworm. *Dev. Comp. Immunol.* 41: 694-702, 2013.
- Škanta F, Procházková P, Roubalová R, Dvořák J, Bilej M. LBP/BPI homologue in *Eisenia andrei* earthworms. *Dev. Comp. Immunol.* 54: 1-6, 2016.
- Stein E, Avtalion RR, Cooper EL. The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. *J. Morphol.* 153: 467-477, 1977.
- Valembois P, Lasségués M, Roch P, Vaillier J. Scanning electron-microscopic study of the involvement of coelomic cells in earthworm antibacterial defense. *Cell Tissue Res.* 240: 479-484, 1985.
- Valembois P, Lasségués M. *In vitro* generation of reactive oxygen species by free coelomic cells of the annelid *Eisenia fetida andrei*: an analysis by chemiluminescence and nitro blue tetrazolium reduction. *Dev. Comp. Immunol.* 19: 195-204, 1995.
- Wang X, Wang X, Zhang Y, Qu X, Yang S. An antimicrobial peptide of the earthworm *Pheretima tschiliensis*: cDNA cloning, expression and immunolocalization. *Biotechnol. Lett.* 25: 1317-1323, 2003.
- Wang M, Wang L, Yi Q, Gai Y, Song L. Molecular cloning and characterization of a cytoplasmic manganese superoxide dismutase and a mitochondrial manganese superoxide dismutase from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 47: 407-417, 2015.
- Xiong W, Bai L, Muhammad RU, Zou M, Sun Y. Molecular cloning, characterization of copper/zinc superoxide dismutase and expression analysis of stress-responsive genes from *Eisenia fetida* against dietary zinc oxide. *Comp. Biochem. Physiol.* 155C: 416-422, 2012.
- Zaslouff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415: 389-395, 2002.



## Short communication

Identification of novel lumbricin homologues in *Eisenia andrei* earthwormsKornélia Bodó<sup>a</sup>, Ákos Boros<sup>b</sup>, Éva Rumpler<sup>c</sup>, László Molnár<sup>c</sup>, Katalin Böröcz<sup>a</sup>, Péter Németh<sup>a</sup>, Péter Engelmann<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Medical School, University of Pécs, Hungary<sup>b</sup> Regional Laboratory of Virology, ANTSZ, Baranya County Institute of State Public Health Service, Pécs, Hungary<sup>c</sup> Department of Comparative Anatomy and Developmental Biology, Faculty of Sciences, University of Pécs, Hungary

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Innate immunity  
 Antimicrobial peptides  
 Earthworms  
 Lumbricin  
 Gene expression

## ABSTRACT

Lumbricin and its orthologue antimicrobial peptides were typically isolated from annelids. In this report, mRNA for lumbricin and -serendipitously- a novel lumbricin-related mRNA sequence were identified in *Eisenia andrei* earthworms. The determined mRNA sequences of *E. andrei* lumbricin and lumbricin-related peptide consist of 477 and 575 nucleotides. The precursors of proline-rich *E. andrei* lumbricin and the related peptide contain 63 and 59 amino acids, respectively. Phylogenetic analysis indicated close relationship with other annelid lumbricins. Highest expression of both mRNAs appeared in the proximal part of the intestine (pharynx, gizzard), while other tested organs had moderate (body wall, midgut, ovary, metanephridium, seminal vesicles, ventral nerve cord) or low (coelomocytes) levels. During ontogenesis their expression revealed continuous increase in embryos. Following 48 h of *in vivo* Gram-positive bacteria challenge both mRNAs were significantly elevated in coelomocytes, while Gram-negative bacteria or zymosan stimulation had no detectable effects.

## 1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are structurally conserved bioactive molecules during phylogenesis (Boto et al., 2018; Bulet et al., 2004; Nguyen et al., 2011; Zasloff, 2002). Until now, several thousand AMPs have been isolated from prokaryotes to mammals (Boman, 1995; Zasloff, 2002). They possess a broad range of antimicrobial activity with no or little cytotoxicity (Kumar et al., 2018; Nguyen et al., 2011).

Earthworms operate with complex cellular and humoral immune constituents to maintain their self-integrity (Gupta and Yadaw, 2016). Until now a handful of immune components have been identified in earthworms (Cooper et al., 2002; Mácsik et al., 2015), but only a limited number of antimicrobial molecules (e.g. F1/F2, lumbricucin, lysenin/fetidin, lysozyme, OEP3121) have been characterized (Josková et al., 2009; Lassegues et al., 1997; Kim et al., 2015; Liu et al., 2004; Opper et al., 2013; Zhang et al., 2002).

In addition to lysozyme, just one restricted AMP denoted as lumbricin-1, has been isolated and characterized from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. This 62 amino acid long peptide exhibits *in vitro* broad antimicrobial spectra against fungi, Gram-positive and Gram-negative bacteria without hemolytic activity (Cho et al., 1998). By now, several lumbricin homologues have been identified and described from other earthworm (Li et al., 2011; Wang et al., 2003) and leech species

(Schikorski et al., 2008).

These aforementioned studies revealed the parallel existence of this peptide among annelid species, however it was not detected yet from *Eisenia andrei* earthworms. In this report we describe the characterization, tissue and ontogenetic distributions, and antimicrobial induction of a new lumbricin homologue and a novel lumbricin-related peptide from *E. andrei*.

## 2. Materials and methods

## 2.1. Earthworm husbandry

Adult (clitellated) *Eisenia andrei* (Lumbricidae, Annelida) were collected from the breeding stock, maintained at standard conditions (Molnár et al., 2012). Prior to organ and tissue isolations earthworms were placed onto moist tissue paper for overnight depuration to avoid soil contaminations.

## 2.2. RNA isolation, cDNA synthesis, rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Coelomocytes were harvested from the coelomic cavity, followed by the surgical removal of cerebral ganglion and the ventral nerve cord.

\* Corresponding author. Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Medical School, University of Pécs, Pécs, H-7643, Szigeti u. 12, Hungary.  
 E-mail address: [engelmann.peter@pte.hu](mailto:engelmann.peter@pte.hu) (P. Engelmann).

Total RNA was extracted from the samples according to the manufacturer's protocol using NucleoSpin<sup>®</sup> RNA isolation kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany). For the 3' RACE PCR reverse transcription (RT) was conducted from total RNA using High Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific) and Adapter-oligo-dT-anchor primer (Table S1).

After RNase-H digestion 3' RACE PCR reaction was made using adapter primer and a generic forward primer (Ea-Lumbr-F, Table S1) designed to the conserved sequence regions of the known lumbricin sequences of *L. rubellus* (AF060552) and *Hirudo medicinalis* (EU156756) and the same reagents described previously (Boros et al., 2011). For the 5' RACE RT-PCR reactions sequence specific R1 primers were used for RT (Table S1). Following the RT and RNase-H digestion 3' poly-A-tailing of the cDNA was made using terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme and dATP (Boros et al., 2011). The polyA-tailed cDNA was purified using GeneJET PCR purification kit (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA). Semi-nested PCR reactions were conducted using sequence-specific R2 (PCR1) and R3 (PCR2) reverse primers and Adapter-oligo dT-anchor primer (PCR1) the Adapter (PCR2) as a forward primers (Table S1) and the same reagents described previously (Boros et al., 2011). The thermal program for PCR reactions of the 3' and 5' RACE experiments started with 1 cycle at 94 °C for 30 s, followed by 35 cycles of 94 °C for 35 s, 50 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and terminated with a final elongation step of 72 °C for 5 min. The visible PCR amplicons were purified using either GeneJET PCR purification kit or GeneJET Gel extraction kit (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA) and sequenced directly on an automated sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Stafford, USA) using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). The obtained sequences were submitted into the NCBI Genbank (lumbricin accession number: [KX816866](#); LuRP accession number: [KX816867](#)).

### 2.3. Sequence and phylogenetic analysis

Amino acid sequences of annelid lumbricins and its novel homologues from *E. andrei* were aligned by Clustal Omega (Sievers and Higgins, 2014). Estimated molecular weight and theoretical isoelectric point analysis were performed by ProtParam and Compute pI/Mw tool (ExpASy) programs. Phylogenetic analysis was conducted using the maximum likelihood method and Poisson model by MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). The numbers closed to the branch nodes represent the percentage of 1000 bootstrap replications.

### 2.4. Relative quantification of target genes from adult tissues and embryos

Various organ and tissue samples (pharynx, gizzard, midgut, ovary, metanephridium, body wall, seminal vesicle, ventral nerve cord and coelomocytes) were collected from at least ten adult earthworms. Earthworm embryos were gathered from their cocoons. Their distinct developmental stages (from E1 to E4) were identified by their specific morphological features (Boros et al., 2010). Total RNA was extracted from ten pooled tissue samples of adult earthworms as well as a pool of ten embryos from all developmental stages according to the manufacturer's protocol using NucleoSpin<sup>®</sup> RNA isolation kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany). The amount of total RNA was determined by NanoDrop at 260 nm. RNA samples were stored at – 80 °C. Reverse transcription was accomplished in 20 µl reactions using High Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific) and cDNA samples were stored at – 20 °C. Subsequently, cDNA used as a template in qPCR reactions. Gene specific primers were designed with Primer Express software (Thermo Fisher Scientific) to estimate the expression levels of target genes in the aforementioned tissues (Table S1). Gene expression was measured by an ABI Prism 7500 instrument (Applied Biosystems, Warrington, UK) applying Maxima SYBR Green/Low Rox Master Mix (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA). The amplification

profile started at 95 °C for 10 min, that followed 40 cycles of 35 s at 95 °C, 35 s at 58 °C, and 1 min at 72 °C. Quantitative measurements were normalized to *RPL17* mRNA level (Table S1). Three independent experiments were implemented in duplicates.

### 2.5. In vivo microbial challenge

Adult earthworms (three animals/condition) were exposed to heat-inactivated *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (OKI 112001) (each 10<sup>8</sup>/ml) and zymosan (membrane from *Saccharomyces cerevisiae* in 1 mg/ml final concentration, Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) on filter paper for different time points at room temperature (Cang et al., 2017; Homa et al., 2005; Schikorski et al., 2008). The suspension of microorganisms and zymosan were diluted in Lumbricus balanced Salt Solution (LBSS). Control earthworms were exposed on LBSS-immersed filter paper (for composition, please see Engelmann et al., 2005). After the treatments coelomocytes were harvested from the coelomic cavity as we published earlier (Engelmann et al., 2005). Coelomocyte numbers were evaluated by trypan-blue exclusion method and subsequently were centrifuged twice in LBSS (200 g, 5 min, at room temperature). Total RNA extraction, reverse transcription, and qPCR experiments were executed as we described earlier. *RPL17* mRNA level was employed for the normalization process. Normalized expressions of both genes are exhibited in pathogen stimulated earthworms comparison with untreated ones.

### 2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with Prism v5.0 (GraphPad software, La Jolla, CA USA). Data were calculated from three independent experiments. Data were checked for normality prior to further analysis (Shapiro-Wilk normality test). All data were expressed as mean ± SEM. Results were analyzed by one or two way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests. *p* < 0.05 was denoted as statistically significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sequence analysis of *E. andrei* lumbricin and LuRP

A large variety of AMPs were isolated from several organisms from plants to humans. Annelid earthworms provided relatively limited information in this field (Tasiemski, 2008). Cho et al. (1998) isolated the first antimicrobial peptide (lumbricin-1) from the earthworm, *L. rubellus*. Until recently, several lumbricin homologues were described from other earthworms (*Pheretima tschiliensis*, and *P. guillelmi*) and the leech, *H. medicinalis* (Li et al., 2011; Schikorski et al., 2008; Wang et al., 2003). Based on the available annelid lumbricin sequences a novel generic forward primer was designed for the detection of lumbricin homologues in *E. andrei* by 3' RACE PCR (Table S1). Surprisingly, the 3' RACE PCR showed the presence of not one but two discrete bands (Fig. S1). The sequences determined from the two PCR amplicons showed only 43% pairwise nucleotide (nt) identity. Using sequence specific primers and 5' RACE PCR technique 466-nt and 549-nt-long sequences (without the polyA-tail) of the two mRNAs were determined. The 466-nt-long mRNA called as lumbricin (*Lumbr*) contains a single 192-nt-long ORF encoding a 63-aa-long peptide (average calculated molecular mass: 7413.35 Da) (Fig. 1a), while the 575-nt-long mRNA called as lumbricin-related peptide (*LuRP*) contains a single 180-nt-long ORF encoding a 59-aa-long peptide (average calculated molecular mass: 7066.84 Da) (Fig. 1b). The theoretical isoelectric points of the novel *Eisenia* AMPs (*Lumbr*: 7.95, *LuRP*: 6.07) were determined. The identified *Lumbr* and *LuRP* precursor peptides lack an obvious signal peptide sequence that is present in lumbricin-1 and lumbricin-PG, but absent from *Hm*-lumbricin and PP-1 (Fig. 1c). Interestingly, this phenomenon suggests that mature lumbricin is not secreted, however the

**a**

```

1 gacgaagtcgacaagattcaggaacgttttgccggaacaccggctaaggttgagatgtac 60
      M Y
61 agcaagtacgagcgtcagaaggacaagaggccatactcggaacgcaagaaccaatacacg 120
      S K Y E R Q K D K R P Y S E R K N Q Y T
121 ggtccgcagttctctctcctccggagcgcaccccaccgagaaggtcatcaaatggaac 180
      G P Q F L Y P P E R I P P Q K V I K W N
181 gaggagggtcctcccatctacgaaatccccggcgaaggaggtcacgcagaaccagctgcc 240
      E E G L P I Y E I P G E G G H A E P A A
241 gcctagggttagatttccagatgaaccgatgccaaccggagaggaagagagttgatttcga 300
      A *
301 tggagcgtgtggactgaactatcagcgttctttttaccatcgtcgtataagtctatcac 360
361 tcttagaggatcaagtagattgcgttagacctaagtttaactaaacctaaatcaattgctgtc 420
421 ttggttttaaatgagtgaggagaaaaattaaacaaattacaaccctaaaaaaaaaaaa 478
    
```

**b**

```

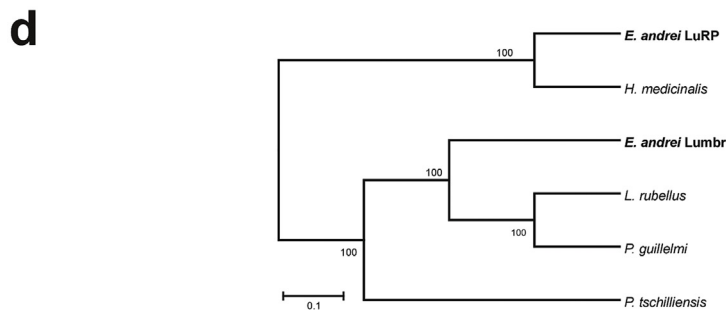
1 gacgctgtagacagaattcaaacacgcttcgctggagctccgtccaaggtggagatgtac 60
      M Y
61 agcaaatatcgagcgcagagaaggacaagaggtcgtacgagcgcacacagctctacacc 120
      S K Y E R Q K D K R S Y D E R H T I Y T
121 gggccccagtgggccccaccggctcgagagaatcaaccactaaaatcgctccgatggaac 180
      G P Q W A H P V E R I N P T K I V R W N
181 gaggaggcctgccatctacgaggaaccgggagcggagcagtgggccgatgagcatca 240
      E E G L P I Y E E P G A E Q V A A *
241 catgccttcggggttaacgagcctgtactcgcaagcttctgtataaaactctctcaaat 300
301 ctcaactgacaggatatttttcggctgatttctaatacgcagaacgctacgcactactccga 360
361 agcctactggcaacaccggcaacgaaacatttcagcatcgtcaagatcatattggacaac 420
421 tatcaacaactgatgtgcttagctgtcacgtctttacagcacacgccaatctgtgcaag 480
481 gcaacaatctcgggaatgttcttcttatgatgaccgaccttaatttttagtcttcaactct 540
541 ataaaaacgctactaacttaaaaaaaaaaaaaaaaaa 577
    
```

**c**

<i>Hm</i> -lumbricin	EU156756	-----	--MFSKYER	QKDKRSYGER	FSMFTGPQFI	SPPERIKPNK	37
Lumbricin-1	AF06552	<i>MSLCISDYLY</i>	<i>LTLTFSKYER</i>	QKDKRPYSER	KNQYTGPOFL	YPPERIPPQK	50
Lumbricin-PG	P86929	<i>MLLTISDFLF</i>	<i>LSLTFSRYAR</i>	MRDSRPWSDR	KNNYSGPOFT	YPFKAPPEK	50
PP-1	AY167144	-----	---MYSKYER	QKDKRPYSER	KDQYTGPOFL	YPPDRIPPSK	37
<i>E. andrei</i> Lumbr	KX816866	-----	---MYSKYER	QKDKRPYSER	KNQYTGPOFL	YPPERIPPQK	37
<i>E. andrei</i> LuRP	KX816867	-----	---MYSKYER	QKDKRSYDER	HTIYTGPOWA	HPVERINPTK	37
			:*: * *	:*. * . : : *	::***:	* : : * *	

<i>Hm</i> -lumbricin	EU156756	ILQWDGEGMP	IYATSGAAA-	-----E	57
Lumbricin-1	AF06552	VIKWNEEGLP	IYEIPGEGGH	AEPA---A-A	76
Lumbricin-PG	P86929	LIKWNEEGSP	IFEMPAEGGH	IE-----P	73
PP-1	AY167144	AIKWNEEGLP	MYEVLDPGAG	AKTAVEAAAAE	67
<i>E. andrei</i> Lumbr	KX816866	VIKWNEEGLP	IYEIPGEGGH	AEPA---A-A	63
<i>E. andrei</i> LuRP	KX816867	IVRWNEEGLP	IYEEPGA---	-EQV---A-A	59
			:*: * * * :		



experimental evidence shows that *Hm*-lumbricin and PP-1 from *P. tschiliensis* are present extracellularly (Schikorski et al., 2008; Wang et al., 2003).

The precursor peptides show 98% (Lumbr) and 66% (LuRP) identity

**Fig. 1.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of *E. andrei* lumbricin (a) and its related protein (*E. andrei* LuRP) (b). Amino acid sequences of the open reading frame are presented under the nucleotide sequences. Stop codons are denoted with asterisks. Polyadenylation signal sequences are underlined. *E. andrei* lumbricin (a) is a novel antimicrobial peptide consisted of 63 amino acids and *E. andrei* LuRP (b) is made up of 59 amino acids. (c). Amino acid sequence alignment of *E. andrei* lumbricin (KX816866) and *E. andrei* LuRP (KX816867) were compared to *L. rubellus* lumbricin-1 (AF06552), *H. medicinalis* lumbricin (EU156756), *P. guillelmi* lumbricin-PG (P86929) and *P. tschiliensis* antimicrobial-like peptide PP-1 (AY167144). The predicted signal peptide sequences are in italic. The asterisks (\*) signify identical amino acid residues and dots indicate highly conserved (:) or semi-conserved (.) substitutions. Phylogenetic relationship analysis based on the deduced amino acid sequences of *E. andrei* lumbricin and LuRP with the closest annelid molecular relatives by the maximum likelihood method. The numbers closed to the branch nodes represent the percentage of 1000 bootstrap replications (d).

to the antimicrobial peptide lumbricin-1 from *L. rubellus* (AF06552) as the closest match identified by BLASTp search. The *E. andrei* Lumbr and *E. andrei* LuRP precursor peptides show only 66% pairwise aa identity (Fig. 1c). The 3' untranslated regions of both mRNAs contain the

AAUAAA and AAUAAA polyadenylation signal sequences (Tian and Graber, 2012) (Fig. 1a and b). Phylogenetically Lumbr and LuRP precursor peptides are also separated from each other; Lumbr is clustered together with the lumbricin-1 of *L. rubellus* while LuRP shows closer relationship to the lumbricin homologue of *H. medicinalis* (Fig. 1d).

Interestingly, the N-terminal end of Lumbr of *E. andrei* is 13 aa shorter than the lumbricin-1 of *L. rubellus* otherwise the sequence of the two peptides are identical (Fig. 1c). Typical lengths of lumbricin homologues are ranged between 57 and 76 amino acids (Fig. 1c).

*E. andrei* lumbricin and its related peptide harbor numerous proline residues (14.3% and 6.8% in molar ratio) similar to lumbricin-1 and other lumbricin homologues (Cho et al., 1998). Typically proline-rich AMPs were isolated from the arthropods including insects and crustaceans (Graf et al., 2017; Otvos, 2002). According to Cho et al. (1998) lumbricin-1 shows certain similarity with the mammalian PR-39 and Bac5 AMPs, however this observation is not discussed in the case of other lumbricin relatives (Li et al., 2011; Schikorski et al., 2008; Wang et al., 2003).

Proline amino acids uniquely alter the protein conformation (e.g. folding and cyclisation); thereby it exerts an influence on the secondary structure of proteins (Graf et al., 2017; Vanhoof et al., 1995). Furthermore, aromatic amino acid (His, Trp, Tyr) content of these *Eisenia* lumbricin homologues is relatively high (15–16% in molar ratio), which could further suggest the antimicrobial activity of these peptides (Muñoz et al., 2007).

### 3.2. Tissue and embryonic expression patterns of Lumbr and LuRP in *E. andrei*

Since the recent studies (Li et al., 2011; Wang et al., 2003) did not survey extensively the tissue localization of lumbricins in annelids (Tasiemski, 2008), hence we aimed to examine the Lumbr and LuRP expression patterns in the different organs of *E. andrei*. According to Wang et al. (2003) lumbricin was restricted to the body wall in *P. tschiliensis*, and not present in the intestine or coelomocytes. A lumbricin homologue was isolated from the skin secretions of *P. guillelmi* (Li et al., 2011). Schikorski et al. (2008) investigated *Hm-lumbricin* expression of the microglial cells in the course of leech CNS regeneration. In contrast we demonstrated the presence of Lumbr and LuRP in a wide variety of *E. andrei* tissues (Fig. 2a). Highest mRNA expressions of both AMPs were detected in the proximal part of the intestine (including pharynx and gizzard), while other tested tissues had a moderate (body wall, midgut, ovary, seminal vesicle, metanephridium, ventral nerve cord) or low (coelomocytes) level of expression. Higher LuRP mRNA expression was demonstrated in all tested tissues and coelomocytes compared to Lumbr. The highest expressions of both AMPs were detected in the intestine, because this organ is the most exposed for frequent microbial invasions. According to Fiołka et al. (2012) lysozyme expression is also mainly detectable in the intestine of the earthworm, *Dendrobaena veneta*. Both lumbricin isoforms show ubiquitous tissue expression in *E. andrei* (Fig. 2a), in contrast to lysenin that is mainly attributed to large coelomocytes (amoebocytes), eleocytes (Oppen et al., 2013) or sessile chloragocytes (Ohta et al., 2000).

First ontogenetic distribution pattern of lumbricin is reported from *L. rubellus*. Cho et al. (1998) detected lumbricin-1 expression in adult *L. rubellus*, but not in the cocoons or developing earthworms. In contrast, both lumbricin homologues from *E. andrei* were expressed in the course of embryonic development (Fig. 2b). Their expression displayed continuous increase up to the fourth developmental stage (E4) when the body is entirely segmented and the organ differentiation is completed (Boros et al., 2010). LuRP exhibited significantly higher expression compared to Lumbr in the different stages of developing *E. andrei* earthworms. One explanation of the gradient increase of Lumbr/LuRP expression could be the larger body size of the more developed embryonic stages. On the other hand, it is known that numerous symbiotic bacteria colonize the earthworm embryos and their frequencies boost

during early embryogenesis (Zachmann and Molina, 1993; Davidson et al., 2010). It is probable that Lumbr and LuRP might control the growth of commensal bacteria in earthworm embryos that is known already about other invertebrate antimicrobial peptides (Roiff and Schmid-Hempel, 2016).

### 3.3. Induction of Lumbr and LuRP mRNA expression upon *in vivo* microbial challenge

Proline-rich AMPs possess a wide range of antimicrobial activity against microorganisms (Otvos, 2002). Indeed, *L. rubellus* lumbricin-1 is efficient against Gram-negative, Gram-positive bacteria and fungi without any haemolytic activity (Cho et al., 1998). Follow-up experiments on lumbricin homologues have verified these observations in other annelid species (Li et al., 2011; Schikorski et al., 2008). *L. rubellus* lumbricin-1 had similar minimal inhibitory concentrations comparing the activity against *E. coli* and *S. aureus* (Cho et al., 1998).

Interestingly, bacterial challenge did not induce the lumbricin-1 expression compared to non-bacteria challenged earthworms revealed by Northern blot analysis in *L. rubellus*. Thus, lumbricin-1 is evidenced constitutive expression in this species (Cho et al., 1998). In contrast, *Hm-lumbricin* expression is modulated overtime by microbial challenge (Schikorski et al., 2008). In particular Gram positive bacteria (*Micrococcus*) and zymosan treatments were more effective on *Hm-lumbricin* mRNA expression compared to Gram negative (*Aeromonas*) bacteria exposure in *H. medicinalis* (Schikorski et al., 2008). Li et al. (2011) described that among the tested strains the most sensitive were *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negative) and *S. aureus* (Gram-positive) to lumbricin-PG from *P. guillelmi*, however *E. coli* (Gram-negative) was less sensitive to this peptide. Similarly to the aforementioned studies we found significantly elevated mRNA level of Lumbr and LuRP upon 48 h of *S. aureus* bacteria challenge, but there was no any increase of expression upon *E. coli* or zymosan treatments (Fig. 2c and d). Regarding to the AMP induction kinetics *Hm-lumbricin* was elevated after 6 h that was peaked after 24 h in isolated leech CNS (Schikorski et al., 2008). In comparison, our results evidenced a rather slow induction of Lumbr and LuRP at 48 h, but we exposed *in vivo* intact earthworms to microbes.

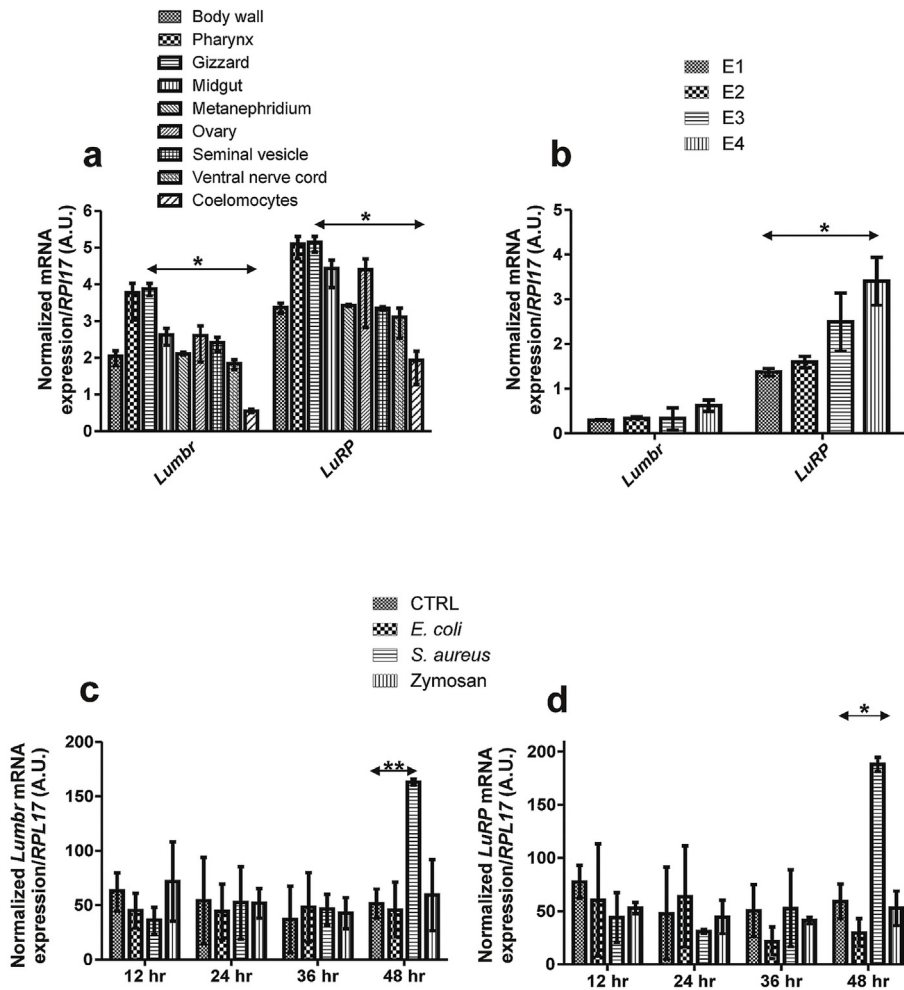
These discrepancies in the bacterial induction of lumbricin could be explained with the following considerations. First, there can be major differences in the expression levels among species. Second, the applied methods (Northern blot vs. qPCR) have different sensitivity. Third, these effects against the different microbial strains are based on the various structural features: mainly the amino acid compositions of lumbricins and differences between the microbial cell-wall constituents (Tassanakajon et al., 2015; Cunha et al., 2017).

## 4. Conclusions

Our study has revealed the presence of two novel members of the proline-rich lumbricin AMP family in the earthworm *E. andrei*. Hereby, our novel data support the high conservation of lumbricin AMPs in annelid worms and their possible role in the maintenance of earthworm immune homeostasis during ontogeny and pathogenic infections.

## Acknowledgements

We acknowledge the financial support of Medical School Research Foundation (PTE-ÁOK-KA 2017/04), University of Pécs, the GINOP-232-15-2016-00050 and EFOP-361-16-2016-00004 grants. Á.B. and P.E. were supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. Á.B. was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program'. The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.



**Fig. 2.** Comparison of *E. andrei* lumbricin (*Lumbr*) and *LuRP* mRNA expression levels from various tissues of *E. andrei* earthworms (a). Differential expression levels of *E. andrei Lumbr* and *LuRP* mRNA during the earthworm ontogenesis (b). Induced gene expression levels of *Lumbr* (c) and *LuRP* (d) were observed upon *in vivo* bacterial stimulation at different time points. Quantitative measurements were normalized to *E. andrei RPL17* mRNA levels. Three independent experiments were performed in duplicates. Results are demonstrated as mean and error bars represent standard error of the mean. Asterisks represent significant  $p$  (\* < 0.05, \*\* < 0.01) values. A.U.: arbitrary units.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.001>.

## References

- Boman, H.G., 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61–92.
- Boros, A., Somogyi, I., Engelmann, P., Lubics, A., Reglodi, D., Pollák, E., Molnár, L., 2010. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 (PAC1) receptor is expressed during embryonic development of the earthworm. *Cell Tissue Res.* 339, 649–653.
- Boros, A., Pankovics, P., Simmonds, P., Reuter, G., 2011. Novel positive-sense, single-stranded RNA (+ssRNA) virus with di-cistronic genome from intestinal content of freshwater carp (*Cyprinus carpio*). *PLoS One* 6, e29145.
- Boto, A., Pérez de la Lastra, J.M., González, C.C., 2018. The road from host-defense peptides to new generation of antimicrobial drugs. *Molecules* 23, E311.
- Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169–184.
- Cang, T., Dai, D., Yang, G., Yu, Y., Lv, L., Cai, L., Wang, Q., Wang, Y., 2017. Combined toxicity of imidacloprid and three insecticides to the earthworm, *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 8722–8730.
- Cho, J.H., Park, C.B., Yoon, Y.G., Kim, S.C., 1998. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1408, 67–76.
- Cooper, E.L., Kauschke, E., Cossarizza, A., 2002. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays* 24, 319–333.
- Cunha, N.B., Cobacho, N.B., Viana, J.F., Lima, L.A., Sampaio, K.B., Dohms, S.S., Ferreira, A.C., de la Fuente-Núñez, C., Costa, F.F., Franco, O.L., Dias, S.C., 2017. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov. Today* 22, 234–248.
- Davidson, S.K., Powell, R.J., Stahl, D.A., 2010. Transmission of a bacterial consortium in *Eisenia fetida* egg capsules. *Environ. Microbiol.* 12, 2277–2288.
- Engelmann, P., Pálincás, L., Cooper, E.L., Németh, P., 2005. Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 599–614.
- Fiołka, M., Zagaja, M.P., Hulas-Stasiak, M., Wielbo, J., 2012. Activity and immunodetection of lysozyme in earthworm *Dendrobaena veneta* (Annelida). *J. Invertebr. Pathol.* 109, 83–90.
- Graf, M., Mardrossian, M., Nguyen, F., Seefeldt, A.C., Guichard, G., Scocchi, M., Innis, C.A., Wilson, D.N., 2017. Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 34, 702–711.
- Gupta, S., Yadav, S., 2016. Immuno-defense strategy in earthworms: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 5, 1022–1035.
- Homa, J., Olchawa, E., Stürzenbaum, S.R., Morgan, A.J., Plytycz, B., 2005. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environ. Pollut.* 135, 275–280.
- Josková, R., Silerová, M., Procházková, P., Bilej, M., 2009. Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei*. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 932–938.
- Kim, D.H., Lee, I.H., Nam, S.T., Hong, J., Zhang, P., Lu, L.F., Hwang, J.S., Park, K.C., Kim, H., 2015. Antimicrobial peptide, lumbricin, ameliorates motor dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1640–1647.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J.N., Straus, S.K., 2018. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules* 8, E4.
- Kumar, P., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Lassegues, M., Milochau, A., Doignon, F., Du Pasquier, L., Valembois, P., 1997. Sequence and expression of an *Eisenia fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40-kDa fetidin antibacterial protein. *Eur. J. Biochem.* 246, 756–762.
- Li, W., Li, S., Zhong, J., Zhu, Z., Liu, J., Wang, W., 2011. A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm, *Pheretima guillelmi* (Michaelson). *Peptides* 32, 1146–1150.
- Liu, Y.Q., Sun, Z.J., Wang, C., Li, S.J., Liu, Y.Z., 2004. Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 36, 297–302.
- Mácsik, L.L., Somogyi, I., Opper, B., Bovári-Biri, J., Pollák, E., Molnár, L., Németh, P., Engelmann, P., 2015. Induction of apoptosis-like cell death by coelomocyte extracts from *Eisenia andrei* earthworms. *Mol. Immunol.* 67, 213–222.
- Molnár, L., Engelmann, P., Somogyi, I., Mácsik, L.L., Pollák, E., 2012. Cold-stress induced

- formation of calcium and phosphorous rich chloragocytes granules (chloragosomes) in the earthworm *Eisenia fetida*. *Comp. Biochem. Physiol.* 163A, 199–209.
- Muñoz, A., López-García, B., Pérez-Payá, E., Marcos, J.F., 2007. Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 172–177.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F., Vogel, H.J., 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 29, 464–472.
- Ohta, N., Shioda, S., Sekizawa, Y., Nakai, Y., Kobayashi, H., 2000. Sites of the expression of mRNA for lysenin a protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Cell Tissue Res.* 302, 263–270.
- Opper, B., Bogner, A., Heidt, D., Németh, P., Engelmann, P., 2013. Revising lysenin expression of earthworm coelomocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 214–218.
- Otvos Jr., L., 2002. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1138–1150.
- Roiff, J., Schmid-Hempel, P., 2016. Perspectives on the evolutionary ecology of arthropod antimicrobial peptides. *Philos. Trans. R. Soc. B* 371, 20150297.
- Schikorski, D., Cuvillier-Hot, V., Leippe, M., Boidin-Wichlacz, C., Slomianny, C., Macagno, E., Salzet, M., Tasiemski, A., 2008. Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *J. Immunol.* 181, 1083–1095.
- Sievers, F., Higgins, D.G., 2014. Clustal omega. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 48, 1–16.
- Tasiemski, A., 2008. Antimicrobial peptides in annelids. *Invertebr. Surviv. J.* 5, 75–82.
- Tassanakajon, A., Somboonwivat, K., Amparyup, P., 2015. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 48, 324–341.
- Tian, B., Graber, J.H., 2012. Signals for pre-mRNA cleavage and polyadenylation. 3. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, pp. 385–396.
- Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., Scharpé, S., 1995. Proline motifs in peptides and their biological processing. *Faseb. J.* 9, 736–744.
- Wang, X., Wang, X., Zhang, Y., Qu, X., Yang, S., 2003. An antimicrobial peptide of the earthworm *Pheretima tschiliensis*: cDNA cloning, expression and immunolocalization. *Biotechnol. Lett.* 25, 1317–1323.
- Zachmann, J.E., Molina, J.A., 1993. Presence of culturable bacteria in cocoons of the earthworm *Eisenia fetida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1904–1910.
- Zaslouff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.
- Zhang, X.C., Sun, Z.J., Zhuo, R.P., Hou, Q.M., Lin, G.Q., 2002. Purification and characterization of two antibacterial peptides from *Eisenia fetida*. *Prog. Biochem. Biophys.* 29, 955–960.

# SUPPLEMENTARY MATERIALS

## IDENTIFICATION OF NOVEL LUMBRICIN HOMOLOGUES IN *EISENIA ANDREI* EARTHWORMS

Kornélia Bodó<sup>1</sup>, Ákos Boros<sup>2</sup>, Éva Rumpler<sup>3</sup>, László Molnár<sup>3</sup>, Katalin Böröcz<sup>1</sup>, Péter  
Németh<sup>1</sup>, Péter Engelmann<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Medical School, University  
of Pécs, Hungary

<sup>2</sup>Regional Laboratory of Virology, ANTSZ, Baranya County Institute of State Public Health  
Service, Pécs, Hungary

<sup>3</sup>Department of Comparative Anatomy and Developmental Biology, Faculty of Sciences,  
University of Pécs, Hungary

**\*Corresponding author:** Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center,  
Medical School, University of Pécs, Pécs, H-7643, Szigeti u. 12, Hungary. Tel: + 36-72-536-  
288, Fax: + 36-72-536-289, email: engelmann.peter@pte.hu



## SUPPLEMENTARY TABLES

**Table S1. List of the primer sequences applied in the experiments.**

Primer name	Application	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>
Ea-Lumbr-F	3'RACE-PCR	AAG TAC GAG MGN CAG AAG GAC AA
Adapter -oligo-dT-anchor	3'RACE-RT	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTTTTTTTTT TTV
Adapter	3'RACE-PCR	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C
Ea-Lumbr-R1	5'RACE-RT	CGC TCC ATC GAA ATC AAC TCT
Ea-Lumbr-R2	5'RACE-PCR1	TCG AAA TCA ACT CTC TTC CTC
Ea-Lumbr-R3	5'RACE-PCR2	GGC ATC GGT TCA TCT GGA AA
Ea-LuRP-R1	5'RACE-RT	GTC AGT TGA GAT TTG AGA GAG TT
Ea-LuRP-R2	5'RACE-PCR1	TGC GAG TAC AGG CTC GTT AAC
Ea-LuRP-R3	5'RACE-PCR2	ATG TGA TGC TCA TGC GGC CA
Ea-Lumbr-Fq	qPCR	ACT CGG AAC GCA AGA ACC AA
Ea-Lumbr-Rq	qPCR	GGT TCT GCG TGA CCT CCT TC
Ea-LuRP-Fq	qPCR	GGT CGA GAG AAT CAA CCC AAC TA

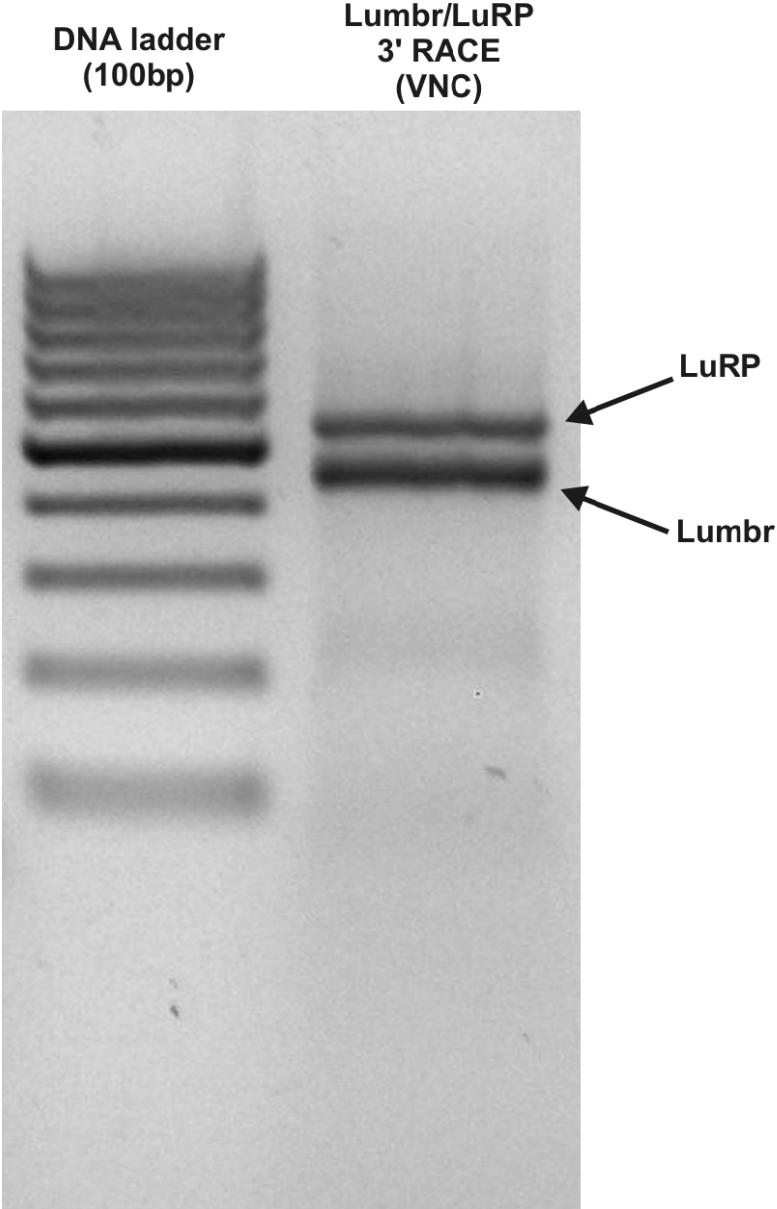
Ea-LuRP -Rq	qPCR	TGC GAG TAC AGG CTC GTT AAC
Ea-RPL17-Fq	qPCR	GCA GAA TTC AAG GGA CTG GA
Ea-RPL17-Rq	qPCR	CTC CTT CTC GGA CAG GAT GA

---

<sup>a</sup> *Upper and lower sequences denote forward and reverse primers*

*Abbreviations: Lumbr - Lumbricin; LuRP - Lumbricin-related peptide*

**SUPPLEMENTARY FIGURES**



**Fig. S1. 3' RACE PCR amplification of lumbricin and LuRP cDNAs from ventral nerve cord (VNC) sample of *E. andrei*.**



# Annelida: Oligochaetes (Segmented Worms): Earthworm Immunity, Quo Vadis? Advances and New Paradigms in the Omics Era

Péter Engelmänn, Kornélia Bodó, József Najbauer,  
and Péter Németh

---

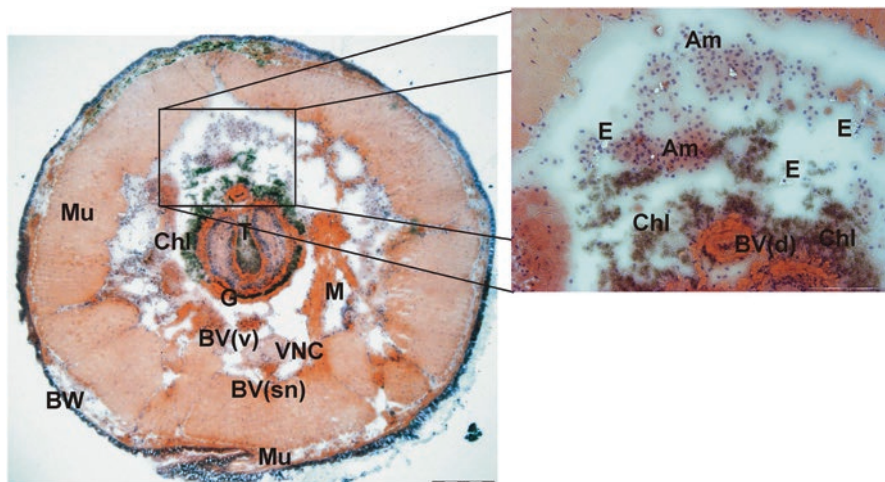
## Immune Surveillance of Earthworms: A Brief Introduction

### Morphological and Physiological Background

More than 8000 earthworm species have been described; their sizes vary greatly and they dwell in soil and freshwater habitats (Pirooznia et al. 2007). They possess an elongated, segmented body shape that bears numerous setae to help their locomotion. Most of these segments contain the same set of organs, except the shared digestive, circulatory, and nervous system along their body. Several important anatomical and physiological structures are specific to these animals, such as a secondary body cavity (e.g., coelomic cavity) and the closed, complex circulatory system with blood vessels that contain hemoglobin in suspension (Mill 1978). A specialized tissue compartment surrounds the gut (e.g., chloragogenous tissue) and has multiple important functions (e.g., carbohydrate metabolism, storage, detoxification and immune properties) resembling vertebrate hepatocytes (Jamieson 1981). The coelomic cavity is filled with a protein-rich fluid that contains various free-floating cellular components, termed coelomocytes (Fig. 1). Coelomocytes are considered to be the mesodermal effector cells of an earthworm's immune system. The body cavity is connected with the outer environment through nephridiopores and dorsal pores that ensure continuous microbial exposure and promote effective immune mechanisms in earthworms.

---

P. Engelmänn (✉) · K. Bodó · J. Najbauer · P. Németh  
Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs,  
Pécs, Hungary  
e-mail: [engelmänn.peter@pte.hu](mailto:engelmänn.peter@pte.hu)



**Fig. 1** Cross-section of *Eisenia andrei* earthworm. Main organs and tissue compositions are marked on the photomicrographs. Inset shows the distinct coelomocyte subpopulations (amoebocytes and eleocytes) of earthworm located in the coelomic cavity. Hematoxylin-eosin staining. Scale bars: 500  $\mu\text{m}$  (main image) and 200  $\mu\text{m}$  (inset). Am amoebocytes, BW body wall, BV (d) dorsal blood vessel, BV (sn) subneural blood vessel, BV (v) ventral blood vessel, Chl chloragocytes, E eleocytes, G gut, M metanephridium, Mu muscle layers, VNC ventral nerve cord

## Back to the Roots

In the past century the field of immunology, including comparative immunology, gained enormous amounts of novel and important knowledge relevant to basic and applied biological sciences. Comparative immunological studies date back to Metchnikoff, who established the field of cellular immunology (Cooper et al. 2002; Silverstein 2001). In the late 1800s several pioneering morphological observations in earthworms identified the cellular constituents (e.g., coelomocytes) of the coelomic cavity (Liebmann 1942; Rosa 1896). Indeed, the nomenclature of these cell types is based on the categorization of vertebrate leukocytes, which is sometimes misleading because no direct homology exists among the immune cells of invertebrate and vertebrate organisms. Following early ground-breaking observations, several research groups studying earthworm immunity were initiated in the USA (established by Edwin L. Cooper), Germany (begun by Werner Mohrig), France (launched by Pierre Valembois), and Czech Republic (led by Jaroslav Rejnek). These research groups have carried out in-depth studies of earthworm immune mechanisms, ranging from transplantation experiments to the analysis of humoral and cellular immune components. Now earthworms are even used in biomedical applications and as an alternative food source (Cooper and Balamuragan 2010; Cooper and Hirabayashi 2013). With regard to the University of Pécs, Hungary, in the 1970s Ernő Fischer initiated several experiments investigating chloragogenous tissues and their physiological role in earthworms after exposure to different toxicants (Fischer 1977; Fischer and Molnár 1992).

Many excellent reviews and book chapters (including those present in this volume) summarize the recent advances of earthworm immunity (Bilej et al. 2010; Cooper et al. 2002, 2006; Engelmann et al. 2016a). In the following section we provide a brief survey of our contribution in this research area. Furthermore, we discuss some novel observations that might open new research directions in the field of earthworm immunity.

---

## Application of Monoclonal Antibodies in Earthworm Immunity

Monoclonal antibodies (mAbs) are major scientific tools used to study vertebrate (mainly mouse and human) immune functions. Interestingly, very few studies are available about the application of mAbs in the field of earthworm immunology.

According to Cossarizza et al. (1996), mouse mAbs raised against mammalian antigens unequivocally identify one subgroup of coelomocytes denoted as small, electron-dense cells. This cell group showed cross-reactivity with a-CD90 (Thy-1), a-CD54, a-CD11a, a-CD45RA/CD45RO, a-CDw49b, and a- $\beta_2$ -microglobulin, whereas the large, electron lucent cells were negative for these reactions. Furthermore, these phenotypic differences were mirrored in their functionality because small coelomocytes were cytotoxic against certain tumor cell lines, whereas the large cells were phagocytic. As a follow-up study, first we applied several mouse mAbs developed against conserved mammalian cell surface molecules (Thy-1, CD24), cytokines (tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ , transforming growth factor- $\alpha$ ), oxidative stress enzymes (Cu/Zn superoxide dismutase), and hormones (thyroid-stimulating hormone) (Engelmann et al. 2002; Wilhelm et al. 2006). Among the obtained results, we believe that the cross-reactivity of a-TNF- $\alpha$  mAb with earthworm cellular structures is a unique observation (Engelmann et al. 2002). Our immunoserological, immunohistochemical approach proved that a conserved epitope of a TNF-like molecule might exist in earthworms. Since our study, several TNF-family homologs have been cloned and described in various invertebrates (Parinello et al. 2008; Sun et al. 2014). Considering these supportive data, it seems that cytokines with an essential role in inflammation might have emerged early during evolution (Beschin et al. 1999; Engelmann et al. 2005a; Wiens and Glenney 2011). Interestingly, leech immune cells also show cross-reactivity with a panel of mAbs specific against mammalian myeloid antigens (de Eguileor et al. 2000). The current data should be supported by further experiments, including isolation and identification of cell surface antigens and adhesion molecules in annelids.

The aforementioned studies used antibodies generated against mammalian antigens because of the lack of coelomocyte-specific reagents, which potentially raises criticism about the specificity of these antibodies to antigens in annelids.

To fill this gap we developed a panel of specific mAbs (EFCC [*Eisenia fetida* coelomocyte cluster] clones) against earthworm (*Eisenia* spp.) coelomocytes to further analyze the distinct features of coelomocyte subsets (hyaline amoebocytes, granular amoebocytes, and eleocytes) (Engelmann et al. 2005b). With the aid of these molecular tools we were able to phenotypically and functionally characterize

different subsets of coelomocytes combining cell sorting with imaging and functional assays (Engelmann et al. 2016b). We confirmed that hyaline and granular amoebocytes are capable of phagocytosis and encapsulation, although granular amoebocytes engulf fewer foreign particles than do hyaline cells (Engelmann et al. 2005b; Fuller-Espie 2010). Eleocytes show no phagocytic properties (Stein et al. 1977), but they possess several metabolic functions including the production of bioactive molecules such as lysenin (Kobayashi et al. 2004; Lassegues et al. 1997; Opper et al. 2013; Valembois et al. 1982). Using a novel mAb (a-EFCC5) reacting with lysenin, we obtained data in support of the view that eleocytes and large amoebocytes, but not sessile chloragocytes, are the major source of lysenin. We observed that lysenin production in earthworm coelomocytes is modulated *in vitro* by exposure to Gram-positive bacteria (Opper et al. 2013). Along with other studies we demonstrated that coelomocytes exert a very strong cytotoxicity in addition to their phagocytic activity (Engelmann et al. 2004). As a follow-up to our initial cytotoxicity study, we showed in extensive downstream experiments that, indeed, lysenin is one essential, but not exclusive, member of the earthworm cytotoxic molecular palette (Mácsik et al. 2015).

Recently, we obtained insightful data about the *in vitro* interactions of coelomocytes and silver nanoparticles (Hayashi et al. 2012). With the aid of recombinant lysenin and our lysenin-specific mAb (a-EFCC5), we observed that lysenin is an essential molecular component of the protein corona formed around silver nanoparticles. Furthermore, lysenin-rich protein corona directly facilitates the cellular uptake of silver nanoparticles (Hayashi et al. 2013).

Indeed, we gathered a handful of phenotypic and functional information about the cellular immune components of earthworms; however, there are several unexplored areas that remain to be investigated further. For instance, some publications discuss the proliferation capacity and recovery of coelomocytes in the coelomic cavity (Dvořák et al. 2016; Engelmann et al. 2011; Homa et al. 2013; Roch 1979). There is still no clear consensus whether all coelomocyte subtypes are able to proliferate or only certain subtypes. Is there lineage commitment in these cell types, and which coelomocyte types can be considered as progenitor cells?

---

## Transcriptomics in Earthworm Immunity

### Digging for Information: Earthworm Nucleotide Databases

This chapter focuses on earthworm immunity, but we think it is essential to have a short overview of the molecular databases dealing with earthworms. Currently, earthworms are frequently used in studies testing specific target genes, isolating Expressed Sequence Tags (ESTs), or performing whole transcriptome analysis to uncover the effect of certain toxicants (Gong and Perkins 2016).

These “omics” studies cover multi-platform genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics (Brulle et al. 2010). Simultaneous informatics and statistical approaches allow the extraction of information from the multivariate datasets

to illustrate how interdependent pathways of genes respond to different stimuli. For this research purpose, publicly available nucleotide databases (in addition to the NCBI [National Center for Biotechnology Information]) are extremely relevant.

In the case of earthworms, *Lumbricus rubellus* was initially used to build an EST library (Stürzenbaum et al. 2009). More than 17,000 tags that represent approximately 8000 genes are incorporated in this database. This information was the basis to construct a publicly available genome library, the LumbriBASE ([www.earthworms.org](http://www.earthworms.org)). Certain genes show significant homologies with their correspondent genes isolated from *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, and *Homo sapiens*. Interestingly, from the different gene cohorts of earthworms, the highest numbers of significance were evidenced with the human counterparts. Later, the abovementioned *L. rubellus* database was further developed into another database incorporating the EST sequences of *Helobdella robusta* leech and *Capitella teleta* polychaete species (<http://badger.bio.ed.ac.uk/earthworm/>) (Elsworth et al. 2013); however, this database is currently not accessible. Recently, another available earthworm nucleotide database has been released based on the draft genome of *Eisenia fetida* (<http://ryanlab.whitney.ufl.edu/genomes/Efet/>) (Zwarycz et al. 2015). These databases are invaluable bioinformatics tools to those researchers who plan to target certain genes in their studies.

## Transcriptomics and (Eco)Toxicology of Earthworms

Due to human industrial and economic activities, environmental contamination is rapidly increasing. Earthworms are eco-engineers that are responsible for the quality control of our terrestrial environment (Darwin 1881). These soil sentinels are more frequently applied in various (eco)toxicological studies than in other scientific fields. Indeed, *Eisenia* spp. is recommended by the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) as a well-established organism for ecotoxicological testing of certain toxic chemicals (OECD 1984, 2004). Using the standard in vivo readouts (e.g., survival, reproduction, growth, soil avoidance test) these animals are the practical bioindicators for different environmental toxicants (Velki and Ećimović 2017). During the last two decades the aforementioned classical ecotoxicological toolbox has been complemented with novel molecular biological approaches aimed at untangling the questions concerning ecological and environmental stressors (Brulle et al. 2010; Thunders et al. 2017). Ecotoxicological experiments now frequently apply transcriptomic, proteomic, metabolomic, and bioinformatic approaches to monitor the ecological effects of polluted soils on earthworms (Stürzenbaum et al. 2009). Transcriptomic analysis has certain benefits over the classical ecotoxicological tools. First, sensitivity: gene expression will be more sensitive; fluctuation of expression patterns can be detected at lower exposure concentrations. Second, specificity: gene expression will be specific to the triggering stress mechanisms, unlike reproduction or soil avoidance. Third, rapidity: the gene expression pattern changes quickly, on the order of hours to days, while classical tests could last weeks (Gong et al. 2010). On the other hand, transcriptomic



information may not always be reliable at the protein level, so the experiments are more complete if the transcriptomic results are complemented with proteomic and metabolomic studies. To this end, earthworms can provide sensible and reliable biomarkers (e.g., metallothionein, phytochelatin synthase, riboflavin) to monitor the health status of the soil ecosystems (Brulle et al. 2006; Stürzenbaum et al. 2004; Plytycz et al. 2010). Recently, several regulatory agencies have discussed how genomic tools could fit into the risk assessment process.

In the last 20 years approximately 60 studies have dealt with earthworms in the field of toxicology and genomics. Within these studies a broad array of toxicants have been tested, ranging from metals, insecticides, pharmaceutical drugs, and organics to explosives. Indeed, these studies highlight the recently emerged interest in these areas of research. It is quite striking that certain toxicological studies applying parallel metabolomics and transcriptomics resulted in a significant overlap between the effects elicited by different compounds (Van Straalen and Roelofs 2008).

## Immunotranscriptomics of Earthworms

Why is transcriptomic information important in studies of earthworm immunity? Largely because stimuli that reach coelomocytes can be measured at the gene expression level and this is among the first biological parameters to change upon exposure to stressful conditions. Some specific studies have directly analyzed the transcriptome of coelomocytes; however, this was mostly in the ecotoxicological and not immunological context (Brulle et al. 2006).

One initial study analyzed 1151 ESTs directly from a complementary DNA (cDNA) library of coelomocytes and found 659 unique genes, among which 24 were immune- and defense-related genes (Tak et al. 2015). Overall, the most abundant genes were related to energy metabolism; lysenin-related protein has evidenced the highest frequency among the immune-related genes. Furthermore, they proved that mRNA expression of lysenin-related protein was modulated in vivo only by Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*) challenge, which is consistent with our findings on the protein level of lysenin expression following in vitro exposure to bacteria (Opper et al. 2013).

Another transcriptomic study applied next-generation sequencing (NGS) on an Illumina platform to identify characteristic genes for the earthworm immune system (Mikami et al. 2015). For this purpose, coelomocytes were isolated from *E. fetida* reared in a sterile environment. Isolated coelomocyte mRNAs were subject to NGS and resulted in 151,929 contigs. From these contigs 41,423 unigenes were identified, and among those 12,285 unigenes had annotations in NCBI. Based on gene ontology assignments several unigenes were assigned to immune system processes, notably to immune receptor signaling pathways. Indeed, the Toll-like receptor (TLR) adaptor protein myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) was found to be a unigene, confirming other previous datasets (Gong et al. 2008; Hayashi et al. 2016), while a homolog for Janus kinase (JAK) 2, a member of JAK-STAT

(Signal Transducer and Activator of Transcription) signaling, was also identified (Mikami et al. 2015). Several lines of evidence suggest that ancient natural killer (NK)-like activity exists in earthworms (Cossarizza et al. 1996; Engelmann et al. 2004; Kauschke et al. 2001); however, so far the NK-specific molecular fingerprints (e.g., homolog for perforin, granzymes, etc.) have not been available. Mikami et al. (2015) found an *Eisenia* homolog of the  $\beta$ -1,3-glucuronyltransferase 1 (*GlcAT-P*) gene that participates in the synthesis of the CD57 NK cell marker of vertebrates. In fact, this gene shows high similarity to human *GlcAT-P*; however, the molecule has other functions (e.g., neurobiological processes).

There have been only a few transcriptomic studies dealing with earthworm immunity; however, this field is rapidly developing. The high number of genes that remain to be identified could shed more light on the physiology of coelomocytes. On the other hand, earthworm coelomocytes represent a mixed population of eleocytes and amoebocytes. This dichotomy could manifest at several biological levels (Hayashi and Engelmann 2013) that should be taken into account during the (gen)omic approaches. Eleocytes and amoebocytes can be separated by cell sorting (Engelmann et al. 2016b) to resolve this issue and apply the well-characterized single populations in various downstream ‘omic’ applications.

---

## Epigenetics: From Basic Concepts to Worms as Pivotal Model Organisms

### Basic Concepts in Epigenetics: DNA Methylation, Histone Modifications, and RNA Interference

The eukaryotic cell nucleus contains the genomic DNA, associated nuclear proteins (histones, transcription factors, etc.), and various RNA species that comprise the chromatin. The structure of chromatin determines the expression of genes and the flow of genetic information to a large degree, and many of these processes are regulated by epigenetic mechanisms. Epigenetics means above/upon (epi) genetics that consist of heritable changes in gene expression or phenotype that are stable between cell divisions, and sometimes between generations, but do not involve changes in the underlying DNA sequence of the organism. The combination of histone and DNA post-translational modifications and related interacting proteins helps to define the transcriptional program in a given cell. In the context of epigenetic signaling, post-translational modifications are often called ‘marks’ or ‘tags’ (Arrowsmith et al. 2012).

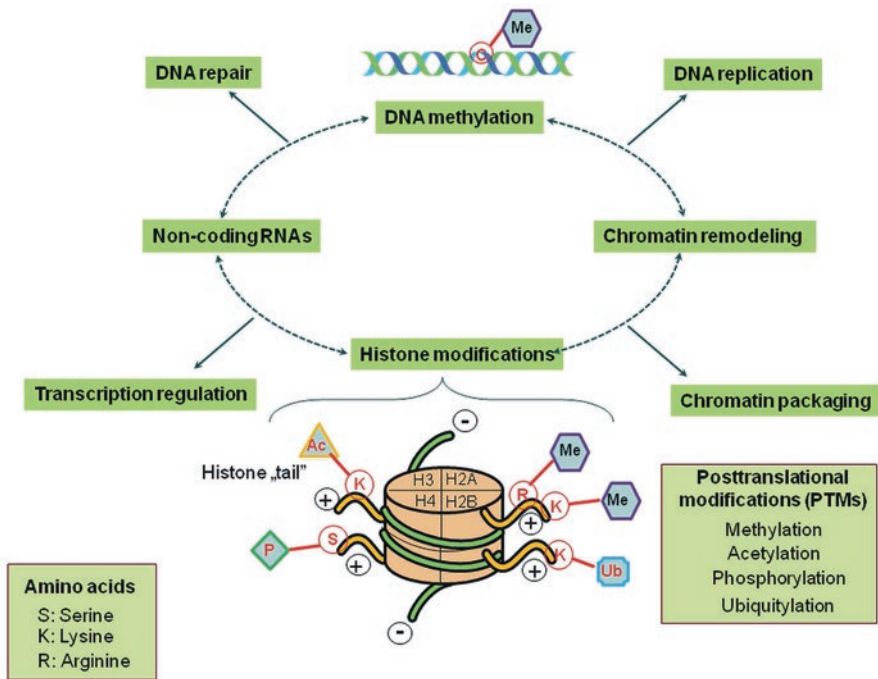
DNA methylation involves covalent modifications of CpG (cytosine–guanine) dinucleotides. The majority of methylated CpG dinucleotides in vertebrates are in heterochromatic regions, often in promoter CpG islands (of note, the worm *C. elegans* lacks detectable levels of 5-methylcytosine, while the fly *D. melanogaster* contains very low levels of 5-methylcytosine) (Bird 2002). The cytosines in CpG dinucleotides become 5-methylcytosines as a result of DNA methylation. Among its functions, DNA methylation in mammals is required for gene silencing. As a result

of DNA methylation, the chromatin becomes more condensed (transcription repressed). DNA demethylation results in chromatin expansion (transcription permitted) (Gaspar-Maia et al. 2011).

Another type of DNA modification,  $N^6$ -methyladenine (6 mA), was identified first in prokaryotes and some unicellular eukaryotes but has recently been found in metazoans. The function of this modification in metazoans is not well-defined; however, it is postulated that it may be involved in gene activation and transposon suppression (Luo and He 2017). It is likely that future studies will identify proteins involved in 6 mA writing, reading, and erasing, which should help in determining the functional relevance of this type of DNA modification.

Covalent modifications of histones are essential to regulation of chromatin dynamics, and thus affect numerous biological processes. One of the most frequent post-translational modifications of histones is methylation of lysines and arginines (Greer and Shi 2012). Lysines in histones can be non-methylated, or mono-, di-, or trimethylated on the  $\epsilon$ -amino group of the lysine side chains. Arginines can be non-methylated, N-monomethylated or N,N-dimethylated on the side chain guanidino group. Lysines in histones can also be acetylated and ubiquitinated, whereas arginines in histones can be citrullinated. Other modified amino acids in histones include phosphoserine, phosphotyrosine, and ribosylated glutamic acid (Campos and Reinberg 2009). Propionylated and sumoylated (SUMO [small ubiquitin-like modifier]) amino acids can also be found in histones. Many of these molecular 'tags' that establish the so-called 'histone code' are in a dynamic state, i.e., such tags can also be removed (Arrowsmith et al. 2012). These tags and proteins, together with DNA methylation and demethylation, comprise the dynamic components of the epigenome.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2006 was awarded to American scientists Andrew Z. Fire and Craig C. Mello for their discovery of RNA interference and gene silencing by double-stranded RNA. The discovery was made in the nematode worm *C. elegans* by observing the phenotypic effect of injection of single-stranded or double-stranded *unc-22* RNA into the gonad of *C. elegans* (the *unc-22* gene encodes a myofilament protein). Injected double-stranded RNA, but not single-stranded RNA, induced the twitching phenotype in the progeny. RNAi-based regulatory processes are involved in numerous biological processes, including protection against viral infections, securing genome stability by keeping mobile elements silent, epigenetic regulation, chromatin remodeling, genome integrity/stability, developmental gene regulation, and so on. The RNA species that regulate such processes are, among others, long non-coding RNAs (lncRNAs), small non-coding RNAs (sncRNAs), microRNAs (miRNAs), PIWI-interacting RNAs (piRNAs), and short interfering RNAs (siRNAs) (Gomes et al. 2013) (Fig. 2). RNAi can be used to modulate gene expression and has provided a powerful tool for studying gene function, and is likely to have great impact on treatment of diseases (Castanotto and Rossi 2009; Pecot et al. 2011).



**Fig. 2** Schematic summary of epigenetic mechanisms that affect the nuclear structure, function, and gene expression. Epigenetic components include DNA methylation, histone post-translational modifications, chromatin remodeling, and non-coding RNA targeting. These components and their interplays contribute to the regulation of crucial nuclear activities such as DNA replication, repair, chromatin packaging, and transcription. The nucleosome subunit is shown with schematic summary of histone modifications that comprise the histone code

## Epigenetic Mechanisms in Earthworms

### MicroRNAs in Earthworms

Investigation of epigenetic mechanisms in earthworms has been advancing at a significantly slower pace than in the fruit fly *D. melanogaster* or the nematode worm *C. elegans*. Nevertheless, earthworm epigenetics are starting to emerge, especially in the context of ecotoxicology, but also at the basic science level, such as concerning miRNAs as regulators of the epigenome. miRNAs are an abundant new class of sncRNAs that average 22 nucleotides in length and which play important roles in regulating gene expression in a wide range of processes from cell differentiation and development and immunological defense mechanisms to learning and memory (Follert et al. 2014; Kosik 2009; Mehta and Baltimore 2016; Self-Fordham et al. 2017). Gong et al. identified 32 miRNAs belonging to 22 families using earthworm EST databases and homology-based EST analysis with secondary structure requirements (Gong et al. 2010). They found that these earthworm miRNAs share multiple features with known animal miRNAs, such as the nucleotide U being

dominant in both mature and pre-miRNA sequences. Using *in silico* analysis they identified 436 unique target ESTs for 30 of the 32 earthworm miRNAs. Interestingly, the potential target genes were predicted to be involved in biological processes and pathways related to development, growth, and reproduction, as well as the response to stress, particularly oxidative stress. The authors suggested that deep-sequencing technologies are likely to help in further characterization of both conserved and species-specific earthworm miRNAs (Gong et al. 2010). In another study, Huang et al. investigated the role of miRNAs in tissue regeneration in the earthworm *E. fetida* (Huang et al. 2012). The authors cloned and characterized 17 non-coding RNAs from this species and found four small RNAs (efe-let-7, PB1–1, PB7, PB10) that showed higher expression in regenerating tissues than in normal control tissues, suggesting their role in the regeneration process (Huang et al. 2012).

### **Earthworm Epigenetics in an Ecotoxicological Context**

Earthworms, especially *Eisenia* spp. and *Lumbricus* spp., are widely used as sentinel species and serve as bioindicators/biomonitors for soil ecosystems due to their close contact with the environment. Earthworms have also been used extensively to assess environmental risk and chemical toxicity in laboratory and field settings (Gong and Perkins 2016). With advances in epigenetics, earthworms are increasingly used to determine the effects of ecotoxicological factors and environmental stressors on the epigenome (Vandegheuchte and Janssen 2014). In an earlier study, Santoyo et al. studied global DNA methylation in earthworms and suggested that it may serve as a candidate biomarker for epigenetic risks related to the presence of metals in soil (Santoyo et al. 2011). The authors have found a direct correlation between soil and tissue content of As, Se, Sb, Zn, Cu, Mn, Ag, Co, Hg, and Pb, and have observed an inverse correlation between the percentage of methylated DNA cytosines and total tissue and some of these metals (individually or in combination). A recent study showed that low levels of Cd (a common soil pollutant) induced persisting epigenetic modifications, which may mediate acclimation of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Šrut et al. 2017). As mentioned, these and other studies highlight the use of earthworms as sentinel species in studying the ecotoxicological effects on the epigenome, and aid in formulating important questions and tasks: (1) Are the epigenetic changes causal to phenotypic alterations?; (2) The long-term persistence of transgenerationally transferred epigenetic and phenotypic alterations needs to be assessed in more detail; and (3) What are the consequences of interaction between the environment and the epigenome at the population level? (Vandegheuchte and Janssen 2014).

### **Innate Immunity, Epigenetics, and Invertebrates**

Macrophages are ancient phagocytes that are prevalent in invertebrates as well as vertebrates. Monocytes exposed to different pathogens differentiate into macrophages with various functional properties. There is compelling evidence that this differentiation process is regulated by epigenetic mechanisms (Logie and

Stunnenberg 2016). Macrophages exposed to  $\beta$ -glucan (fungal cell wall component) undergo H3K27 acetylation affecting several thousand gene enhancers. Similarly, lipopolysaccharide (LPS) or bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulation also induces such events in the promoter and enhancer regions of certain genes. Engagement of pattern recognition receptors (TLR, nucleotide oligomerization domain [NOD], scavenger receptors, etc.) is a prerequisite for microbe engulfment. Emerging data suggest that TLR expression and the downstream macrophage activation is dependent on histone deacetylation (Hennessy and McKernan 2016).

A novel concept suggests the existence of innate immune priming or innate immunological memory (also termed trained immunity) that involves epigenetic mechanisms (e.g., trimethylation of H3K4 in monocytes). These epigenetic modifications enhance intracellular activation and cytokine release and modify the cellular metabolism of monocyte/macrophage lineage (van der Meer et al. 2015). In addition, chromatin remodeling is essential to orchestrate the balance between the classically and alternatively activated macrophages (Quintin et al. 2012).

Similarly to the vertebrate counterparts, *Drosophila* macrophages (e.g., plasmatocytes) show extreme diversity in function, ranging from microbe phagocytosis to the clearance of apoptotic bodies during embryonic development. This type of activity is controlled by certain epigenetic mechanisms and is associated with immune priming (Weaver and Wood 2016). Hence, a memory component of innate immunity in insects and other invertebrates has been debated for a long time (Hauton and Smith 2007; Kvell et al. 2007; Milutinovic and Kurtz 2016).

Interestingly, host–parasite co-evolution provides solid experimental evidence for the existence of immune priming or even transgenerational immune priming (Vilcinskas 2016). In an extensive experimental set-up, the wax moth *Galleria mellonella* larvae were fed on different bacteria-containing diets. The microbe-contaminated diet induced a biased expression of immune response-related genes in various tissues (including the eggs). Proteomic analysis of the eggs revealed unique immune-related gene products similar to those in the exposed larvae. These findings were also verified in the beetle *Tribolium castaneum*. To define the mechanism of these transcriptional changes, more attention was focused on epigenetics during host–pathogen interactions. Interestingly, it seems DNA methylation events were not involved in the course of transgenerational priming (the parenteral generation was exposed to different bacteria strains), but appeared during the parasitic fungi infections. In contrast, histone deacetylation was evident in a parasitic fungi infection of *G. mellonella*, resulting in immune suppression of the host organism (and delay of larval development). As for miRNA, several small RNA species were identified and differentially expressed in the parasitic fungus-infected *G. mellonella* (Vilcinskas 2016). It seems histone modifications and miRNA biogenesis are both involved in the transgenerational immune priming.

We currently have little information concerning earthworm immunity and epigenetics; thus, this field is wide open for future studies which may generate valuable data in basic research and biomedical sciences.

## Co-evolution of Microbiota and the Immune System in Invertebrates

### Animals in a Bacterial World: The Metazoan–Microbial Holobiont

It is increasingly evident that animal biology is affected by the broad range of animal–bacterial interactions that involve shared ecosystems and symbiotic relationships. New thinking starts to prevail about fundamental questions such as: How have bacteria facilitated the origin and evolution of animals? How do animals and bacteria affect each other’s genomes and epigenomes? How does animal development depend on bacterial partners? How do animals and their symbionts maintain their homeostasis in a symbiotic relationship? And how can ecological and other approaches deepen our understanding of the different levels of animal–bacterial interaction (McFall-Ngai et al. 2013)? A new scientific field is emerging named “ecological evolutionary developmental biology” (Eco-Evo-Devo), which has the goal of incorporating the rules governing the interactions between an organism’s genes, epigenome, development (developmental plasticity), and environment (biotic and abiotic) into evolutionary theory. The metazoan host plus its persistent symbionts that form the holobiont may be considered as an important unit of evolutionary selection (Gilbert et al. 2015).

Microbial symbionts can exert multiple effects on the host, including development (e.g., induction of developmental transitions and affecting developmental plasticity), nutrition (e.g., processing and transformation of nutrients), and host protection by competition against detrimental/pathological microbes and induction of immune system maturation and modulation of immunity (Selosse et al. 2014). The immune system, in return, has evolved largely to maintain the symbiotic relationship of the host with these useful, highly diverse, and evolving microbes while protecting the host from potentially harmful microbial agents (Belkaid and Hand 2014).

### Metazoan Innate Immunity and Microbiota: Insight from *Hydra*

Cnidaria represent a sister group to Bilateria, and are divided into five classes, one of which is the Hydrozoa, which include several *Hydra* species. Symbiotic relationships between *Hydra* and photosynthetic algae have been studied for decades. More recent research has dealt with bacteria, which are important symbiotic components of the *Hydra* holobiont (Bosch 2013). These research data show that the innate immune system of the epithelium (mobile phagocytes are absent) in the *Hydra* largely determines the bacterial colonization of the epithelial surfaces. A highly conserved signaling cascade that involves TLR, MyD88, and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B is of central importance in sensing microbes. Different species of *Hydra* are associated with species-specific microbiota, which suggests that the host selectively shapes the symbiotic bacterial community and underscores the

importance of host genetic (and likely epigenetic) factors in determining microbial colonization of epithelial surfaces. Antimicrobial peptides are major effector components of the innate immune system of the *Hydra*. These peptides, in addition to protecting the host from microbial pathogens, are key regulators of the composition of microbiota that colonize the *Hydra* host. The forkhead box O (FOXO) transcription factor, which is involved in the maintenance of stem cells, might also be involved in controlling the synthesis of antimicrobial peptides, and thus could serve as a link between tissue homeostasis, the innate immune system, and composition of resident microbiota (Bosch 2013, 2014; Schröder and Bosch 2016).

## Host–Microbiota Interactions in Insects

All insects are colonized by microbiota that comprise bacterial, archaeal, and eukaryotic organisms (e.g., fungi and various unicellular eukaryotes), and viruses that impact multiple aspects of insect biology (Douglas 2015). These microorganisms can establish residence in multiple organs of the insect, including the insect exoskeleton, gut lumen, and hemocoel, and within cells of the insect. For example, the body surface of *D. melanogaster* contains ~1000 bacterial cells. The insect gut, especially the hindgut, is favorable for colonization by microorganisms. The midgut is less favorable for microbial colonization because it secretes numerous enzymes and has a heightened immune response. A pH < 3 region is present in the midgut that likely kills many microbial cells. Thus, the factor that influences the composition and abundance of insect microbiota is to a large degree the immune system of the insect, but physico-chemical conditions also play a role, as well as interactions among the colonizing microorganisms. Microbiota can modulate the insect immune system and can protect their hosts against pathogenic microbes, including viruses, bacteria, and parasitoids (Douglas 2015).

Insect viruses, especially the arthropod-borne viruses (arboviruses) such as Dengue, West Nile, Chikungunya, and others can cause disease in humans and pose a major global health burden (Jupatanakul et al. 2014). The resident microbiota of insects can potentially be exploited as modulators of insect vector competence.

Gut microbial communities have been extensively studied in social bees (Kwong and Moran 2016). The gut microbiome of honey bees (*Apis mellifera*) shows similarities to the mammalian, including human, microbiota (both are mostly composed of host-adapted, facultatively anaerobic and microaerophilic bacteria), but the microbiome of the bee gut is much simpler than the mammalian microbiota (only nine bacterial species clusters are specific to bees, and these bacteria are transmitted through social interactions between individual bees) (Kwong and Moran 2016). In addition to serving as model organisms in microbiome research, bees are also of global economic importance because they are (together with bumble bees) the main pollinators of many crops and wild flowering plants. For these reasons, studying the bee gut microbiome is of great importance.



## The Earthworm Microbiome

Earthworms are oligochaete annelids used in ecotoxicology, comparative biochemistry, physiology, regeneration, and innate immune system studies, and, more recently, studies related to the earthworm microbiome. In 2013, Dvořák and colleagues reported data on the microbial environment and its effects on innate immunity in two closely related earthworm species *E. andrei* and *E. fetida*, which inhabit different ecological niches (*E. andrei* lives in compost and manure, *E. fetida* can be found in the litter layer of forests) (Dvořák et al. 2013). Coelomic cytolytic factor (CCF; a pattern recognition protein) and lysozyme showed only slight differences in expression level and activity, whereas fetidin/lysenin expression and hemolytic activity was higher in *E. andrei* than in *E. fetida*. After exposure of *E. fetida* to compost microbiota, expression of fetidin/lysenin was not affected (the reasons for which are not well-understood). Importantly, genomic DNA analyses revealed an approximately twice as high number of fetidin/lysenin gene copies in *E. andrei* than in *E. fetida*. The authors hypothesized that *E. andrei*, by colonizing and adapting to compost as a new habitat, may have acquired an evolutionary advantage that is reflected in higher expression of antimicrobial proteins. In another study, the same group reported on the earthworm's immune defenses against infection (Dvořák et al. 2016). This latter work suggested that microorganisms are sensed by pattern recognition receptors in the gut, and this information might be transferred into the adjacent mesenchymal lining that contains precursors to coelomocytes (Dvořák et al. 2016).

Liu et al. carried out a comparative study of gut microbiota of earthworms (*E. fetida*) that were fed in three different substrates: nutrient-poor soil, mineral soil, or organic-rich compost soil (Liu et al. 2017). High-throughput sequencing was used to characterize the earthworm gut microbes. Data showed that the microbial community in the earthworm gut was dominated by microbial taxa Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Chloroflexi, and Bacteroidetes. There was a core microbial community in the earthworms' gut, but the total gut microbial composition differed between substrates. Proteobacteria and Bacteroidetes were more abundant in earthworms kept on organic-poor substrates than in the gut of earthworms kept in organic-rich compost soil. It was postulated that these bacteria may help earthworms survive in a nutrient-poor environment. In an unrelated study using *E. andrei* earthworms, we analyzed the microorganisms on the body surface and in the coelomic cavity and have identified numerous microbes (Table 1). Interestingly, despite the use of different species, different anatomic sites, and different environments, there was a partial overlap between the microbial species identified by Liu et al. (2017) and those identified in our study (Table 1) (overlapping microbes were *Acinetobacter* and *Aeromonas*). Procházková et al. studied the activity of digestive enzymes and non-self recognition in the gut of *E. andrei* earthworms. They showed a correlation between expression of CCF, lysozyme, and other enzyme activities in the gut of earthworms, following a challenge with various microbes. The data suggested that enzymes that play important roles in molecular pattern recognition and effector pathways are modulated during microbial challenge.

**Table 1** Isolated microorganisms from *Eisenia andrei* earthworms

Body surface	Coelomic cavity
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Aeromonas media</i>	<i>Aeromonas media</i>
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
	<i>Comamonas testosteroni</i>
	<i>Comamonas aquatica</i>

Laminarinase ( $\beta$ -glucanase) and glucosaminidase activities were increased in addition to upregulation of CCF and lysozyme expression (Procházková et al. 2013).

Another study reported that *L. terrestris* earthworms fed a crystalline cellulose diet had a longer lifespan than high energy-fed earthworms (Rudi and Strætkvern 2012). Further, independent of the feeding regimen, earthworms that contained Ferrimonadaceae bacteria showed an increased lifespan.

Finally, it should be noted that in addition to the exciting research summarized herein, network-based analytical approaches are starting to be used to disentangle and better understand the interactions between the microbiome and the host that comprise the holobiont, as well as to reveal the complex interactions within the polymicrobial microbiome (Layeghifard et al. 2017).

---

## Regeneration, Immunity, and Earthworms

### About Regeneration: A Concise Introduction

Since the pioneering observations of Abraham Trembley, Charles Bonnet, and Lazzaro Spallanzani, studies on animal regeneration have been extensively reported (Dinsmore 2001). Indeed, the mystery of restoration mechanisms was what excited Thomas Hunt Morgan most in his early scientific career (Morgan 1901). He also determined the ways that the injured body parts are regenerated in various organisms (earthworms, fish, and tadpoles). Organs and tissues are restored by a regeneration process called epimorphosis. During this type of regeneration, stem cells/progenitor cells (named neoblasts in some model species) become activated, proliferate, and form a regenerating blastema. Subsequently, this blastema differentiates into an emerging bud to form the restored body parts. Additionally, other regenerating mechanisms such as morphallaxis are also involved in the body restoration. In this case, intact cells reorganize the injured tissue or severed organ/organism without stem cell involvement and proliferation (Mainschein 2011). According to the recent literature, morphallaxis operates mainly in invertebrates, while epimorphosis exists in both invertebrate and vertebrate species. Surprisingly, there is a strong variation in the regeneration capacities even within closely related species. For instance,

annelids, like many other invertebrate animals, are able to replace lost body parts (segments) by regeneration (Dinsmore 2001). However, this ability is prominent in certain annelid species but not in others; for example, leeches do not regenerate their lost segments. Most of the *Oligochaeta* earthworms can regenerate both anterior and posterior body parts (Bely 2006).

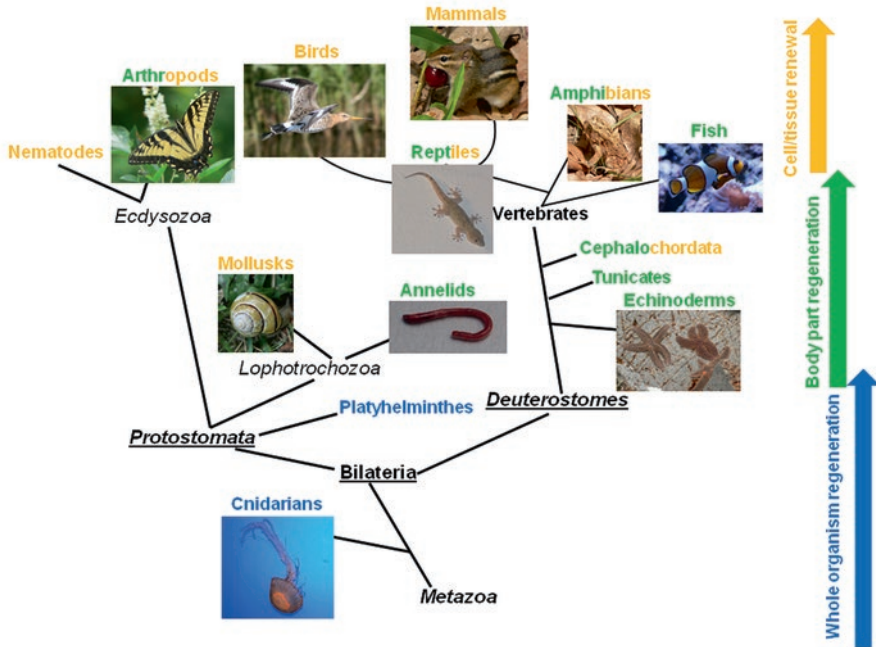
On the other hand, regeneration is considered to be an alternative process of development because both regeneration and development are terminated at the same endpoint; the adult body plan will be built or restored. Until recently, only a few studies tried to directly compare regeneration with embryogenesis, but it is unlikely that there are distinct programs between these two biological processes (Myohara 2004; Zattara and Bely 2011). For better understanding of these mechanisms, additional molecular biological approaches need to be carried out.

Indeed, multicellular organisms have variable regenerative capacity. Considering the ancestries of regeneration it is frequently noted that in some invertebrates the capability to reproduce asexually is tightly combined with regeneration. It seems that restorations of certain injured body parts (e.g., limbs and eyes) are restricted in the course of evolution (Fig. 3).

## Regenerative Capacity and Immune Response

Interdependency of inflammation and regenerative capacity dates back to some invertebrates appearing early in phylogeny. Recent data claim that regeneration of injured body parts in various organisms is inversely correlated to the complexity of their immune response (Eming et al. 2007; Godwin et al. 2013). One of the first clues on the crosstalk between regeneration and immunity was derived from the lens restoration process of newts (Godwin and Brockes 2006); in a specialized sequence of events (so-called transdifferentiation), the dorsal iris cells mediate the replacement of the damaged lens. Additionally, the immune response is triggered by a damaged lens structure. On the other hand, fin regeneration in zebrafish is not dependent on the recruitment of inflammatory cells (e.g., neutrophils and macrophages) to the site of injury (Mathew et al. 2007). Upon injury, the host immune response not only defends against infections, but facilitates the removal of cellular debris at the site of the wound. Among tailed Amniotes, only lizards are able to regenerate their tail; in contrast, their removed limbs are passed into a scar or tail-like outgrowths. Transcriptome analyses revealed strong downregulation of immunoglobulin and surface B and T receptor genes in the tail blastema of *Podarcis muralis*. In contrast, upregulation of inflammatory genes was observed in the limb blastema. It is probable that the regenerating tail demands immune suppression. The development of adaptive immunity is hypothesized to induce scarring instead of the regeneration process, which might be a significant obstacle to tissue regeneration in higher vertebrates (Vitulo et al. 2017).

Despite its vital importance in physiology, the positive, negative, or neutral mechanisms that orchestrate the regeneration process and the immune response are poorly understood.



**Fig. 3** Schematic illustration of the regenerative capacity in a phylogenetic tree of various invertebrate and vertebrate phyla. Distinct organisms have different regeneration capacities, ranging from whole-body regeneration to cell renewal, which is illustrated by the different colors in the animal groups according to available publications. Photographic images show the representatives of various animal groups: cnidarians (*Chrysaora fuscescens*), mollusks (*Cepea nemoralis*), annelids (*Eisenia andrei*), arthropods (*Papilio glaucus*), echinoderms (*Asterias vulgaris*), fish (*Amphiprion ocellaris*), amphibians (*Bufo americanus*), reptiles (*Tarentola mauritanica*), birds (*Limosa limosa*), and mammals (*Tamias striatus*). (All images were taken by Péter Engelmann except for *Tarentola mauritanica*, which was captured and provided generously by Mariann Szabó)

## Earthworm Regeneration

Earthworms have enormous ability to regenerate their lost/injured body segments (Liebmann 1943). Interestingly, the ability to restore body segments is present in certain annelid groups, while it is limited in others such as leeches (Bely 2006). In the course of evolution, earthworms have probably acquired this regeneration capacity because of their high likeliness to be attacked by natural predators resulting in the injury or loss of body segments. The regeneration process depends on numerous factors such as ambient conditions, nourishment, and developmental stages as well as the position and/or numbers of segments that are removed. It seems that regeneration of anterior segments is significantly limited as more segments are abolished. For instance, *E. fetida* is not capable of anterior regeneration if more than 20 segments are amputated (removed) (Berrill 1952). In addition, in contrast to the

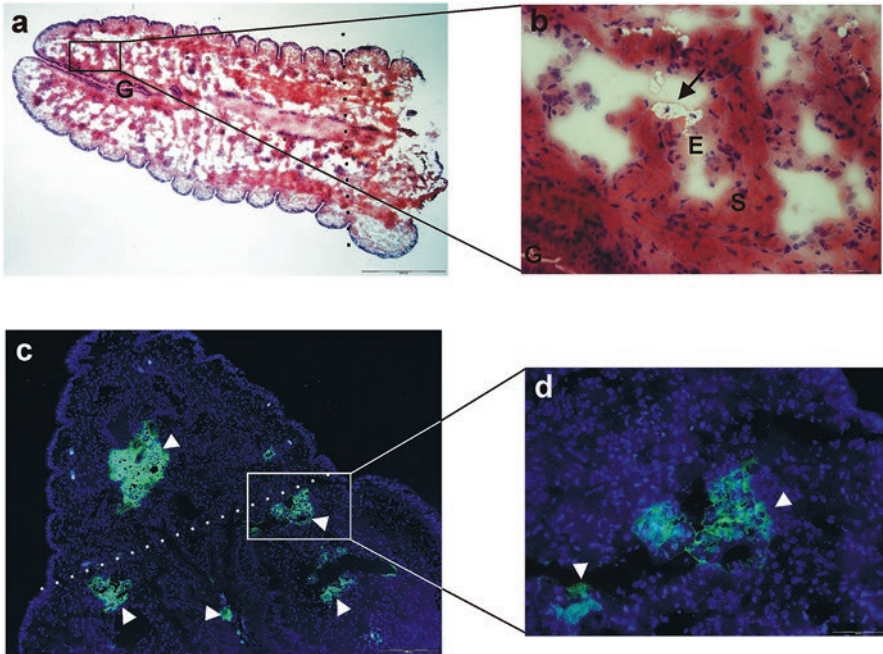
anterior body parts, posterior regeneration is a robust and almost universal process in various annelid groups. Moreover, during anterior regeneration, the survival rate of regenerating earthworms is dramatically reduced if the cerebral ganglion is involved in the injured/lost segments (Xiao et al. 2011).

Generally, the newly produced segments are regenerated by epimorphosis. During this process stem cells/progenitor cells (e.g., neoblasts) are activated and form a regenerating blastema. Subsequently, this blastema turns into an emerging bud to form a new segment either at the head or tail part. Interestingly, other regenerating mechanisms such as morphallaxis are also involved in the body restoration. In this case, the intact cells reorganize the body segment without stem cell involvement (Zoran 2010). Molecular aspects of regeneration are largely unexplored in oligochaete annelids. Most of the molecular data (e.g., *hox* and *hedgehog* genes) are derived from regeneration experiments involving *Platynereis* polychaete and *Pristina* naidid annelid species (Nyberg et al. 2012; Tessmar-Raible and Arendt 2003).

## Immune Response During the Course of Earthworm Regeneration

It has long been known that coelomocytes participate in the regeneration and wound healing of injured earthworms (Liebmann 1943). Following tissue transplantation, phagocytic coelomocytes migrate into the injured tissue and eliminate damaged epithelial and muscle cells during wound healing (Cooper and Roch 1984). Moreover, it is speculated that migrating coelomocytes have supporting functions providing hormones, nutritive factors, and growth factors for the regenerating segments (Jamieson 1981; Somogyi et al. 2009). However, this hypothesis has been challenged by arguing that coelomocyte deprivation did not affect the kinetics of segmental regeneration (Moment 1974). This discrepancy might be solved if we consider not only the restoration of the segments but also the organ-specific regeneration. Straightforward experiments proved that immune cells actively participate in the regeneration of the crustacean central nervous system (Chaves da Silva et al. 2013). In addition, we now know that production of certain antimicrobial factors (theromacin, neuromacin, lumbricin) can also enhance the restoration of injured axons in the leech *Hirudo medicinalis* (Schikorski et al. 2008). Recent experiments demonstrated that coelomocyte depletion could significantly delay the restoration process of the cerebral ganglion in *Dendrobaena veneta* (Molnar et al. 2015; Okrzesik et al. 2013). These findings underline the possible involvement of coelomocytes in tissue regeneration.

According to our recent preliminary observations, regenerated segments (Fig. 4a) are abundant in certain types of coelomocytes (Fig. 4b). Coelomocytes are frequent in the lacunae of the regenerating blastema and in the neighboring intact segments; however, coelomocytes are less frequent in the appropriate location of intact animals. Immunostaining with the a-EFCC5 mAb (lysenin-specific) has revealed that these coelomocytes are mostly lysenin-producing eleocytes (Fig. 4c, d). Whether the role of lysenin-producing cells is related to the clearance of apoptotic



**Fig. 4** Parasagittal sections of regenerating blastema in *Eisenia andrei* earthworms. (a) Hematoxylin-eosin staining of 2-week-old regenerating blastema. (b) Inset representing a larger magnification of the parasagittal section where eleocytes (arrow) are evidently present in the newly developed segments. Immunofluorescence analysis (c, d) using a lysenin-specific a-EFCC5 monoclonal antibody (fluorescein isothiocyanate [FITC] conjugated) shows that the lysenin-rich eleocytes (arrowheads) are abundant in the regenerating segments. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) counterstain was used. The dotted line marks the beginning of intact segments. Scale bars: 1000  $\mu\text{m}$  (a), 100  $\mu\text{m}$  (b), 200  $\mu\text{m}$  (c), and 50  $\mu\text{m}$  (d). E eleocytes, G gut, M metanephridium, S septum

cells and/or the immune response against injury-related infections is a matter of debate and could be addressed with a new set of experiments.

Future research in this field may shed more mechanistic insights into the possible involvement of coelomocyte subpopulations in the earthworm regeneration process.

## Conclusions and Perspectives

In this chapter we have given a short overview of the advances and interconnectedness of various fields of research on the innate immune system, transcriptomics, epigenetics, microbiota, and regeneration in invertebrate organisms, focusing on earthworms. It is becoming clear that in the “omics” era new and important questions can be addressed both on the evolutionary scale (e.g., role of microbiota in the emergence of innate immunity) and processes occurring on shorter time scales (e.g., regeneration). Invertebrate model organisms continue to yield valuable data in these

fast-advancing fields of research. Earthworms are also increasingly studied as sentinel organisms in the context of ecotoxicology and effects of soil pollution on the epigenome. A highly complex network of epigenetic modifications plays fundamental roles in the development and immunity in various organisms from worms to humans, which are viewed as holobionts of host organisms and symbiotic microbiota. Finally, this chapter summarizes the current state of research of earthworm (and invertebrate) immunity, but the “Quo vadis?” of this field is only just becoming discernible. We expect that the main directions for future research will likely be determined, in part, by the currently available data and the “omics” methodologies that are becoming more powerful, as well as by the application of “network science”, which will help in integrating the current and future research data, thus revealing new horizons in this exciting field.

**Acknowledgments** We acknowledge the financial support of Medical School Research Foundation, University of Pécs (PTE-ÁOK-KA 2017/04), the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (PE). We are grateful to Krisztina Kovács (Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs, Hungary) for providing her skill and expertise in identification of the isolated microorganisms. The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

---

## References

- Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV et al (2012) Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 11:384–400
- Belkaid Y, Hand TW (2014) Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 157:121–141
- Bely AE (2006) Distribution of segment regeneration ability in the Annelida. *Integr Comp Biol* 46:508–518
- Berrill NJ (1952) Regeneration and budding in worms. *Biol Rev* 27:401–438
- Beschin A, Bilej M, Brys L et al (1999) Convergent evolution of cytokines. *Nature* 400:627–628
- Bilej M, Procházková P, Silerová M et al (2010) Earthworm immunity. *Adv Exp Med Biol* 708:66–79
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6–21
- Bosch TC (2013) Cnidarian-microbe interactions and the origin of innate immunity in metazoans. *Annu Rev Microbiol* 67:499–518
- Bosch TC (2014) Rethinking the role of immunity: lessons from *Hydra*. *Trends Immunol* 35:495–502
- Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C et al (2006) Cloning and real time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. *Env. Sci Technol* 40:2844–2850
- Brulle F, Morgan AJ, Cocquerelle C et al (2010) Transcriptomic underpinning of toxicant-mediated physiological function alterations in three terrestrial invertebrate taxa: a review. *Environ Pollut* 158:2793–2808
- Campos EI, Reinberg D (2009) Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 43:559–599
- Castanotto D, Rossi JJ (2009) The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 457:426–433
- Chaves da Silva PG, Corrêa CL, de Carvalho SL et al (2013) The crustacean central nervous system in focus: subacute neurodegeneration induces a specific innate immune response. *PLoS One* 8:e80896

- Cooper EL, Balamurugan M (2010) Unearthing a source of medicinal molecules. *Drug Discov Today* 15:966–972
- Cooper EL, Hirabayashi K (2013) Origin of innate immune responses: revelation of food and medicinal applications. *J Tradit Complement Med* 3:204–212
- Cooper EL, Roch P (1984) Earthworm leukocyte interactions during early stages of graft rejection. *J Exp Zool* 232:67–72
- Cooper EL, Kauschke E, Cossarizza A (2002) Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *BioEssays* 24:319–333
- Cooper EL, Kvell K, Engelmann P et al (2006) Still waiting for the Toll? *Immunol Lett* 104:16–28
- Cossarizza A, Cooper EL, Suzuki MM et al (1996) Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines. *Exp Cell Res* 224:174–182
- Darwin CR (1881) *The formation of vegetable mould, through the action of worms*. Murray J, London
- de Eguileor M, Grimaldi A, Tettamanti G et al (2000) Lipopolysaccharide-dependent induction of leech leukocytes that cross-react with vertebrate cellular differentiation markers. *Tissue Cell* 32:437–445
- Dinsmore CE (2001) Regeneration: principles. In: *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. Wiley, Chichester. <http://www.els.net>. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001112>
- Douglas AE (2015) Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu Rev Entomol* 60:17–34
- Dvořák J, Mančíková V, Pižl V et al (2013) Microbial environment affects innate immunity in two closely related earthworm species *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida*. *PLoS One* 8:e79257
- Dvořák J, Roubalová R, Procházková P et al (2016) Sensing microorganisms in the gut triggers the immune response in *Eisenia andrei* earthworms. *Dev Comp Immunol* 57:67–74
- Elsworth B, Jones M, Blaxter M (2013) Badger—an accessible genome exploration environment. *Bioinformatics* 29:2788–2789
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM (2007) Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127:514–525
- Engelmann P, Pál J, Berki T et al (2002) Earthworm leukocytes reacted with different mammalian antigen specific monoclonal antibodies. *Zoology* 105:257–265
- Engelmann P, Kiss J, Csöngéi V et al (2004) Earthworm leukocytes kill HeLa, HEp-2, PC-12 and PA317 cells in vitro. *J Biochem Biophys Methods* 61:215–227
- Engelmann P, Cooper EL, Németh P (2005a) Anticipating innate immunity without a Toll. *Mol Immunol* 42:931–942
- Engelmann P, Pálkás L, Cooper EL et al (2005b) Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Dev Comp Immunol* 29:599–614
- Engelmann P, Cooper EL, Opper B, Németh P (2011) Earthworm innate immune system. In: Karaca A (ed) *Biology of earthworms*. *Soil Biology* 24. Springer, Berlin/Heidelberg, pp 229–245
- Engelmann P, Hayashi Y, Bodó K et al (2016a) New aspects of earthworm innate immunity: novel molecules and old proteins with unexpected functions. In: Ballarin L, Cammarata M (eds) *Lessons in immunity: from single cell organisms to mammals*. Elsevier-Academic Press, New York/Amsterdam, pp 53–66
- Engelmann P, Hayashi Y, Bodó K et al (2016b) Phenotypic and functional characterization of earthworm coelomocytes: linking light scatter-based cell typing and imaging of the sorted populations. *Dev Comp Immunol* 65:41–52
- Fischer E (1977) The function of chloragosomes, the specific age-pigment granules of annelids – a review. *Exp Gerontol* 12:69–74
- Fischer E, Molnár L (1992) Environmental aspects of the chloragogenous tissue of earthworms. *Soil Biol Biochem* 24:1723–1727
- Follert P, Cremer H, Béclin C (2014) MicroRNAs in brain development and function: a matter of flexibility and stability. *Front Mol Neurosci* 7:5
- Fuller-Espie SL (2010) Using flow cytometry to measure phagocytic uptake in earthworms. *J Microbiol Biol Educ* 11:144–151



- Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E et al (2011) Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:36–47
- Gilbert SF, Bosch TC, Ledón-Rettig C (2015) Eco-Evo-Devo: developmental symbiosis and developmental plasticity as evolutionary agents. *Nat Rev Genet* 16:611–622
- Godwin JW, Brockes JP (2006) Regeneration, tissue injury and the immune response. *J Anat* 209:423–432
- Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA (2013) Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:9415–9420
- Gomes AQ, Nolasco S, Soares H (2013) Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *Int J Mol Sci* 14:16010–16039
- Gong P, Perkins EJ (2016) Earthworm toxicogenomics: a renewed genome-wide quest for novel biomarkers and mechanistic insights. *Appl Soil Ecol* 104:12–24
- Gong P, Guan X, Inouye LS et al (2008) Transcriptomic analysis of RDX and TNT interactive sublethal effects in the earthworm *Eisenia fetida*. *BMC Genomics* 9:S15
- Gong P, Xie F, Zhang B et al (2010) In silico identification of conserved microRNAs and their target transcripts from expressed sequence tags of three earthworm species. *Comput Biol Chem* 34:313–319
- Greer EL, Shi Y (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 13:343–357
- Hauton C, Smith VJ (2007) Adaptive immunity in invertebrate: a straw house without a mechanistic foundation. *BioEssays* 29:1138–1146
- Hayashi Y, Engelmann P (2013) Earthworm's immunity in the nanomaterial world: new room, future challenges. *Invertebr Surv J* 10:69–76
- Hayashi Y, Engelmann P, Foldbjerg R et al (2012) Earthworms and humans in vitro: characterizing evolutionarily conserved stress and immune responses to silver nanoparticles. *Environ Sci Technol* 46:4166–4173
- Hayashi Y, Miclaus T, Scavenius C et al (2013) Species differences take shape at nanoparticles protein corona made of native repertoire assists cellular interaction. *Environ Sci Technol* 47:14367–14375
- Hayashi Y, Miclaus T, Engelmann P et al (2016) Nanosilver pathophysiology in earthworms: transcriptional profiling of secretory proteins and the implication for the protein corona. *Nanotoxicology* 10:303–311
- Hennessy C, McKernan DP (2016) Epigenetics and innate immunity: the 'unTolld' story. *Immunol Cell Biol* 94:631–639
- Homa J, Zorksa A, Wesolowski D, Chadzinska M (2013) Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of *Eisenia andrei*. *J Comp Physiol B* 183:313–322
- Huang XM, Tian QN, Bao ZX et al (2012) Cloning and identification of microRNAs in earthworm (*Eisenia fetida*). *Biochem Genet* 50:1–11
- Jamieson BGM (1981) Chloragocytes. In: Jamieson BGM (ed) *The ultrastructure of the oligochaete*. Academic Press, New York, pp 96–118
- Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G (2014) The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Virus* 6:4294–4313
- Kauschke E, Komiyama K, Moro I et al (2001) Evidence for perforin-like activity associated with earthworm leukocytes. *Zoology* 104:13–24
- Kobayashi H, Ohta N, Umeda M (2004) Biology of lysenin, a protein in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Int Rev Cytol* 236:45–99
- Kosik KS (2009) MicroRNAs tell an evo-devo story. *Nat Rev Neurosci* 10:754–759
- Kvell K, Cooper EL, Engelmann P et al (2007) Blurring borders: innate immunity with adaptive features. *Clin Dev Immunol* 2007:83671
- Kwong WK, Moran NA (2016) Gut microbial communities of social bees. *Nat Rev Microbiol* 14:374–384

- Lassegues M, Milochau A, Doignon F et al (1997) Sequence and expression of an *Eisenia fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40 kDa fetidin antibacterial protein. *Eur J Biochem* 246:756–762
- Layeghifard M, Hwang DM, Guttman DS (2017) Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective. *Trends Microbiol* 25:217–228
- Liebmann E (1942) The coelomocytes of Lumbricidae. *J Morphol* 71:221–249
- Liebmann E (1943) New light on regeneration of *Eisenia foetida* (SAV). *J Morphol* 73:583–610
- Liu D, Lian B, Wu C et al (2017) A comparative study of gut microbiota profiles of earthworms fed in three different substrates. *Symbiosis* 74:21–29
- Logie C, Stunnenberg HG (2016) Epigenetic memory: a macrophage perspective. *Semin Immunol* 28:359–367
- Luo GZ, He C (2017) DNA N(6)-methyladenine in metazoans: functional epigenetic mark or bystander? *Nat Struct Mol Biol* 24:503–506
- Mácsik LL, Somogyi I, Opper B et al (2015) Induction of apoptosis-like cell death by coelomocyte extracts from *Eisenia andrei* earthworms. *Mol Immunol* 67:213–222
- Mainschein J (2011) Regenerative medicine's historical roots in regeneration, transplantation and translation. *Dev Biol* 358:278–284
- Mathew LK, Sengupta S, Kawakami A et al (2007) Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *J Biol Chem* 282:35202–35210
- McFall-Ngai M, Hadfield MG, Bosch TC et al (2013) Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:3229–3236
- Mehta A, Baltimore D (2016) MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat Rev Immunol* 16:279–294
- Mikami Y, Fukushima A, Kuwada-Kusunose T et al (2015) Whole transcriptome analysis using next-generation sequencing of sterile-cultured *Eisenia andrei* for immune system research. *PLoS One* 10:e0118587
- Mill PJ (1978) Physiology of annelids. Academic Press, London
- Milutinović B, Kurtz J (2016) Immune memory in invertebrates. *Semin Immunol* 28:328–342
- Molnar L, Pollak E, Skopek Z et al (2015) Immune system participates in brain regeneration and restoration of reproduction in the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Dev Comp Immunol* 52:269–279
- Moment GB (1974) The possible roles of coelomic cells and their yellow pigment in annelid regeneration and aging. *Growth* 38:209–218
- Morgan TH (1901) Regeneration. Macmillan, New York
- Myohara M (2004) Differential tissue development during embryogenesis and regeneration in an annelid. *Dev Dyn* 231:349–358
- Nyberg KG, Conte MA, Kostyun JL et al (2012) Transcriptome characterization via 454 pyrosequencing of the annelid *Pristina leidyi*, an emerging model for studying the evolution of regeneration. *BMC Genomics* 13:287
- OECD (1984) Guideline for testing chemicals. OECD, Paris
- OECD (2004) Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD, Paris
- Okresik J, Kachamakova-Trojanowska N, Jozkowicz A et al (2013) Reversible inhibition of reproduction during regeneration of cerebral ganglia and coelomocytes in the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Invertebr Surv J* 10:151–161
- Opper B, Bognár A, Heidt D et al (2013) Revising lysenin expression of earthworm coelomocytes. *Dev Comp Immunol* 39:214–218
- Parrinello N, Vizzini A, Arizza V et al (2008) Enhanced expression of a cloned and sequenced *Ciona intestinalis* TNF alpha-like (CiTNF alpha) gene during the LPS-induced inflammatory response. *Cell Tissue Res* 334:305–317
- Pecot CV, Calin GA, Coleman RL et al (2011) RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer* 11:59–67
- Pirooznia M, Gong P, Guan X et al (2007) Cloning, analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the earthworm *Eisenia fetida*. *BMC Bioinformatics* 8:S7

- Plytycz B, Kielbasa E, Grebosz A et al (2010) Riboflavin mobilization from eleocyte stores in the earthworm *Dendrodrilus rubidus* inhabiting aerially-contaminated Ni smelter soil. *Chemosphere* 81:199–205
- Procházková P, Šustr V, Dvořák J et al (2013) Correlation between the activity of digestive enzymes and nonself recognition in the gut of *Eisenia andrei* earthworms. *J Invertebr Pathol* 114:217–221
- Quintin J, Saeed S, Martens JHA et al (2012) *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* 12:223–232
- Roch P (1979) Leukocyte DNA synthesis in grafted Lumbricids: and approach to study histocompatibility in invertebrates. *Dev Comp Immunol* 3:417–428
- Rosa D (1896) I Linfociti degli Oljgocheti. *Mem R Ace Tor* 46:149–172
- Rudi K, Straetkvern KO (2012) Correlations between *Lumbricus terrestris* survival and gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis* 23:17316
- Santoyo MM, Flores CR, Torres AL et al (2011) Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments. *Environ Pollut* 159:2387–2392
- Schikorski D, Cuvillier-Hot V, Leippe M et al (2008) Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *J Immunol* 181:1083–1095
- Schröder K, Bosch TC (2016) The origin of mucosal immunity: lessons from the holobiont *Hydra*. *MBio* 7:e01184-16
- Self-Fordham JB, Naqvi AR, Uttamani JR et al (2017) MicroRNA: dynamic regulators of macrophage polarization and plasticity. *Front Immunol* 8:1062
- Selosse MA, Bessis A, Pozo MJ (2014) Microbial priming of plant and animal immunity: symbionts as developmental signals. *Trends Microbiol* 22:607–613
- Silverstein AM (2001) History of immunology. In: *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. Wiley, Chichester. <http://www.els.net>. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003078>
- Somogyi I, Boros A, Engelmann P et al (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like compounds could modulate the activity of coelomocytes in the earthworm. *Ann N Y Acad Sci* 1163:521–523
- Šrut M, Drechsel V, Höckner M (2017) Low levels of Cd induce persisting epigenetic modifications and acclimation mechanisms in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *PLoS One* 12:e0176047
- Stein EA, Avtalion RR, Cooper EL (1977) The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. *J Morphol* 153:467–477
- Stürzenbaum SR, Georgiev O, Morgan AJ et al (2004) Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells. *Env. Sci Technol* 38:6283–6289
- Stürzenbaum SR, Andre J, Kille P et al (2009) Earthworm genome, genes and proteins: the (re) discovery of Darwin's worms. *Proc R Soc B* 276:789–797
- Sun Y, Zhou Z, Wang L et al (2014) The immunomodulation of a novel tumor necrosis factor (*Cg*TNF-1) in oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 45:291–299
- Tak ES, Cho SJ, Park SC (2015) Gene expression profiling of coelomic cells and discovery of immune-related genes in the earthworm, *Eisenia andrei*, using expressed sequence tags. *Biosci Biotechnol Biochem* 79:367–373
- Tessmar-Raible K, Arendt D (2003) Emerging systems: between vertebrates and arthropods, the Lophotrochozoa. *Curr Opin Genet Dev* 13:331–340
- Thunders M, Cavanagh J, Li Y (2017) De novo transcriptome assembly, functional annotation and differential gene expression analysis of juvenile and adult *E. fetida*, a model oligochaete used in ecotoxicological studies. *Biol Res* 50:7
- Valembis P, Roch P, Lasségues M et al (1982) Antibacterial activity of the haemolytic system from the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *J Invertebr Pathol* 40:21–27
- van der Meer JW, Joosten LAB, Riksen N et al (2015) Trained immunity: a smart way to enhance innate immune defence. *Mol Immunol* 68:40–44
- Van Straalen NM, Roelofs D (2008) Genomics technology for assessing soil pollution. *J. Biology* 7:19

- Vandegehuchte MB, Janssen CR (2014) Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 764-765:36–45
- Velki M, Ečimović S (2017) Important issues in ecotoxicological investigations using earthworms. *Rev Environ Contam Toxicol* 239:157–184
- Vilcinskas A (2016) The role of epigenetics in host-parasite coevolution: lessons from the model insects *Galleria mellonella* and *Tribolium castaneum*. *Zoology* 119:273–280
- Vitulo N, Dalla Valle L et al (2017) Downregulation of lizard immuno-genes in the regenerating tail and myogenes in the scarring limb suggests that tail regeneration occurs in an immuno-privileged organ. *Protoplasma* 254:2127–2141
- Weaver H, Wood W (2016) Creating a buzz about macrophages: the fly as an vivo model for studying immune cell behaviour. *Dev Cell* 38:129–132
- Wiens GD, Glenney GW (2011) Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Dev Comp Immunol* 35:1324–1335
- Wilhelm M, Koza A, Engelmann P et al (2006) Evidence for the presence of thyroid-stimulating hormone, thyroglobulin and their receptors in *Eisenia fetida*: a multilevel hormonal interface between the nervous system and the peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 324:535–546
- Xiao N, Ge F, Edwards CA (2011) The regeneration capacity of an earthworms *Eisenia fetida*, in relation to the site of amputation along the body. *Acta Ecol Sin* 31:197–204
- Zattara EE, Bely AE (2011) Evolution and novel developmental trajectory: fission is distinct from regeneration in the annelid *Pristina leidyi*. *Evol Dev* 13:80–95
- Zoran MJ (2010) Regeneration in Annelids. In: *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. Wiley, Chichester. <http://www.els.net>. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022103>
- Zwarycz AS, Nossa CW, Putnam NH et al (2015) Timing and scope of genomic expansion within annelida: evidence from homeoboxes in the genome of the earthworm *Eisenia fetida*. *Genome Biol Evol* 8:271–281



Environmental  
Science  
Nano

**SPECIES-SPECIFIC SENSITIVITY TOWARDS NOBLE METAL  
NANOPARTICLES: A MULTIPARAMETRIC IN VITRO STUDY  
OF OECD STANDARD SOIL SENTINELS**

Journal:	<i>Environmental Science: Nano</i>
Manuscript ID	EN-ART-12-2019-001405
Article Type:	Paper

SCHOLARONE™  
Manuscripts



UNIVERSITY OF PÉCS

Clinical Center

Department of Immunology and Biotechnology

Pécs, Szigeti út 12., 7643

Tel: +36-72-536-288, Fax: (72)-536-289

E-mail: [engelmann.peter@pte.hu](mailto:engelmann.peter@pte.hu) Web: [www.immbio.hu](http://www.immbio.hu)

## Cover letter

Prof. Dr. Iseult Lynch

Pécs, 10<sup>th</sup> of December 2019*Environmental Science: Nano*

Editor

Dear Professor Lynch,

Hereby, my colleagues and I respectfully enclose for your consideration a “*full paper*” research article entitled as “*Species-specific sensitivity towards noble metal nanoparticles: a multiparametric in vitro study of OECD standard soil sentinels*”.

We report here several novel findings, which - we believe - are of interest to your readers. Previously we observed conserved molecular and cellular responses between invertebrate and vertebrate immune cells to silver nanoparticles. Now, we compared the biological interactions of immune cells from two-closely related earthworm species and 10 nm noble metal (silver and gold) nanoparticles at molecular and cellular levels *in vitro*.

This manuscript has not been submitted, accepted or published for publication elsewhere. Also, there is no financial or other relationship that might lead to a conflict of interest. All authors have seen and approved the final version of the manuscript and have contributed significantly to the work. All authors have agreed to the submission.

We hope our work meets the standard of the *Environmental Science: Nano* journal and after reviewing it would be considered for publication.

Thank you for your kind consideration.

Sincerely Yours,

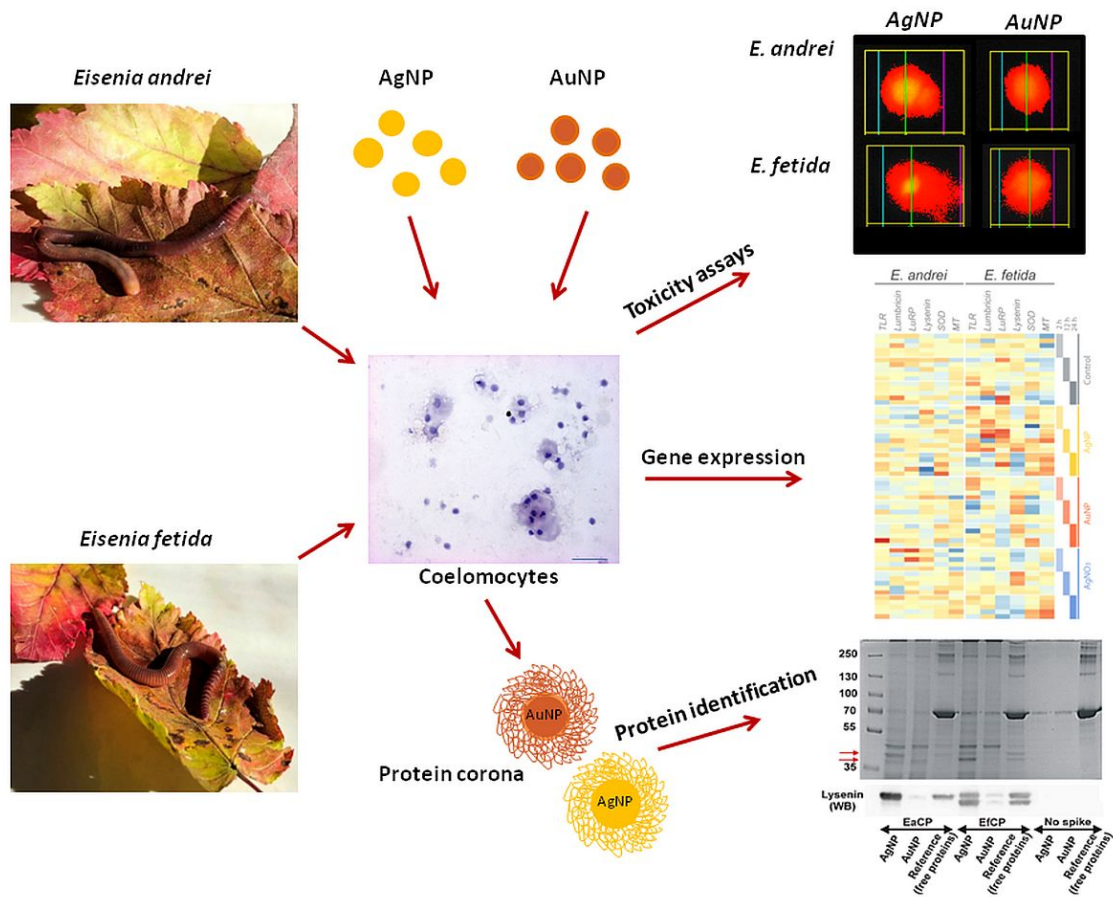
Péter Engelmann

### Environmental significance statement

Silver and gold nanoparticle-based products have been broadly utilized in both commercial and biomedical fields, and their potential ecotoxicological impacts should be further considered. In particular, harmful effects on the immune systems may result in an undesirable physiological consequence of the exposed organisms. Using macrophage-like cells (coelomocytes) separately harvested from two closely-related *Eisenia* species of earthworms, we compared their biological responses to silver/gold nanoparticles at molecular and cellular levels. Our *in vitro* findings reinforce the existence of species-specific responses towards nanoparticles, which may influence the organism's susceptibility. As nanoparticles behave differently from classical environmental contaminants, additional concerns should be given for species extrapolation from ecotoxicological models to higher or even closely related organisms.

ToC Entry

This study is focused on the remarkable sensitivity differences of immune cells from two closely related earthworm species (*Eisenia andrei* and *E. fetida*) towards noble metal nanomaterials at cellular and molecular levels.





1  
2  
3 **SPECIES-SPECIFIC SENSITIVITY TOWARDS NOBLE METAL**  
4 **NANOPARTICLES: A MULTIPARAMETRIC *IN VITRO* STUDY OF OECD**  
5 **STANDARD SOIL SENTINELS**  
6

7  
8 Kornélia Bodó<sup>1</sup>, Yuya Hayashi<sup>2</sup>, Gellért Gerencsér<sup>3</sup>, Zoltán László<sup>4</sup>, Albert Kéri<sup>5,6</sup>, Gábor  
9 Galbács<sup>5,6</sup>, Elek Telek<sup>7</sup>, Mária Mészáros<sup>8</sup>, Mária A. Deli<sup>8,9</sup>, Gréta Tolnai<sup>1</sup>, Bohdana  
10 Kokhanyuk<sup>1</sup>, Péter Németh<sup>1</sup>, Péter Engelmann<sup>1,\*</sup>  
11  
12

13  
14 <sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Medical School, University  
15 of Pécs, Pécs, Hungary  
16

17 <sup>2</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark  
18

19 <sup>3</sup>Department of Public Health Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary  
20

21 <sup>4</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs,  
22 Pécs, Hungary  
23

24 <sup>5</sup>Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Science and Informatics,  
25 University of Szeged, Szeged, Hungary  
26

27 <sup>6</sup>Department of Material Science, Interdisciplinary Excellence Center, University of Szeged,  
28 Szeged, Hungary  
29

30 <sup>7</sup>Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary  
31

32 <sup>8</sup>Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Szeged, Hungary  
33

34 <sup>9</sup>Department of Cell Biology and Molecular Medicine, University of Szeged, Szeged,  
35 Hungary  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51 **\*Corresponding author:**

52  
53 Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Medical School, University  
54 of Pécs, Pécs, H-7643, Szigeti u. 12, Hungary. Tel: + 36-72-536-288, Fax: + 36-72-536-289,  
55  
56 email: [engelmann.peter@pte.hu](mailto:engelmann.peter@pte.hu)  
57  
58  
59  
60

## Abstract

Two closely-related earthworm species have long been used as model organisms in ecotoxicology. The same nanoparticles (NPs) may affect the two species differently, not only because of the inherent differences in susceptibility but also due to how immune system could recognize NPs. In a comparative approach using *Eisenia andrei* and *E. fetida*, we study various immune-related parameters of earthworm coelomocytes following *in vitro* exposure to 10 nm NPs (silver, Ag; and gold, Au) or dissolved Ag (AgNO<sub>3</sub>). In general, *E. fetida* coelomocytes were more susceptible to AgNPs and AgNO<sub>3</sub> while AuNPs did not show cytotoxicity. At the sub-cellular level, AgNPs, similarly affected cellular redox reactions in both species however, *E. fetida* showed greater responses for apoptosis-related endpoints. At the molecular level, AgNPs (at 24 h LC<sub>20</sub>) induced a significantly high level of *superoxide dismutase* in *E. andrei* coelomocytes while *E. fetida* was additionally characterized by consistent induction of *metallothionein*, differential capacity for redox and metal regulation. Although AuNPs were not cytotoxic, both NP types (Ag and Au) seemed to alter the expression pattern of immune-related genes (*toll-like receptor* and *lysenin*) in both species, but more clearly in *E. fetida*. We further observed that lysenin proteins, while secreted differently between the two species, bind only to AgNPs resulting in negative secretion feedback. Our findings support the general preference of *E. fetida* in ecotoxicology, and reveal the potential roles of protective and immune mechanisms optimized for each species in its own ecological niche.

**Keywords:** innate immunity, coelomocytes, AgNP, AuNP, apoptosis, gene expression pattern

## 1. Introduction

Metal nanoparticles (NPs) are nanomaterials of particular interest in commercial and biomedical fields due to their unique physico-chemical and optical properties<sup>1-3</sup>. For example, silver (Ag) NPs are the most utilized engineered NPs in commercial products owing to their antimicrobial attributes while gold (Au) NPs have found an intriguing niche as a diagnostic/sensing tool in biomedical imaging<sup>4,5</sup>. In this regard, the increasing number of applications of engineered NPs in those products may, if not properly regulated, lead to their significant accumulation in the environment<sup>6-8</sup>. Their potential impact is largely unknown; therefore nanotoxicology is considered to be a ramification of toxicology<sup>9</sup>. So far, numerous studies have focused on the acute and deleterious effects of AgNPs (e.g. cytotoxicity), but we own limited knowledge about the immunobiological out-comes in general<sup>10, 11</sup>.

Previous studies suggest that AgNP toxicity is largely dependent on the material composition, size, shape and coating or capping agents<sup>12</sup>. It is generally accepted that oxidative dissolution of AgNPs and thus the release of bioactive Ag ions results in excess reactive oxygen species (ROS) generation leading to DNA damages and apoptotic responses<sup>11, 13-15</sup>. In contrast, AuNPs are highly resistant to oxidative dissolution and somewhat inconsistent results have been reported, indicating the unpredictable nature of NP toxicity<sup>16</sup>. Spontaneous formation of biomolecular coronas in biological fluids is also considered as a factor modulating the cellular interactions and toxicity of those NPs<sup>7</sup>.

Invertebrate animal models have been long applied to study the evolution of innate immune responses by cross-referencing to the more complicated mammalian immune system<sup>14, 17-19</sup>. Among terrestrial invertebrates, earthworms are “keystone” species to monitor the health of the soil ecosystem<sup>20</sup>. Earthworm coelomocytes constitute the cellular arm of innate immunity and are classified into amoebocyte and eleocyte subpopulations, the former of which is considered to be ancestors of vertebrate macrophages<sup>14, 18</sup>. In addition, the

1  
2  
3 coelomic fluid that accommodates coelomocytes possesses a wide range of bioactive  
4 molecules (fetidin/lysenin, lysozyme, and lumbricin) that comprise the humoral arm of  
5 earthworm immunity<sup>21-24</sup>.  
6  
7

8  
9  
10 Several detailed *in vitro* and *in vivo* reports on AgNPs exist in the literature that  
11 applied cell cultures and different organisms; however, the interpretation of the impact of  
12 these NPs on the regulation of biochemical processes and immune system has been  
13 disputable<sup>13, 16</sup>. As a pioneer study that unfolds the conserved mechanisms between  
14 invertebrate and vertebrate immune cells underlining molecular and cellular responses to  
15 AgNPs, Hayashi *et al.*, (2012)<sup>14</sup> compared *Eisenia fetida* coelomocytes and THP-1 cells  
16 (human acute monocytic leukemia cells). This was later linked to the *in vivo* exposure<sup>25</sup>  
17 scenarios providing molecular signatures for the involvement of immune responses that were  
18 rather dissimilar between the treatments by AgNPs and the dissolved counterpart. While those  
19 studies appreciated the evolutionary differences and exposure scenarios associated with the  
20 immune system, the horizontal axis of the phylogeny is still not considered in the context of  
21 nanotoxicology.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

37  
38 *E. andrei* and *E. fetida* are two closely-related earthworm species widely used in  
39 standardized ecotoxicological testing and discerned as separate species by their minor  
40 morphological features. In fact, their natural living environment fundamentally indicates  
41 dissimilarities in the niche; more specifically, *E. andrei* can be present in manure and compost  
42 while *E. fetida* subsists in moist forest soil, however both *Eisenia* spp. frequently constitute  
43 mixed colonies<sup>26</sup>. Despite that *Eisenia* spp. have long been applied as model organisms in  
44 comparative immunology<sup>19</sup>, the exact genetic distinction between the two species has only  
45 recently been solved by species-specific primers for mitochondrial gene cytochrome oxidase  
46 (COI) I subunit<sup>27</sup>. Furthermore, earlier results evidenced gene expression variations between  
47 the two *Eisenia* species in the basal levels of fetidin/lysenin which is an *Eisenia* specific gene  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

involved in molecular responses and the formation of species-specific protein coronas around AgNPs<sup>18</sup>.

In this work, we study biological interactions between earthworm immune cells and 10 nm noble metal NPs (AgNPs and AuNPs) both at molecular and cellular levels *in vitro*. Briefly, we ascertained marked contrast of the two earthworm species in the susceptibility of coelomocytes to AgNPs at both biological levels. To the contrary, AuNP exposure had no detectable effects on cell viability of coelomocytes from both species, but it clearly affected gene- , and protein expression of *lysenin*. To the best of our knowledge, this is the first report that describes a direct comparison of earthworm coelomocytes from the two closely-related species *E. andrei* and *E. fetida* on the molecular/cellular toxicity of AgNPs and AuNPs. We further aim to link the *ex situ* lysenin/protein-corona formation and protein secretion to the observed responses of coelomocytes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Earthworm husbandry

Adult (clitellated) *E. andrei* and *E. fetida* earthworms were maintained under standard laboratory conditions and collected from breeding stocks<sup>28</sup>. One day before coelomocyte isolations earthworms were placed onto moist tissue paper for depuration to minimize soil contaminations during coelomocyte harvesting. The genotypes of the two species were validated according to Dvořák *et al.*, (2013)<sup>27</sup>.

### 2.2. Extrusion of coelomocytes and *in vitro* exposure conditions

Coelomocytes were separately harvested from *E. andrei* and *E. fetida* earthworm species in the same manner as we described earlier<sup>24</sup> and detailed in the electronic supplementary information (ESI). Following the cell isolations and enumerations ( $5 \times 10^5$

1  
2  
3 cells), coelomocytes were exposed to different concentrations of NPs (1.25-40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for  
4  
5 several time points (1-24 h) in RPMI-1640 cell culture media (with HEPES 3.5 g/L, pH 7.4)  
6  
7 supplemented with 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
8  
9 streptomycin, Lonza, Basel, Switzerland) and 1% heat-inactivated FBS (Euroclone, Milan,  
10  
11 Italy) and placed onto 24-well plates<sup>14</sup>. Where interference is expected in colorimetric  
12  
13 measurements, phenol red-free RPMI was used instead. Double-distilled-water (ddH<sub>2</sub>O)  
14  
15 served as a negative control (in the same volume as the highest concentration of AgNP  
16  
17 treatments) and AgNO<sub>3</sub> as a positive control for dissolved Ag cytotoxicity<sup>14</sup>. During flow  
18  
19 cytometry-based detections only amoebocytes were gated for the analysis as the eleocyte  
20  
21 population has a high autofluorescence level.  
22  
23  
24  
25  
26  
27

### 28 29 **2.3. Nanoparticles**

30  
31 Polyvinylpyrrolidone (PVP)-capped 10 nm AgNPs and AuNPs (1 mg/mL, BioPure,  
32  
33 OECD standard) were purchased from NanoComposix (San Diego, CA, USA) and stored at 4  
34  
35 °C in the dark according to the manufacturer's instructions. Dissolved AgNO<sub>3</sub> was purchased  
36  
37 from Sigma-Aldrich (Budapest, Hungary).  
38  
39  
40  
41

### 42 43 **2.4. Physico-chemical characterization of NPs**

44  
45 Highest applied concentrations of 10 nm AgNP and AuNP (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was incubated  
46  
47 for 24 h at room temperature (RT) in ddH<sub>2</sub>O, PBS, RPMI-1640, RPMI-1640 supplemented  
48  
49 with 1% FBS. The light absorbance profile (characteristic to the localized surface plasmon  
50  
51 resonance of those NPs) was studied by UV/VIS spectrophotometry to determine the  
52  
53 aggregation states and particle morphology under exposure conditions. After desalting,  
54  
55 particle sizes and morphology of NPs were also investigated at high resolution using a  
56  
57 transmission electron microscope (TEM)<sup>14</sup>. The hydrodynamic size and polydispersity index  
58  
59  
60

1  
2  
3 (Pdl) of NPs under exposure conditions were determined by a dynamic light scattering (DLS)  
4 device (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical, Worcestershire, UK). Likewise, zeta  
5 potentials were measured but after three washing steps with ddH<sub>2</sub>O (3×20 min, 18 kRCF) to  
6 remove serum proteins and minimize electrolyte concentrations<sup>14, 29</sup>. For the quantification of  
7 dissolved ion concentrations, NPs were pelleted by ultracentrifugation (1 h, 164-192 kRCF, 4  
8 °C) and metal concentrations in the supernatant were analyzed by inductively-coupled plasma  
9 mass spectrometry (ICP-MS). More details of the particle characterization are provided in the  
10 ESI.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

## 24 **2.5. Concentration-response curve fitting, and the choice of test concentrations**

25  
26 Concentration-response curves were fitted to the results obtained from live/dead cell  
27 assays in order to estimate LC<sub>x</sub> values for 24 h exposure (see ESI for details). To further study  
28 the cytotoxicity mechanisms, we chose a high concentration range for AgNPs (15, 30 and 40  
29 µg/mL) and the highest AgNO<sub>3</sub> concentration at which >95% of cells were affected (1.35  
30 µg/mL) to ensure a high signal-to-noise ratio at earlier time points than 24 h. As AuNPs did  
31 not induce cytotoxicity at any of the concentrations tested, we chose 20 µg/mL as an  
32 intermediate concentration comparable to the AgNP treatments. Where possible, the same  
33 live/dead stain 7-AAD (Biotium, Fremont, CA, USA) was used in combination with  
34 functional stains in flow cytometry to exclude dead cells or cells with leaky membranes from  
35 analysis. For sub-lethal endpoints such as gene and protein expression profiles, we used  
36 average LC<sub>20</sub> values referred to as "low-cytotoxic concentrations" (AgNP: *E. andrei* 2.71  
37 µg/mL and *E. fetida* 2 µg/mL; AgNO<sub>3</sub>: 0.20 µg/mL) as well as 20 µg/mL AuNP for a  
38 comparison.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 2.6. Flow cytometric analysis of oxidative, and mitochondrial stress

Following exposure to selected concentrations of AgNP, AuNP or AgNO<sub>3</sub>, the amoebocyte population of coelomocytes were evaluated for oxidative and mitochondrial stress parameters (intracellular ROS level, nitric oxide production, caspase-3 activity and mitochondrial membrane potentials) by flow cytometry.

The measurements and data analyses were performed using a FACSCalibur (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) flow cytometer and a FCS Express (DeNovo Software, Glendale, CA, USA) software, respectively. Intracellular ROS profile was investigated for early time points (1, 2 and 4 h) using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA; Sigma-Aldrich) for staining and hydrogen peroxide (100 μM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as a positive ROS-inducer control in phenol red-free cell culture media. After exposure, coelomocytes were collected, spun down and loaded with 10 μM H<sub>2</sub>DCF-DA for 25 min in the dark at RT. Thereafter the cells were washed twice with LBSS (5 min, 100 RCF) prior to flow cytometry. Fluorescence signals were detected in FL1 (530/30 filter) gated on the population with intact cell membranes, as determined by 7-AAD in FL3 (670 LP filter).

For nitric oxide (NO) measurements, coelomocytes were collected at 4 and 24 h time points, washed with LBSS (5 min, 100 RCF), and stained with 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein (10 μM DAF-FM-DA, Sigma-Aldrich) for 20 minutes in the dark at RT. After incubation, coelomocytes were washed with LBSS (5 min, 100 RCF) and subsequently monitored by flow cytometry in FL1 (530/30 filter) along with of 7-AAD in FL3 (670 LP filter). Caspase-3 activation and mitochondrial damages were studied likewise using a dual NucView488 (detected in FL1, 530/30 filter) and MitoView633 (detected in FL4, 661/16 filter) Apoptosis Assay Kit (Biotium).



## 2.7. Apoptosis detection by TUNEL-assay

To verify apoptosis induction determined by the caspase-3 activity study above, Click-it Plus TUNEL Assay (modified terminal deoxynucleotidyltransferase-dUTP nick end labelling) with Alexa Fluor 488 fluorescent dye (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was applied to detect the double-stranded DNA-breakage at 24 h exposure. Coelomocytes (80  $\mu$ L from  $5 \times 10^5$ /mL) were spread onto glass slides using Cytospin 3 (SHANDON, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) apparatus. Slides were dried at RT overnight, before the assay was performed according to the manufacturer's instructions. Cell nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, 10  $\mu$ g/mL, Life Technologies) and then observed using an Olympus BX61 microscope and an AnalySIS software (Olympus Hungary, Budapest).

## 2.8. Comet assay

To study the DNA damage by Comet assays, coelomocytes ( $10^6$  cells) were exposed for 24 h to AgNPs, AuNPs or AgNO<sub>3</sub> or the positive control UV-C for 30 s. Following two washing steps with LBSS (5 min, 100 RCF) alkaline-based sandwich-agarose gel technique was applied on slides according to previous studies<sup>30</sup>. Briefly, Normal Melting Point agarose-gel (NMA, 0.5%) constituted the first layer and coelomocytes were mixed into the second layer with Low Melting Point agarose gel (LMA, 0.5%), that was covered by another LMA-layer without cells to form the third layer. Thereafter slides were placed in a lysing-solution (1% sodium sarcosinate, 2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 1% Triton X-100, 10% DMSO, and 10 mM Tris) for overnight incubation in the dark at 4 °C. The next day, slides were kept in cold electrophoresis buffer (200 mM EDTA, 10 N NaOH, pH: 10) for 20 min. DNA-strains electrophoresis was performed in the same buffer for 40 min at 0.46 mV/cm and 132 mV in the dark. Slides were washed with a neutralizing solution (0.4 M Tris) three times for

1  
2  
3 5 min and stained with ethidium bromide. At least 80 individual cells were scrutinized from  
4  
5 each treatment under an Olympus BX50 fluorescent microscope with 400x magnification  
6  
7 and evaluated by an image analysis software (Comet assay IV; Perceptive Instruments Ltd.,  
8  
9 Bury St Edmunds, UK). Tail Moment values (TM, the extent of the head and tail, size of the  
10  
11 head and the strength of fluorescent intensity) were measured for the analysis.  
12  
13  
14  
15  
16

## 17 **2.9. Gene expression profiling**

18  
19 Coelomocytes were exposed ( $5 \times 10^5$  cells/well) for 2, 12 and 24 h to low-cytotoxic  
20  
21 concentrations ( $LC_{20}$ ) of AgNPs (*E. andrei* 2.71  $\mu\text{g/mL}$ , *E. fetida* 2  $\mu\text{g/mL}$ ) or  $\text{AgNO}_3$  (0.20  
22  
23  $\mu\text{g/mL}$ ), or 20  $\mu\text{g/mL}$  AuNP for a comparison as above. Five independent experiments were  
24  
25 performed for all conditions. At each time point, coelomocytes were collected and washed  
26  
27 twice with LBSS (5 min, 100 RCF). Total RNA extraction and cDNA synthesis were  
28  
29 performed following the manufacturer's instructions and described in details in ESI, along  
30  
31 with the temperature setting used for quantitative real-time PCR (qPCR).  
32  
33  
34

35  
36 For SYBR Green-based qPCR, the cDNA templates were mixed with gene-specific  
37  
38 primer pairs designed using a Primer Express software (Thermo Scientific) and the primer  
39  
40 sequences are summarized in Table S1. The raw fluorescence qPCR data was used to  
41  
42 calculate the amplification kinetics and thus the initial quantity of template cDNA ( $R_0$ ) using  
43  
44 DART-PCR<sup>31</sup>. For normalization of the calculated  $R_0$  values, we tested both the conventional  
45  
46 housekeeping gene approach (*RPL17* as the internal reference gene) and using the data-driven  
47  
48 algorithm NORMA-gene<sup>32</sup>. We opted for the latter approach as it proved more conservative  
49  
50 (i.e. minimal influence on the inter-group variation) and effective normalization (i.e. reduction  
51  
52 in the intra-group variation). The NORMA-gene normalized  $R_0$  values were then presented  
53  
54 relative to the geometric means of the control values at each corresponding time point.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Heatmaps were created on  $\log_2$ -transformed and scaled datasets using the gplots package (ver.  
4  
5 3.0.1.1) in the R environment (ver. 3.5.1.).  
6

7  
8 For multivariate analyses of the gene expression datasets, principal component  
9  
10 analysis (PCA) and correspondence analysis (CA) were performed using the FactoMineR  
11  
12 (ver. 1.41)<sup>33</sup> and factoextra (ver. 1.0.5) packages for R. For PCA, the gene expression values  
13  
14 were  $\log_2$ -transformed and scaled. We performed PCA to reduce the dimensionality of the  
15  
16 data so as to identify general variations among categories such as species, exposure duration  
17  
18 and treatments as well as their combinations. CA was performed without standardization (i.e.  
19  
20 scaling) to visualize the treatment-specific gene expression patterns over time.  
21  
22  
23  
24  
25

## 26 **2.10. Profiling of *ex-situ* protein coronas around nanoparticles**

27

28 To study the composition of protein coronas around AgNPs and AuNPs, we applied  
29  
30 the same methods as described in Hayashi *et al.*, (2013)<sup>34</sup> with some modifications. Briefly, to  
31  
32 obtain coelomic proteins (CP) from the coelomocyte culture, the cells ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were  
33  
34 incubated for 24 h at RT in RPMI cell culture media without serum supplement. The culture  
35  
36 medium was then aspirated and centrifuged (5 min, 500 RCF) to remove cells. The  
37  
38 supernatants were centrifuged again (10 min, 1700 RCF) and filter-sterilized (through 0.22  
39  
40  $\mu\text{m}$  membrane filters), after which the CP was collected in Protein LoBind tubes (Eppendorf,  
41  
42 Hamburg, Germany). According to the earthworm species from which the CP was derived, it  
43  
44 was named EaCP or EfCP (*E. andrei* and *E. fetida* coelomic protein, respectively). Total  
45  
46 protein concentrations of the CPs were quantified using a BCA-kit (Sigma-Aldrich) and were  
47  
48 typically in the range of 250-300  $\mu\text{g/mL}$ . As these concentrations were not high enough to  
49  
50 serve as an alternative to 1% FBS (400-600  $\mu\text{g}$  protein/mL), we decided to spike the CP in  
51  
52 BSA protein background, achieving a total of 800  $\mu\text{g}$  protein/mL of which 100  $\mu\text{g/mL}$  was  
53  
54 CP and 700  $\mu\text{g/mL}$  was BSA. This represents a >5-fold higher protein concentration sufficient  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 to cover the theoretical total surface area of 20  $\mu\text{g}$  of 10 nm AgNPs (106  $\mu\text{g}$  proteins to 11  
4  $\text{cm}^2$  AgNP surface) and 10 nm AuNPs (58  $\mu\text{g}$  proteins to 6  $\text{cm}^2$  AuNP surface). In line with  
5 these calculations, we used 1 mL of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs and AuNPs. As for the control, we  
6 used the same incubation condition without the CP spike. Samples were incubated on an end-  
7 over-end rotator for 24 h at RT in the dark, and then were centrifuged for 30 min at 16 kRCF  
8 at 21  $^\circ\text{C}$ . Supernatants were removed and NPs washed three times with PBS (30 min, 16  
9 kRCF, 21  $^\circ\text{C}$ ). After the final washing step 2 $\times$ SDS sample loading buffer was added and  
10 samples were boiled for 5 minutes, followed by another centrifugation (30 min, 16 kRCF, 4  
11  $^\circ\text{C}$ ) to pellet NPs. Supernatants were stored at -80  $^\circ\text{C}$ . SDS-PAGE and Coomassie-Brilliant  
12 Blue staining were performed as per standard protocols. Reference protein samples were  
13 prepared directly from CP (i.e. without incubation with NPs) for comparison with corona  
14 proteins on NPs. Images were analyzed with a VilberLourmat Bio-Profil Version 97 gel  
15 documentation system (Collégien, France) and a Biocapture Version 12.6 software. In  
16 addition, protein identification of excised bands by liquid chromatography combined tandem  
17 mass spectrometry (LC-MS/MS) and Western blots (WB) were performed to precisely  
18 identify the discrete bands. Specific details of LC-MS/MS measurements and WB are  
19 provided in the ESI.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

## 45 **2.11. Analysis of NP-induced protein secretion**

46 Protein secretion profile was examined according to Hayashi *et al.*, (2016)<sup>35</sup>. Initially,  
47 coelomocytes ( $5 \times 10^5$  cells/sample) were exposed for 4 h and 24 h at RT to the corresponding  
48 concentrations of NPs under the same exposure conditions as used in the gene expression  
49 study. Vehicle controls were prepared by adding ddH<sub>2</sub>O to cells instead of NPs. Following  
50 incubations, the culture supernatant (including NPs) was collected into a Protein LoBind tube  
51 (Eppendorf), spun down (5 min, 500 RCF) to remove cells and centrifuged again (10 min,  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 1700 RCF). The total protein concentrations were quantified using a BCA-kit (Sigma-  
4 Aldrich) and adjusted to 400-600  $\mu\text{g/mL}$ . SDS sample buffer was added to a small aliquot of  
5  
6 the cell-free supernatant and boiled for 5 min. To remove NPs, samples were centrifuged (30  
7  
8 min, 16 kRCF, 4°C), then SDS-PAGE and Coomassie-Brilliant Blue staining was performed  
9  
10 as per standard protocols. Image J (NIH) was employed for densitometry analysis.  
11  
12  
13  
14  
15  
16

## 17 **2.12. Statistical analyses**

18  
19 Each experiment (except qPCR) was repeated three independent times ( $n=3$ ).  
20  
21 Statistical analyses were carried out with Prism v5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA,  
22  
23 USA). Distribution of normality was overseen prior to additional statistical tests (Shapiro-  
24  
25 Wilk Normality Test). All data are presented with the mean and standard error of the mean  
26  
27 (SEM). Results were analysed by one-way ANOVA with Kruskal-Wallis test followed by  
28  
29 Dunn's post hoc test. The significance level of  $\alpha = 0.05$  was applied for all statistical tests.  
30  
31 For qPCR datasets, the relative gene expression values were log-transformed to satisfy the  
32  
33 assumption of normality. Student's  $t$ -test (or Welch's  $t$ -test where appropriate) was performed  
34  
35 in R following Levene's test on the homogeneity of variances. Significant differences  
36  
37  
38 between controls and treatments at each time point were determined as  $\alpha = 0.05$ .  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

## 46 **3. Results and discussion**

### 47 **3.1. Physico-chemical characterization of NPs under exposure conditions**

48  
49  
50  
51 Characterization of NPs under the exposure conditions is essential since any biased  
52  
53 physico-chemical factors could dramatically influence the cellular response<sup>36</sup>. Even in the  
54  
55 high electrolyte and protein-rich milieu, AgNPs revealed a narrow absorbance peak  
56  
57 characteristic of localized surface plasmon resonance, suggesting a monodispersed population  
58  
59 (Fig. 1a). This was further supported by DLS and TEM (Table 1, Fig. 1c and d), where they  
60

1  
2  
3 also showed a narrow hydrodynamic size distribution, low PDI (Table 1) and no signs of  
4  
5 particle aggregation, respectively. AuNPs, on the other hand showed a broader peak in the  
6  
7 absorbance spectrum indicating heterogeneity in localized surface plasmon resonance due to  
8  
9 the presence of multimeric clusters rather than singly dispersed particles (Fig. 1b). The mean  
10  
11 hydrodynamic size and PDI were also a little larger than that of AgNPs (Table 1 and Fig. 1c),  
12  
13 although the inherent particle size as observed in TEM was smaller (Fig. 1e). These  
14  
15 characterization results suggest that, while some degree of protein-induced agglomeration is  
16  
17 apparent in AuNPs, the NPs were in general colloidally stable under the exposure conditions  
18  
19 used in this study.  
20  
21  
22

23  
24 Oxidative dissolution of metal NPs, AgNPs in particular, is a critical process that can  
25  
26 obscure the NP-specific effects on toxicity as the ionic counterpart is known to be highly  
27  
28 bioactive<sup>14</sup>. To address this problem, the dissolved metal ion concentrations were determined  
29  
30 by ICP-MS analysis after removal of NPs by ultracentrifugation. The results suggest that  
31  
32 oxidative dissolution under the exposure conditions is not a major concern in both NP types,  
33  
34 as dissolved fraction was only <0.4% of the total metal mass (Table 1). For the highest  
35  
36 concentration of AgNPs used in this study, the dissolved Ag was 0.16 µg/mL, corresponding  
37  
38 lower concentration regime used for the AgNO<sub>3</sub> treatment.  
39  
40  
41  
42  
43

### 44 **3.2. Concentration-dependent cytotoxicity is evoked by AgNPs but not AuNPs**

45  
46 We first determined the concentration-response relationship, based on which we  
47  
48 selected test concentrations for further analysis on sub-lethal end-points. Following 24 h  
49  
50 exposure to a series of concentrations (1.25-40 µg/mL for AgNPs and AuNPs, 0.05-1.35  
51  
52 µg/mL for AgNO<sub>3</sub>), the survival rate of coelomocytes was evaluated by 7-AAD, a cell  
53  
54 membrane-impermeant nuclear stain. In the flow cytometry analysis, we referred to the  
55  
56 amoebocyte population as the surrogates for total coelomocytes, because eleocytes (the other  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 major population of coelomocytes) possess a high riboflavin content that results in strong  
4 autofluorescence<sup>26</sup>. In both earthworm species, AgNP (and AgNO<sub>3</sub> at lower concentrations)  
5  
6 but not AuNPs exerted concentration-dependent cytotoxicity within the concentration range  
7  
8 tested (Fig. S1). This also verifies that the dissolved fraction of AgNPs (<0.4% of total Ag)  
9  
10 did not follow the concentration-response curve established for the AgNO<sub>3</sub> treatment. As for  
11  
12 the species differences, coelomocytes from *E. fetida* showed higher sensitivity towards  
13  
14 AgNPs and AgNO<sub>3</sub> than *E. andrei* coelomocytes based on the estimated lower LC<sub>x</sub> values and  
15  
16 the steeper Hill-Slopes (Table S2). Based on the concentration-response curves established  
17  
18 here we selected a high concentration series of AgNPs (15, 30 and 40 µg/mL) to study time  
19  
20 points earlier than 24 h, and an intermediate AuNP concentration (20 µg/mL) with reference  
21  
22 to AgNPs as no changes in the cell viability was observed. For gene and protein expression  
23  
24 studies, we opted for low-cytotoxic concentrations (LC<sub>20</sub>) determined for AgNPs and AgNO<sub>3</sub>,  
25  
26 while AuNPs were tested at the same concentration as above<sup>25</sup>.  
27  
28  
29  
30  
31  
32

33 AgNP, coincidingly with the literature, exhibited harmful effects on innate immune  
34 cells (e.g. earthworm coelomocytes) in low-concentration attributed to their small-size<sup>14, 37</sup>.  
35  
36 Contrastingly similar responses were not observed after AuNP treatments (Fig. S1c and d). To  
37  
38 this end, their interactions with biological systems are rather contradictory<sup>38, 39</sup>; however  
39  
40 several studies deal with the broad toxicity of AuNPs<sup>40, 41</sup>.  
41  
42  
43  
44  
45  
46

### 47 **3.3. AgNPs induce immediate increase of intracellular ROS, delayed elevation of NO** 48 **and mitochondrial membrane depolarization** 49

50  
51 As we hypothesize that oxidative stress is a key process that initiates a cascade of  
52 subcellular events upstream of apoptotic determination following exposure to AgNPs, we first  
53 evaluated the intracellular level of ROS at early time points (i.e. 1, 2 and 4 h). A  
54  
55 concentration-dependent increase in the relative ROS-level was observed for the AgNP  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 treatments (Fig. 2a and b). With regard to the temporal aspect, *E. andrei* coelomocytes  
4 showed a peak in the ROS level at 2 h, while *E. fetida* coelomocytes revealed gradual  
5 elevation of ROS toward 4 h. Indeed, in general similar trends were observed also for the  
6  
7  
8  
9  
10 AgNO<sub>3</sub> treatment and positive control (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), suggesting an inherent difference in the  
11  
12 kinetics of ROS physiology between the two species (Fig. 2a and b).  
13

14  
15 It has been generally recognized that AgNP exposure results in oxidative stress a  
16  
17 process extremely dependent on NP size, shape, dose and duration<sup>13, 42, 43</sup>. A variety of  
18  
19 oxidative stress-related abnormalities have been reported for earthworms as well as other  
20  
21 invertebrates upon AgNP treatments<sup>14, 44-50</sup>, however induction of NO derivatives has not been  
22  
23 studied in invertebrate immune cells. In the coelomocytes of both *Eisenia* species, the  
24  
25 intracellular NO level was slightly higher at 4 h and then strongly increased at 24 h, showing  
26  
27 significant differences between the AgNP treatments and the unexposed control (Fig. 2c and  
28  
29 d). Interestingly, AgNO<sub>3</sub> did not induce NO production as high as observed for the AgNP  
30  
31 treatments, indicating NP-specificity of this response.  
32  
33

34  
35 In the case of mitochondrial depolarization ( $\Delta\psi_m$ ) we did not find any remarkable  
36  
37 changes at 4 h in any of the AgNP treatments (Fig. 2e and f). However, at 24 h a significant  
38  
39 concentration dependent decrease of mitochondrial membrane potential was observed for *E.*  
40  
41 *fetida* coelomocytes and to a lesser extent for *E. andrei* species. Notably, the AgNO<sub>3</sub>  
42  
43 treatments at 24 h resulted in the highest change among the other treatments.  
44  
45

46  
47 Taken together, although AgNP induced a similar degree of NO production in the two  
48  
49 species, the relative ROS level was rapidly regulated in *E. andrei* coelomocytes resulting in a  
50  
51 decreasing trend toward 4 h. On the other hand, the higher degree of mitochondrial stress in *E.*  
52  
53 *fetida* coelomocytes may reflect the lower survival of cells compared to *E. andrei* species  
54  
55 (Table S2). The positive correlation of mitochondrial depolarization and cell death was also  
56  
57 evident for the AgNO<sub>3</sub> treatments, underscoring that the former process is linked to  
58  
59  
60



1  
2  
3 subsequent cell death<sup>51</sup>. We do not know whether the intracellular ROS level could have been  
4  
5 much higher in *E. fetida* coelomocytes at 24 h than the earlier time points tested here, as the  
6  
7 measurement of ROS levels becomes more complicated when the cells are under stress.  
8  
9 Interesting to note is that in the hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* AgNPs did not cause  
10  
11 elevated ROS levels but the mitochondrial membrane potential was significantly decreased<sup>51</sup>,  
12  
13 as was the case for *E. fetida* coelomocytes in this study. It is nonetheless plausible that the  
14  
15 cellular redox balance (indicated by the excess ROS level) was affected at initial stages of  
16  
17 AgNP and AgNO<sub>3</sub> exposure, as a consequence of which mitochondrial membrane  
18  
19 depolarization persisted for long enough to trigger cell death in both treatments at 24 h. As  
20  
21 AgNO<sub>3</sub> did not significantly altered the intracellular NO level unlike AgNPs, this process  
22  
23 deserves a further investigation that may provide insights into the NP-specific modes of  
24  
25 cellular responses. In all cases, as predicted from the cytotoxicity assays, AuNPs did not  
26  
27 induce any of the changes in coelomocytes of both species.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

### 35 **3.4. AgNPs induce caspase-3 activation and DNA damages**

36  
37 To further strengthen our hypothesis outlined above, we next focused on the  
38  
39 parameters directly linked to apoptosis. As expected, a concentration-dependent caspase-3  
40  
41 activity was noted in the AgNP treatment in both species, in particular in *E. fetida*  
42  
43 coelomocytes that showed a significant difference at the highest concentration at 24 h (Fig. 3a  
44  
45 and b). AgNO<sub>3</sub> induced higher caspase-3 activity already at 4 h and then at 24 h in both  
46  
47 species. The AuNP treatments again did not show any notable changes. Of particular interest  
48  
49 is the general weaker response of *E. andrei* coelomocytes compared to *E. fetida*. The  
50  
51 molecular signature of apoptosis was further indicated by TUNEL assays revealing double  
52  
53 strand DNA breaks in AgNP and AgNO<sub>3</sub> treatments (Fig. 3c and d). TUNEL assay controls  
54  
55 and the concentration series of AgNPs applied in this study validated the assay specificity  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 (Fig S3a and b). These observations are all in line with the cytotoxicity and the mitochondrial  
4 depolarization results. By means of TUNEL assay a previous study<sup>52</sup> has reported that AgNP  
5 treatments caused DNA damages in THP-1 monocytic cell line which could be linked to  
6 excess ROS production. Furthermore, in rat hippocampus AgNPs induced apoptosis in a dose-  
7 dependent manner observed by TUNEL staining<sup>53</sup>. Likewise Ribeiro *et al.*, (2019)<sup>54</sup>  
8 documented apoptosis of *E. fetida* coelomocytes upon copper oxide nanomaterial exposure *in*  
9 *vitro*.

10  
11  
12 As another method of choice for sensitive detection of single/double-stranded DNA  
13 breakage, Comet-assay is a widely applied method including the genotoxicity evaluation of  
14 NPs in individual cells<sup>55</sup>. Here, a “Tail Moment” (TM) value was used that takes into account  
15 the size and signal intensity of the nuclei and determines the degree of the DNA breakdown.  
16 Following 24 h exposure, at which we were able to detect significant caspase-3 activation  
17 (Fig. 3), AgNPs triggered concentration-dependent genotoxic effects in coelomocytes of both  
18 species (Fig. 4). Furthermore, we noted higher TM-values in *E. fetida* coelomocytes  
19 compared to *E. andrei* after exposure to AgNPs or AgNO<sub>3</sub> (Fig. 4a). In support of our  
20 findings, another study<sup>45</sup> on AgNP genotoxicity revealed concentration-dependent appearance  
21 of micronuclei and bi-nucleated coelomocytes of *Aporrectodea caliginosa* earthworms. As a  
22 side note, while we did not find any changes in the AuNP-exposed coelomocytes, by Comet  
23 assays Lopez-Chaves *et al.*, (2018)<sup>40</sup> observed DNA-damage caused by AuNPs in a size-  
24 dependent manner (10, 20, 30, and 60 nm) in HepG2 hepatoma cells.

### 51 **3.5. Identification of species-independent and dependent gene responses to AgNPs**

52  
53 To further gain insights into the species differences in sensitivity towards noble metal  
54 NPs, we analyzed expression profiles of several target genes (stress-related: *superoxide-*  
55 *dismutase-SOD*, *metallothionein-MT*, pattern-recognition receptor: *toll-like receptor-TLR*, and  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 antimicrobial peptide genes: *lysenin*, *lumbricin*, *lumbricin-related peptide-LuRP*) in a  
4  
5 multiparametric manner: two different species, time kinetics (2, 12 and 24 h) and various  
6  
7 treatments (AgNP, AuNP, and AgNO<sub>3</sub>). Low-cytotoxic concentrations (LC<sub>20</sub> values) of  
8  
9 AgNPs (*E. andrei*: 2.71 µg/mL and *E. fetida*: 2 µg/mL), and AgNO<sub>3</sub> (0.20 µg/mL for both  
10  
11 species) were selected for the experiments to standardize the concentration-response  
12  
13 relationship between the two species. For AuNPs, the non-cytotoxic concentration (20  
14  
15 µg/mL) was used as above.  
16  
17  
18

19 To explore the general patterns, we first visualized the datasets in a heatmap for each  
20  
21 species based on z-scores and thus treating all genes equally independent of the inherent  
22  
23 expression levels. Relative expression profiles of *E. fetida* have a broader z-score distribution  
24  
25 and the resulting heatmap features more extreme values than the heatmap for *E. andrei* in  
26  
27 which expression values around the mean (z-score of zero) are found more frequently (Fig.  
28  
29 5a). This suggests in general that *E. fetida* coelomocytes are more sensitive to the studied  
30  
31 treatments. Using z-transformed datasets, PCA was performed to identify global patterns  
32  
33 specific to species, treatments or time points, or the combinations of the latter two (treatment  
34  
35 × time). In all cases, the first two PCs explained >50% of the total variations. Despite the  
36  
37 global difference in the degree of transcriptional responses (Fig. 5a), the overall gene  
38  
39 expression patterns were not largely different between the two species (Fig. S3a). Expression  
40  
41 patterns likely common to both species were observed with samples having negative PC1  
42  
43 scores; they are weakly represented by the AgNP and AgNO<sub>3</sub> treatments (Fig. S3b, mean  
44  
45 points labelled in yellow and blue, respectively) and by 24 h (Fig. S3c, mean point labelled in  
46  
47 orange), but clearly indicated when the treatments and the time point were combined (i.e. 24 h  
48  
49 exposure to AgNPs or AgNO<sub>3</sub>) (Fig. 5b “all time points”, mean points labelled in brownish  
50  
51 yellow and dark blue, respectively). The gene contributing largely to PC1 (strongly related to  
52  
53 AgNP and AgNO<sub>3</sub> treatments at 24 h) is *lysenin* due to relatively low expression levels, while  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 *SOD* and *MT* have influences over PCs 1 and 2 mainly as a result of relatively high expression  
4 levels (Fig. 5b “all time points”). With these three genes in mind, now we look at the common  
5 and uncommon features between the two species at two time points, 2 and 24 h. At 2 h, *MT*  
6 and *lysenin* contribute largely to both PCs 1 and 2, and this clearly separated AgNP and  
7 AgNO<sub>3</sub> treatments on PC1 as well as *E. andrei* and *E. fetida* on PC2 (Fig. 5b “2 h time  
8 points”). Interestingly, the coordinates pattern was exactly opposite between the two species,  
9 indicating a contrasting tendency such that when *MT* is high *lysenin* is low, and vice versa. To  
10 be more specific, *E. andrei* had a low *MT*/high *lysenin* profile and *E. fetida* had a high  
11 *MT*/low *lysenin* profile at 2 h. At 24 h, PC2 seems to underscore the difference between the  
12 treatments common to the two species, where controls and the AuNP treatments are  
13 associated with negative PC2 scores and AgNO<sub>3</sub> and AgNP treatments are associated with  
14 higher or positive PC2 scores (Fig. 5b “24 h time point”). This trend was a result of  
15 suppression of *lysenin* and induction of *SOD* which were the most prominent examples of the  
16 AgNP treatments of *E. fetida* coelomocytes. Overall with respect to the effect of treatments  
17 and time points, PCA identified the 24 h time point for AgNP and AgNO<sub>3</sub> treatments as  
18 characteristically different from the rest, and the difference stemmed from the expression  
19 patterns of *lysenin* and *SOD* common to both *E. andrei* and *E. fetida*. At 2 h, however, the two  
20 species showed a contrasting expression profiles for *lysenin* and *MT* for all treatments,  
21 indicating an inherent species specificity that may be a function of time.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

### 49 **3.6. Exploration of time- and treatment-specific gene expression patterns**

51 In contrast to PCA, CA is a more direct approach to visualize the multidimensional  
52 datasets in simpler plots without z-transformation. This makes the interpretation easier when  
53 the temporal aspects of two treatments are compared to identify common and uncommon  
54 features of gene response patterns. For a reference, results from the univariate statistics are  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 presented in Fig. S4. In CA, we directly compared AgNP datasets to AuNP or AgNO<sub>3</sub> to  
4 explore features specific to NPs or AgNO<sub>3</sub>, respectively. In general to both of *E. andrei* and  
5 *E. fetida*, the two genes *lysenin* and *MT* had the highest contributions in the opposite direction  
6 to the first axis (Dimension 1) that explains >50% of the variations of the data analyzed (Fig.  
7 6). This reflects the tendency common to both species, as identified in PCA, that *lysenin* is  
8 induced when *MT* is down-regulated and that the relative expression levels of these two genes  
9 are more pronounced than other genes tested. Intriguingly, the second axis (Dimension 2)  
10 appears to characterize the temporal aspects. In *E. andrei* *lysenin* is on the opposite side of  
11 *SOD* and *TLR*, with *MT* localized in the middle, where *lysenin* is positively correlated with the  
12 2 h profiles, and *MT* with the 12 h profiles (Fig. 6a and 6c). Of particular note is that the  
13 AgNP treatment and to a lesser extent the AuNP treatment were also negatively correlated  
14 with *lysenin* and positively with *SOD/TLR* at the 24 h time point. What this tells us is that,  
15 irrespectively of the treatment types, *lysenin* was induced at 2 h and down-regulated towards  
16 24 h, while *MT* was induced when *lysenin* expression was at the baseline level at 12 h. In the  
17 AgNP/AuNP treatments, concurrent with the suppression of *lysenin* at 24 h (AgNP,  $p = 0.002$ ;  
18 AuNP,  $p = 0.039$ ), induction of *SOD* (AgNP,  $p = 0.006$ ) and *TLR* became apparent (Fig. S4a).  
19 In *E. fetida*, on the second axis *MT* is now closer to *lysenin*, being opposite to *SOD* and *TLR*  
20 (Fig. 6b and 6d). Unlike *E. andrei*, the induction of *TLR* by AgNP and AuNP was observed at  
21 2 h (AgNP,  $p = 0.022$ ; AuNP,  $p = 0.020$ ), while it was not affected by AgNO<sub>3</sub> (Fig. S4b). The  
22 comparison between the AgNP and AgNO<sub>3</sub> treatments revealed some similarity in the  
23 expression profiles, except that there was a fair contribution of *LuRP* to the second axis in  
24 general pushing the AgNO<sub>3</sub> profiles to negative scores (Fig. 6d). Apart from *LuRP*, both  
25 treatments were mainly characterized by suppression of *lysenin* at 2 h (AgNO<sub>3</sub>,  $p = 0.005$ ) and  
26 24 h (AgNP,  $p \leq 0.001$ ; AgNO<sub>3</sub>,  $p = 0.003$ ), and gradual induction of *MT* towards 24 h  
27 (AgNP,  $p = 0.006$ ; AgNO<sub>3</sub>,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. S4b). As identified in PCA, common to both  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 species is that AgNPs down-regulated *lysenin* at 24 h concurrent with induction of *SOD* and  
4 additionally *MT* in the case of *E. fetida*. Gene responses to AgNPs and AgNO<sub>3</sub> showed similar  
5  
6 patterns in both species with some exceptions possibly due to large biological variations in the  
7  
8 genes such as *MT* and *LuRP* (see the controls in Fig. S4).  
9

10  
11  
12 As another factor that differentiated between the two species, basal expression levels  
13 of the genes *lumbricin*, *lysenin* and *SOD* were higher in *E. andrei*, whereas *TLR*, *LuRP* and  
14  
15 *MT* in *E. fetida* were highly inducible under stress conditions (Table S3). Temporal  
16  
17 expression profiles shed further light on that *E. fetida* coelomocytes are undoubtedly more  
18  
19 sensitive to the examined treatments (Fig. 5a), but between the two species the complete gene  
20  
21 expression patterns were not entirely distinguished (Fig. S4a). Generally, *MT* (metal  
22  
23 detoxification) and *lysenin* expression were more prominent compared to the other tested  
24  
25 genes. As previously observed in *E. fetida*, *MT* and *lysenin* regulation changed rapidly by  
26  
27 environmental stressors, therefore it is considered to be an early biomarker of stress<sup>56</sup>.  
28  
29 Consistent with our results, Hayashi *et al.*, (2016)<sup>35</sup> observed *MT* induction and opposing  
30  
31 down-regulation of *lysenin* over time following 2-24 h exposure of *E. fetida* coelomocytes to  
32  
33 AgNPs (NM-300K, 15 nm) and AgNO<sub>3</sub>. Therefore our results are consistent with these  
34  
35 previous findings and bear out the use of these genes as biomarkers upon metal burdens<sup>56</sup>. Not  
36  
37 only *MT* but also the increasing expression of *SOD* in both species also suggests the onset of  
38  
39 oxidative stress response, characterized by activation of the anti-oxidative defense system in  
40  
41 cooperation with quenching of thiol-reactive metals. In particular, *SOD* is responsible for the  
42  
43 attenuation of free superoxide radicals, and its up-regulation was documented for mice lung  
44  
45 tissues exposed to AgNPs<sup>57</sup>. Similar phenomena were observed after exposure of human  
46  
47 hepatoma cells to AgNPs<sup>58</sup>.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55  
56 Furthermore, early induction (at 2 h) of the pattern recognition receptor *TLR* in *E.*  
57  
58 *fetida* is possibly a result of the macrophage-like cells interacting with NPs<sup>35, 59</sup>. Upon pattern  
59  
60

1  
2  
3 recognition receptor engagement by NPs, it is plausible that antimicrobial peptides expression  
4 is increased, however, our findings revealed that *lumbricin* and *LuRP* mRNA expression had a  
5 rather constitutive pattern following pathogen treatment in *E. andrei* coelomocytes<sup>21, 35</sup>.  
6  
7  
8  
9

10 Although we did not observe cytotoxicity of AuNPs at the concentration used,  
11 significantly differential expression patterns were evidenced for *TLR*, *lysenin* and *MT* (Fig.  
12 S4), possibly indicating mechanisms that are not directly related to cell death but rather the  
13 interactions with NPs. For instance, in *Sparus aurata* fish AuNPs altered expression of genes  
14 involved in antioxidant and innate immune responses while not affecting expression of *sod*<sup>60</sup>.  
15 The potential impact of AuNPs on innate immunity is therefore a topic that may deserve  
16 further attention upon establishment of dose-response relationship on an immune-related  
17 parameter, not cytotoxicity.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

### 30 **3.7. AgNPs preferentially interact with lysenins and regulate their secretion under** 31 **exposure conditions** 32 33

34 We have previously documented the species-specific formation of protein coronas  
35 using *E. fetida* coelomic proteins (EfCP), where the family of lysenin proteins showed  
36 characteristic enrichment at both 15 and 75 nm AgNPs<sup>34</sup>. On the other hand, the properties of  
37 neither *E. andrei* coelomic proteins (EaCP) nor the combination with AuNPs' have been  
38 investigated yet. Since basal gene expression level of lysenin is different in *Eisenia* spp.<sup>27, 61</sup>,  
39 with a particular focus of lysenins we hereby analyzed the compositions of protein coronas to  
40 identify proteins that have high affinity for AgNP but also for AuNPs. As previously  
41 performed, EaCP and EfCP were harvested after incubating coelomocytes in culture media  
42 without serum supplement. In this study, however, we used BSA as a background protein  
43 source to ensure a high protein concentration enough to prevent protein-induced  
44 agglomeration of NPs. This approach also emphasizes the specificity of NP-protein  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 interactions in the same way as immunostaining where BSA or milk proteins are commonly  
4 used for blocking non-specific binding. Indeed, despite the high abundance of BSA (66 kDa  
5 bands) in the incubation mix ("Reference"), enrichment of CP-specific proteins (38, 40 and 45  
6 kDa bands) were observed for protein coronas formed around AgNPs or AuNPs (Fig. 7a). The  
7 minor interactions of both AgNPs and AuNPs with BSA were also evident as there were only  
8 little differences in the band intensities for BSA between the CP-spiked samples and "No-  
9 spike" controls (Fig. 7a).

10  
11  
12 Previously, we have shown the specificity of lysenin, a major protein component of  
13 EfCP, in the interaction with AgNPs and not with silica NPs<sup>34</sup>. In this study, we used AuNPs  
14 for a comparison as they have a similar chemical property with AgNPs in terms of the surface  
15 reactivity with thiols. To our surprise, the Western blot analysis rather proved that binding of  
16 lysenins (38 kDa and 40 kDa bands) is restricted to AgNPs, excluding the possibility for thiol-  
17 driven interactions (Fig. 7a). Surface hydrophobicity could contribute to the preferential  
18 binding of lysenins, as discussed earlier<sup>34</sup>, but we do not know the exact mechanism behind  
19 the specificity of this interaction. As for the species differences, we have noted a clear  
20 difference in lysenin proteins (38 kDa and 40 kDa bands) between EaCP and EfCP, and thus  
21 the resulting protein coronas around AgNPs (Fig. 7a, Western blot, also marked with red  
22 arrows in the SDS-PAGE gel).

23  
24  
25 To identify these proteins as well as the 45 kDa proteins that were enriched both by  
26 AgNPs and AuNPs, we performed LC-MS/MS following excision of those bands (from both  
27 species but only the bands representing corona proteins associated with AgNPs). This verified  
28 the identity of the proteins from the lysenin family (lysenin and lysenin-related protein 2;  
29 LRP2), whereas the 45 kDa bands were likely represented by actin (Table S4). As we detected  
30 both lysenin and LRP2 to the same extent in the 38 and 40 kDa bands from both species, it  
31 could be that the 40 kDa band corresponds to LRP2, a slightly larger variant of lysenin.



1  
2  
3 Unfortunately, it was not possible to confirm this because the two lysenin proteins share a  
4 high similarity in amino acid sequence (89% identity) and thus no distinction was made for  
5 the 40 kDa band observed in *E. andrei*, where only single band was visible for the lysenin  
6 proteins.  
7  
8  
9

10  
11  
12 In addition to the lysenin protein family, actin is also a constituent of protein coronas  
13 formed around AgNPs<sup>34</sup>. Although actin is considered as cytosolic proteins, its putative role  
14 as a secreted, extracellular protein is also emerging for invertebrate organisms. For example,  
15 extracellular actin from cell-free hemolymph is able to attach to the surface of diverse  
16 bacterial strains<sup>62</sup>. Alijagic *et al.*, (2019)<sup>63</sup> have also identified actin in the complex protein  
17 corona on titanium-dioxide NPs after *in vitro* exposure of sea urchin immunocytes. It is thus  
18 plausible that earthworm extracellular actin may possess an analogous role with actin of  
19 insects, gastropods and echinoderms (e.g. mediating phagocytosis and killing bacteria)<sup>63, 64</sup>.  
20  
21 As the binding of actin was likely the case for both AgNPs and AuNPs, future studies may  
22 benefit from characterization of extracellular actin in the context of innate immunity in  
23 particular in relation to pattern recognition mechanisms. Nevertheless, this study has provided  
24 an experimental evidence that species differences at NPs can manifest even for a pair of  
25 closely-related species due to the inherent difference in the protein repertoire, such as the  
26 composition of the lysenin protein family. The specific enrichment of lysenins at AgNPs  
27 despite the high BSA background also signifies that a similar result can be assumed for the  
28 exposure conditions used here in other cell assays (i.e. culture media supplemented with 1%  
29 FBS), as we previously demonstrated using a larger size of AgNPs<sup>34</sup>. As this assumption is  
30 largely influenced by the secretion level of lysenins *in situ*, we next tested the effects of  
31 AgNPs and AuNPs on the lysenin secretion profile.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

54  
55  
56 We have previously investigated the protein secretion profile of *E. fetida*  
57 coelomocytes treated with a low-cytotoxic concentration of 15 nm AgNPs and observed an  
58  
59  
60

1  
2  
3 apparently higher level of lysenin secretion at 2 h that consistently decreased towards 24 h<sup>35</sup>.  
4  
5 In the present study, we applied the same methodology but with additional confirmation by  
6  
7 Western blotting in an attempt to compare with the differential expression profile of the  
8  
9 *lysenin* gene. We first confirmed that the lysenin secretion in the controls was in the same  
10  
11 range as the concentration of lysenins in the CP-spiked "Reference protein" controls (Fig. 7b  
12  
13 and c), validating the relevance of the *ex situ* protein corona profiling study (Fig. 7a). Notably  
14  
15 for both earthworm species, exposure to AgNPs or AuNPs initially resulted in higher  
16  
17 secretion of lysenins at 4 h compared to the controls (Fig. 7b and c). Subsequently, the  
18  
19 amount of lysenins diminished at 24 h (Fig. 7b and c) concurrently with down-regulation of  
20  
21 the gene (except for the 24 h exposure of *E. fetida* coelomocytes to AuNPs) (Fig. S4). This  
22  
23 indicates that the secretion profile of lysenins generally follows the pattern of the  
24  
25 differentially expressed *lysenin* gene, and that even without the CP-spikes the formation of  
26  
27 lysenin-rich protein coronas on AgNPs may take place in the presence of coelomocytes. As  
28  
29 the regulation of the gene and secretion of the protein were in general common to both AgNPs  
30  
31 and AuNPs, in addition to the significant impact of AgNO<sub>3</sub> on the gene expression, lysenins  
32  
33 are likely stress-regulated proteins that have immunological functions.  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 Given its putative role for AgNP uptake in coelomocytes<sup>34</sup>, the family of lysenin  
41  
42 proteins may represent a non-mammalian translation of acute-phase reactions that could affect  
43  
44 the kinetics of NP uptake via a negative feedback loop *in vitro* and *in vivo* in *Eisenia*  
45  
46 earthworms.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Conclusions

The interaction of NPs and immune systems is poorly understood, in particular in invertebrate models as NPs may acquire a rather species-specific biological identity that is largely different from the well-studied mammalian models<sup>34</sup>. This emerging aspect of NPs adds another dimension to the susceptibility of the exposed organisms in the environment that is primarily represented by chemical tolerance. Demonstrated in the present study is the differential sensitivity to noble metal NPs in coelomocytes of two closely-related earthworm species that have been historically used in ecotoxicological studies. In general, *E. fetida* coelomocytes showed greater sensitivity to AgNPs compared to *E. andrei*, whereas we could not determine species sensitivity to AuNPs for the concentration range tested. The higher cell death at 24 h in *E. fetida* was also supported by the higher degree of apoptosis-related sub-cellular events such as mitochondrial membrane depolarization, caspase 3 activation and DNA damages at 24 h. Exception was the intracellular redox balance represented by ROS and NO levels, where both *Eisenia* spp. showed responses to a similar extent or possibly even more prominent in *E. andrei* revealing rapid quenching of excess ROS by 4 h. The gene expression profiles indeed suggest involvement of antioxidant mechanisms such as *SOD* in both species, and persistent up-regulation of *MT* in *E. fetida* underscoring the thiol-mediated detoxification process towards 24 h. Furthermore, rapid regulation of an immune-related gene (*TLR*) was evident in *E. fetida* coelomocytes as an NP-specific response common to AgNPs and AuNPs, which may not be related to redox/cytotoxicity but rather to cellular interactions at the initial phase of exposure. In both species, expression/secretion of lysenins seems to be stress-regulated and this implies a complex feedback mechanism for AgNPs because lysenins are specifically enriched by AgNPs and known to enhance uptake by earthworm coelomocytes.

1  
2  
3 One possible explanation for the higher responsiveness of *E. fetida* is that its natural  
4 living environment is considerably different from that of *E. andrei*. Specifically, *E. andrei*  
5 flourishes in microbe-rich compost while *E. fetida* subsists in moist forest soil, underlining  
6 genetic alterations in sensibility, susceptibility, as well as tolerance of their immune system  
7 evolved through natural selection<sup>27</sup>. Our findings reveal the preference of *E. fetida* in contrast  
8 to *E. andrei* in immuno-toxicological studies on nanomaterials not only because of the species  
9 sensitivity identified in this study but also it better represents the soil ecosystem as a keystone  
10 species.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

### 24 **Acknowledgements**

25  
26 We are grateful to Dr. László Molnár and Dániel Dunai (Faculty of Sciences,  
27 University of Pécs) for providing earthworm specimens. We would like to thank the help of  
28 Prof. Dr. László Seress and Tünde Faragó (University of Pécs) for sample preparation and  
29 TEM imaging. We are also grateful to Emese Papp, László Girán (University of Pécs) for  
30 their technical assistance and to Dr. Éva Csősz, Dr. Zsolt Czimmerer (University of Debrecen)  
31 and for Dr. Mirna Velki (Josip Juraj Strossmayer University, Croatia) for their help. We  
32 acknowledge the financial support to Medical School Research Foundation University of Pécs  
33 (PTE-ÁOK-KA 2017/4), GINOP-232-15-2016-00050, EFOP-361-16-2016-00004. The work  
34 was supported by the ÚNKP-19-3-I New National Excellence Program of the Ministry for  
35 Innovation and Technology to KB, the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian  
36 Academy of Sciences to PE and by Lundbeck Foundation through a post-doctoral fellowship  
37 (R219-2016-327) given to YH. Electron microscopic studies were funded by the grant  
38 GINOP-2.3.3-15-2016-0002. Mass spectrometry analysis was carried out at the BMBI  
39 Proteomics Core Facility, University of Debrecen. The Orbitrap Fusion mass spectrometer  
40 was provided by grant: GINOP-2.3.3-15-2016-00020 for the Proteomics Core Facility. GG  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 and AK kindly acknowledge the financial support received from grants EFOP-3.6.2-16-2017-  
4  
5 00005 and TUDFO/47138-1/2019 (ITM FIKP program).  
6  
7  
8  
9

### 10 **Author contributions**

11  
12 Conceptualization and experimental design: KB, EP, YH. Performing experiments:  
13  
14 KB, EP, GG, ZL, AK, ET, MM. Data analysis: KB, EP, YH. Reagents/tools/technical  
15  
16 assistance: KB, YH, EP, GG, MD, BK, TG, PN. Writing manuscript: KB, EP, YH.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

- 1 X. Zhao, H. Zhao, L. Yan, N. Li, J. Shi, and C. Jiang, Recent developments in detection using noble metal nanoparticles, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2019, **27**, 1-14.
- 2 V. Vio, M. J. Marchant, E. Araya, and M. J. Kogan, Metal nanoparticles for the treatment and diagnosis of neurodegenerative brain diseases, *Curr. Pharm. Des.*, 2017, **23**, 1916-1926.
- 3 G. Soni, and K. S. Yadav, Applications of nanoparticles in treatment and diagnosis of leukemia, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, 2014, **47**, 156-64.
- 4 I. Negut, V. Grumezescu, and A. M. Grumezescu, Treatment strategies for infected wounds, *Molecules*, 2018, **23**, 2392.
- 5 D. Cabuzu, A. Cirja, R. Puiu, and A. M. Grumezescu, Biomedical applications of gold nanoparticles, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2015, **15**, 1605-13.
- 6 N. Prajitha, S. S. Athira, and P. V. Mohanan, Bio-interactions and risks of engineered nanoparticles, *Environ. Res.*, 2019, **172**, 98-108.
- 7 W. Lai, Q. Wang, L. Li, Z. Hu, J. Chen, and Q. Fang, Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: Analysis of protein corona reveals specific binding patterns, *Colloids Surf. B. Biointerfaces.*, 2017, **152**, 317-325.
- 8 D. Soni, P. K. Naoghare, S. Saravanadevi, and R. A. Pandey, Release, transport and toxicity of engineered nanoparticles, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2015, **234**, 1-47.
- 9 J. Das, Y. J. Choi, H. Song, and J. H. Kim, Potential toxicity of engineered nanoparticles in mammalian germ cells and developing embryos: treatment strategies and anticipated applications of nanoparticles in gene delivery, *Hum. Reprod. Update*, 2016, **22**, 588-619.
- 10 B. Fadeel, Hide and seek: nanomaterial interactions with the immune system, *Front. Immunol.*, 2019, **10**, 133.
- 11 M. A. Zoroddu, S. Medici, A. Ledda, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, and M. Peana, Toxicity of nanoparticles, *Curr. Med. Chem.*, 2014, **21**, 3837-53.
- 12 R. de Lima, A. B. Seabra, and N. Durán, Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles, *J. Appl. Toxicol.*, 2012, **32**, 867-79.
- 13 L. L. Maurer, and J. N. Meyer, A systematic review of evidence of silver nanoparticle-induced mitochondrial toxicity, *Env. Sci. Nano*, 2016, **3**, 311-22.
- 14 Y. Hayashi, P. Engelmann, R. Foldbjerg, M. Szabó, I. Somogyi, E. Pollák, L. Molnár, H. Autrup, D. S. Sutherland, J. J. Scott-Fordsmand, and L. H. Heckmann, Earthworms

- 1  
2  
3 and humans *in vitro*: characterizing evolutionarily conserved stress and immune  
4 responses to silver nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 4166-73.  
5  
6  
7 15 P. S. Tourinho, C. A. van Gestel, S. Lofts, C. Svendsen, A. M. Soares, and S.  
8 Loureiro, Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil  
9 invertebrates, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2012, **31**, 1679-92.  
10  
11  
12 16 C. Tao, Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles: research progress,  
13 challenges and prospects, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2018, **67**, 537-543.  
14  
15  
16 17 U. Müller, P. Vogel, G. Alber, and G. A. Schaub, The innate immune system of  
17 mammals and insects, *Contrib. Microbiol.*, 2008, **15**, 21-44.  
18  
19  
20 18 P. Engelmann, Y. Hayashi, K. Bodó, and L. Molnár, in *Lessons in immunity: from*  
21 *single cell organism to mammals*, ed. L. Ballarin and M. Cammarata, Elsevier,  
22 Amsterdam, 1stedn., 2016, ch. 4, pp 53-66.  
23  
24  
25 19 E. L. Cooper, E. Kauschke, and A. Cossarizza, Digging for innate immunity since  
26 Darwin and Metchnikoff, *Bioessays*, 2002, **24**, 319-33.  
27  
28  
29 20 S. Ečimović, M. Velki, R. Vuković, I. Štolfa Čamagajevac, A. Petek, R. Bošnjaković,  
30 M. Grgić, P. Engelmann, K. Bodó, V. Filipović-Marijić, D. Ivanković, M. Erk, T.  
31 Mijošek, and Z. Lončarić, Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on  
32 oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm  
33 *Eisenia andrei*, *Chemosphere*, 2018, **212**, 307-318.  
34  
35  
36 21 K. Bodó, Á. Boros, É. Rumpler, L. Molnár, K. Böröcz, P. Németh, and P. Engelmann,  
37 Identification of novel lumbricin homologues in *Eisenia andrei* earthworms, *Dev.*  
38 *Comp. Immunol.*, 2019, **90**, 41-46.  
39  
40  
41 22 R. Josková, M. Silerová, P. Procházková, and M. Bilej, Identification and cloning of  
42 an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei*, *Dev. Comp. Immunol.*, 2009, **33**,  
43 932-8.  
44  
45  
46 23 P. Procházková, M. Silerová, J. Felsberg, R. Josková, A. Beschin, P. De Baetselier,  
47 and M. Bilej, Relationship between hemolytic molecules in *Eisenia fetida* earthworms,  
48 *Dev. Comp. Immunol.*, 2006, **30**, 381-92.  
49  
50  
51 24 P. Engelmann, L. Pálinkás, E. L. Cooper, and P. Németh, Monoclonal antibodies  
52 identify four distinct annelid leukocyte markers, *Dev. Comp. Immunol.*, 2005, **29**,  
53 599-614.  
54  
55  
56 25 Y. Hayashi, L. H. Heckmann, V. Simonsen, and J.J. Scott-Fordsmand, Time-course  
57 profiling of molecular stress responses to silver nanoparticles in the earthworm  
58 *Eisenia fetida*, *Ecotox. Env. Saf.*, 2013, **98**: 219-226.  
59  
60  
61 26 A. Rorat, N. Kachamakova-Trojanowska, A. Jozkowicz, J. Kruk, C. Cocquerelle, F.  
62 Vandenbulcke, M. Santocki, and B. Plytycz, Coelomocyte-derived fluorescence and  
DNA markers of composting earthworm species, *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet.*  
*Physiol.*, 2014, **321**, 28-40.

- 1  
2  
3  
4 27 J. Dvořák, V. Mančíková, V. Pižl, D. Elhottová, M. Silerová, R. Roubalová, F. Skanta,  
5 P. Procházková, and M. Bilej, Microbial environment affects innate immunity in two  
6 closely related earthworm species *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida*, *PLoS One*, 2013,  
7 **8**, e79257.  
8  
9  
10 28 L. Molnár, P. Engelmann, I. Somogyi, L. L. Mácsik, and E. Pollák, Cold-stress  
11 induced formation of calcium and phosphorous rich chloragocyte granules  
12 (chloragosomes) in the earthworm *Eisenia fetida*, *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol.*  
13 *Integr. Physiol.*, 2012, **163**, 199-209.  
14  
15  
16 29 M. Mészáros, G. Porkoláb, L. Kiss, A. M. Pilbat, Z. Kóta, Z. Kupihár, A. Kéri, G.  
17 Galbács, L. Siklós, A. Tóth, L. Fülöp, M. Csete, Á. Sipos, P. Hülper, P. Sipos, T. Páli,  
18 G. Rákhely, P. Szabó-Révész, M. A. Deli, and S. Veszeka, Niosomes decorated with  
19 dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across  
20 the blood-brain barrier, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2018, **15**, 228-240.  
21  
22  
23 30 G. Gerencsér, K. Szendi, K. Berényi, and C. Varga, Can the use of medical muds  
24 cause genotoxicity in eukaryotic cells? A trial using comet assay, *Environ. Geochem.*  
25 *Health*, 2015, **37**, 63-70.  
26  
27  
28 31 S. N. Peirson, J. N. Butler, and R. G. Foster, Experimental validation of novel and  
29 conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis, *Nucleic Acids*  
30 *Res.*, 2003, **31**, e73.  
31  
32 32 L. H. Heckmann, P. Sorensen, P. Krogh, and J. Sorensen, NORMA-Gene: A simple  
33 and robust method for qPCR normalization based on target gene data, *BMC*  
34 *Bioinformatics*, 2011, **12**, 250.  
35  
36  
37 33 S. Le, J. Josse, and F. Husson, FactoMineR: An R package for multivariate analysis,  
38 *Journal of Statistical Software*, 2008, **25**, 1-18.  
39  
40 34 Y. Hayashi, T. Miclaus, C. Scavenius, K. Kwiatkowska, A. Sobota, P. Engelmann, J.  
41 J. Scott-Fordsmand, J. J. Enghild, and D. S. Sutherland, Species differences take shape  
42 at nanoparticles: protein corona made of the native repertoire assists cellular  
43 interaction, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 14367-75.  
44  
45  
46 35 Y. Hayashi, T. Miclaus, P. Engelmann, H. Autrup, D. S. Sutherland, and J. J. Scott-  
47 Fordsmand, Nanosilver pathophysiology in earthworms: Transcriptional profiling of  
48 secretory proteins and the implication for the protein corona, *Nanotoxicology*, 2016,  
49 **10**, 303-11.  
50  
51  
52 36 B. S. Zolnik, A. González-Fernandez, N. Sadrieh, and M. A. Dobrovolskaia,  
53 Nanoparticles and the immune system, *Endocrinology*, 2010, **151**, 458-65  
54  
55 37 M. J. van der Ploeg, R. D. Handy, P. L. Waalewijn-Kool, J. H. Van den Berg, Z. E.  
56 Herrera Rivera, J. Bovenschen, B. Molleman J. H. Baveco, P. Tromp, R. J. Peters, G.  
57 F. Koopmans, I. M. Rietjens, and N. W. van den Brink, Effects of silver nanoparticles  
58 (NM-300K) on *Lumbricus rubellus* earthworms and particle characterization in relevant  
59 test matrices including soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 2014, **33**, 743-752.  
60



- 1  
2  
3  
4 38 P. V. Asharani, Y. Lianwu, Z. Gong, and S. Valiyaveetil, Comparison of the toxicity  
5 of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos,  
6 *Nanotoxicology*, 2011, **5**, 43-54.  
7  
8  
9 39 J. M. Unrine, S. E. Hunyadi, O. V. Tsyusko, W. Rao, W. A. Shoults-Wilson, and P.  
10 M. Bertsch, Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and  
11 biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). *Environ. Sci Technol.*, 2010, **44**,  
12 8308-13.  
13  
14 40 C. Lopez-Chaves, J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, J. Llopis, and C.  
15 Sanchez-Gonzalez, Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. *In*  
16 *vitro* and *in vivo* studies, *Nanomedicine*, 2018, **14**, 1-12.  
17  
18 41 S. Y. Choi, S. Jeong, S. H. Jang, J. Park, J. H. Park, K. S. Ock, S. Y. Lee, and S. W.  
19 Joo, *In vitro* toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in  
20 human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol. in vitro*, 2012, **26**, 229-37.  
21  
22 42 H. P. Borase, S. V. Patil, and R. S. Singhal, *Moina macrocopa* as a non-target aquatic  
23 organism for assessment of ecotoxicity of silver nanoparticles: effect of size,  
24 *Chemosphere*, 2019, **219**, 713-723.  
25  
26 43 B. H. Mao, J. C. Tsai, C. W. Chen, S. J. Yan, and Y. J. Wang, Mechanisms of silver  
27 nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy, *Nanotoxicology*, 2016,  
28 **10**, 1021-40.  
29  
30 44 C. S. Patricia, G. V. Nerea, U. Erik, S. M. Elena, B. Eider, D. M. W. Darío, and S.  
31 Manu, Responses to silver nanoparticles and silver nitrate in a battery of biomarkers  
32 measured in coelomocytes and in target tissues of *Eisenia fetida* earthworms,  
33 *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2017, **141**, 57-63.  
34  
35 45 A. M. Khalil, Physiological and genotoxicological responses of the earthworms  
36 *Aporrectodea caliginosa* exposed to sublethal concentrations of AgNPs. *J. Basic &*  
37 *Appl. Zool.*, 2016, **74**, 8-15.  
38  
39 46 M. Novo, E. Lahive, M. Díez-Ortiz, M. Matzke, A. J. Morgan, D. J. Spurgeon, C.  
40 Svendsen, and P. Kille, Different routes, same pathways: Molecular mechanisms  
41 under silver ion and nanoparticle exposures in the soil sentinel *Eisenia fetida*, *Environ.*  
42 *Pollut.*, 2015, **205**, 385-93.  
43  
44 47 A. H. Ringwood, M. McCarth, T. C. Bates, and D. L. Carroll, The effects of silver  
45 nanoparticles on oyster embryos, *Mar. Environ. Res.*, 2010, **69**, S49-51.  
46  
47 48 M. Ahamed, R. Posgai, T. J. Gorey, M. Nielsen, S. M. Hussain, and J. J. Rowe, Silver  
48 nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in  
49 *Drosophila melanogaster*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010, **242**, 263-9.  
50  
51 49 J. Y. Roh, S. J. Sim, J. Yi, K. Park, K. H. Chung, D. Y. Ryu, and J. Choi, Ecotoxicity  
52 of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional  
53 ecotoxicogenomics, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 3933-40.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 50 E. Barcinska, J. Wierzbicka, A. Zauszkiewicz-Pawlak, D. Jacewicz, A. Dabrowska,  
5 and I. Inkielewicz-Stepniak, Role of oxidative and nitro-oxidative damage in silver  
6 nanoparticles cytotoxic effect against human pancreatic ductal adenocarcinoma cells.  
7 *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2018, **2018**, 8251961.  
8  
9  
10 51 M. Auguste, C. Ciacci, T. Balbi, A. Brunelli, V. Caratto, A. Marcomini, R. Cuppini,  
11 and L. Canesi, Effects of nanosilver on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes and early  
12 embryo development, *Aquatic Toxicol.*, 2018, **203**, 107-116.  
13  
14 52 R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D. A. Dang, H. J. Hoffmann, and H. Autrup,  
15 PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species,  
16 apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes, *Toxicol. Lett.*, 2009, **190**, 156-162.  
17  
18 53 M. Ghooshchian, P. Khodarahmi, and F. Tafvizi, Apoptosis-mediated neurotoxicity  
19 and altered gene expression induced by silver nanoparticles, *Toxicol. Ind. Health*,  
20 2017, **33**, 757-764.  
21  
22 54 M. J. Ribeiro, M. J. B. Amorim, and J. J. Scott-Fordsmand, Cell *in vitro* testing with  
23 soil invertebrates- challenges and opportunities toward modeling the effect of  
24 nanomaterials: a surface-modified CuO case study, *Nanomaterials (Basel)*, 2019, **9**,  
25 1087.  
26  
27 55 R. Elespru, S. Pfuhrer, M. J. Aardema, T. Chen, S. H. Doak, A. Doherty, C. S.  
28 Farabaugh, J. Kenny, M. Manjanatha, B. Mahadevan, M. M. Moore, G. Ouedraogo, L.  
29 F. Stankowski, and J. Y. Tanir, Genotoxicity assessment of nanomaterials:  
30 recommendations on best practices, assays, and methods, *Toxicol. Sci.*, 2018, **164**,  
31 391-416.  
32  
33 56 F. Bernard, F. Brulle, F. Douay, S. Lemièrre, S. Demuyneck, and F. Vandebulcke,  
34 Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker  
35 candidates in *Eisenia fetida*, using an "exposure/depuration" experimental scheme  
36 with field soils, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2010, **73**, 1034-1045.  
37  
38 57 N. Asare, N. Duale, H. H. Slagsvold, B. Lindeman, A. K. Olsen, J. Gromadzka-  
39 Ostrowska, S. Meczynska-Wielgosz, M. Kruszewski, G. Brunborg, and C. Instanes,  
40 Genotoxicity and gene expression modulation of silver and titanium dioxide  
41 nanoparticles in mice, *Nanotoxicology*, 2016, **10**, 312-321.  
42  
43 58 Kim, J. E. Choi, J. Choi, K. H. Chung, K. Park, J. Yi, D. and Y. Ryu, Oxidative stress-  
44 dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells, *Toxicol. in vitro*  
45 2009, **23**, 1076-1084.  
46  
47 59 J. M. Njoroge, J. J. Yourick, and M. A. Principato, A flow cytometric analysis of  
48 macrophage-nanoparticle interaction *in vitro*: induction of altered Toll-like receptor  
49 expression. *Int. J. Nanomedic.* 2018, **13**, 8365-8378.  
50  
51 60 P. Na-Phatthalung, M. Teles, L. Tort, and M. Oliveira, Gold nanoparticles exposure  
52 modulates antioxidant and innate immune gene expression in the gills of *Sparus*  
53 *aurata*, *Genomics*, 2018, **110**, 430-434.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
- 61 F. Brulle, G. Mitta, C. Cocquerelle, D. Vieau, S. Lemièrre, A. Leprêtre, and F. Vandebulcke, Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 2844-50.
- 62 G. Tetreau, S. Pinaud, A. Portet, R. Galinier, B. Gourbal, and D. Duval, Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate, *Front. Immunol.*, 2017, **8**, 1249.
- 63 A. Alijagic, O. Benada, O. Kofroňová, D. Cigna, and A. Pinsino, Sea urchin extracellular proteins design a complex protein corona on titanium dioxide nanoparticle surface influencing immune cell behaviour, *Front. Immunol.*, 2019, **10**, 2261.
- 64 S. L. Sandiford, Y. Dong, A. Pike, B. J. Blumberg, A. C. Bahia, and G. Dimopoulos, Cytoplasmic actin is an extracellular insect immune factor which is secreted upon immune challenge and mediates phagocytosis and direct killing of bacteria, and is a *Plasmodium* antagonist, *PLoS Pathog.*, 2015, **11**, e1004631.

**Table 1. Characterization of AgNPs and AuNPs under exposure conditions.**

Nominal size	Particle type	Medium	FBS	Characterization data				
				TEM size <sup>a</sup> (nm)	z-average <sup>b</sup> (nm[PdI])	Hydrodynamic size (nm) <sup>c</sup>	ζ potential <sup>d</sup> (mV)	ICP-MS Ion content c (mg/L) (%)
10 nm	Ag	RPMI-1640	1%	15.6 nm ± 7.6	31.4 ± 6.8 [0.186]	37.8 ± 16.5	-9.9 ± 1.1	0.16 (0.4%)
10 nm	Au	RPMI-1640	1%	11.1 nm ± 4.1	33.8 ± 8.7 [0.265]	45.8 ± 19.8	-13.3 ± 0.8	0.094 (0.24%)

**Table 1. Characterization of AgNPs and AuNPs under exposure conditions.**

<sup>a</sup>Transmission electron microscopy (TEM); values are mean ± SD, n=300.

<sup>b</sup>Dynamic light scattering; values are z-average ± SD; polydispersity index (PdI).

<sup>c</sup>Dynamic light scattering; values are mean ± SD of the particle size distribution obtained by the CONTIN algorithm (shown is the value for the most representative peak).

<sup>d</sup>ζ potential; values are mean ± SD, n=3

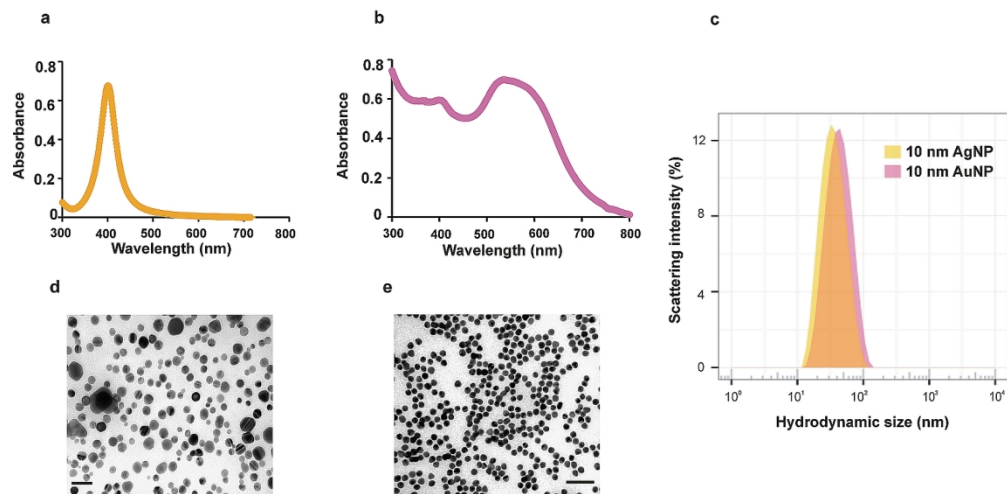


Figure 1. Colloidal stability of 10 nm AgNP and AuNP under exposure conditions. Light absorbance characteristics of localized surface plasmon resonance of 10 nm AgNPs (a) and AuNPs (b) were monitored by spectrophotometry. Representative DLS results showing the scattering intensity-based distribution of hydrodynamic sizes (nm) fitted by the CONTIN algorithm (c). Primary particle sizes of AgNPs (d) and AuNPs (e) were analyzed by TEM after desalting. Two representative images are presented from three individual experiments, scale bars: 50 nm.

150x73mm (300 x 300 DPI)

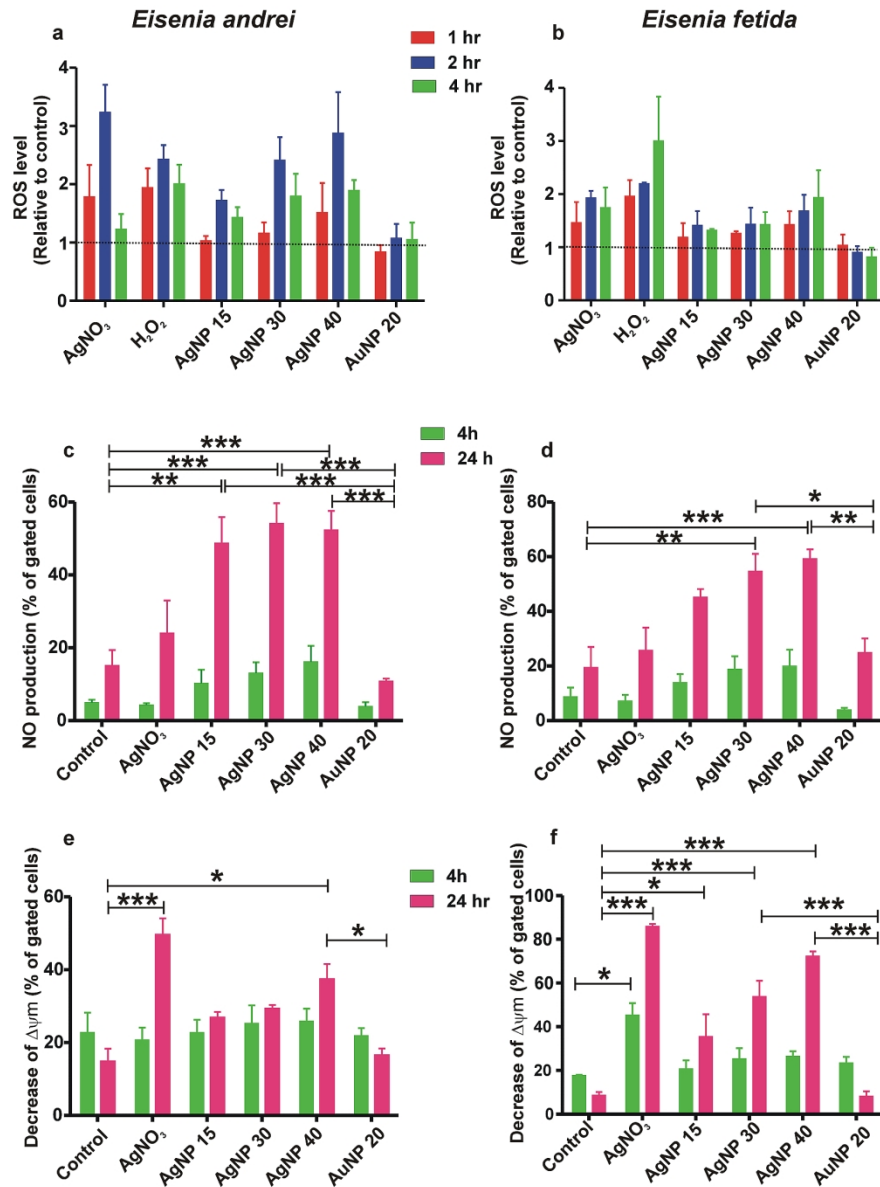


Figure 2. Evaluation of oxidative and mitochondrial stress following exposure to AgNP, AuNP or AgNO<sub>3</sub> (1.35 µg/mL). Numbers shown after "AgNP" and "AuNP" refer to the test concentration in µg/mL. Relative ROS levels in the coelomocytes of *E. andrei* (a) and *E. fetida* (b) earthworms over time (1, 2 and 4 h). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> served as positive control (100 µM). Dotted lines indicate the basal ROS levels (measured in the control at corresponding time points). Assessment of NO production (% of gated cells) in the coelomocytes of *E. andrei* (c) and *E. fetida* (d) earthworms over time (4 and 24 h). Decrease of mitochondrial membrane potential (% of gated cells) in *E. andrei* (e) and *E. fetida* (f) coelomocytes over time (4 and 24 h). Three independent measurements (n=3, mean ± SEM) were performed on flow cytometry (FL1 and FL4 filters). Asterisks (\*) denote a significant difference between the control and the treatment (or between treatments) at the specified time point (one-way ANOVA, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

150x200mm (300 x 300 DPI)

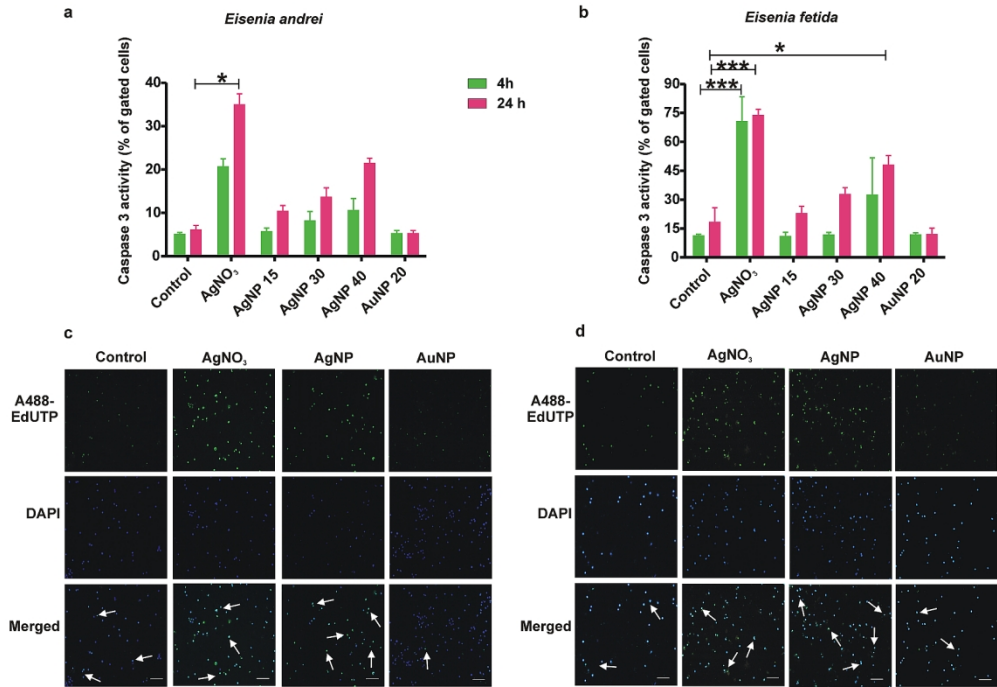


Figure 3. Apoptosis assessment following exposure to AgNP, AuNP or AgNO<sub>3</sub> (1.35 µg/mL). Numbers shown after "AgNP" and "AuNP" refer to the test concentration in µg/mL. Flow cytometry-based caspase-3 activity (% of gated cells) in coelomocytes of *E. andrei* (a) and *E. fetida* (b) over time (4 h and 24 h). Representative TUNEL-assay images of control (ddH<sub>2</sub>O), AgNO<sub>3</sub> (1.35 µg/mL), AgNP (40 µg/mL) and AuNP (20 µg/mL) exposed coelomocytes of *E. andrei* (c) and *E. fetida* (d) earthworms are shown, scale bars: 50 µm. Each measurements were conducted three times (n=3), results are represented as mean ± SEM. Asterisks (\*) denote a significant difference between the control and the treatment at the specified time point (one-way ANOVA, \**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001).

150x102mm (300 x 300 DPI)

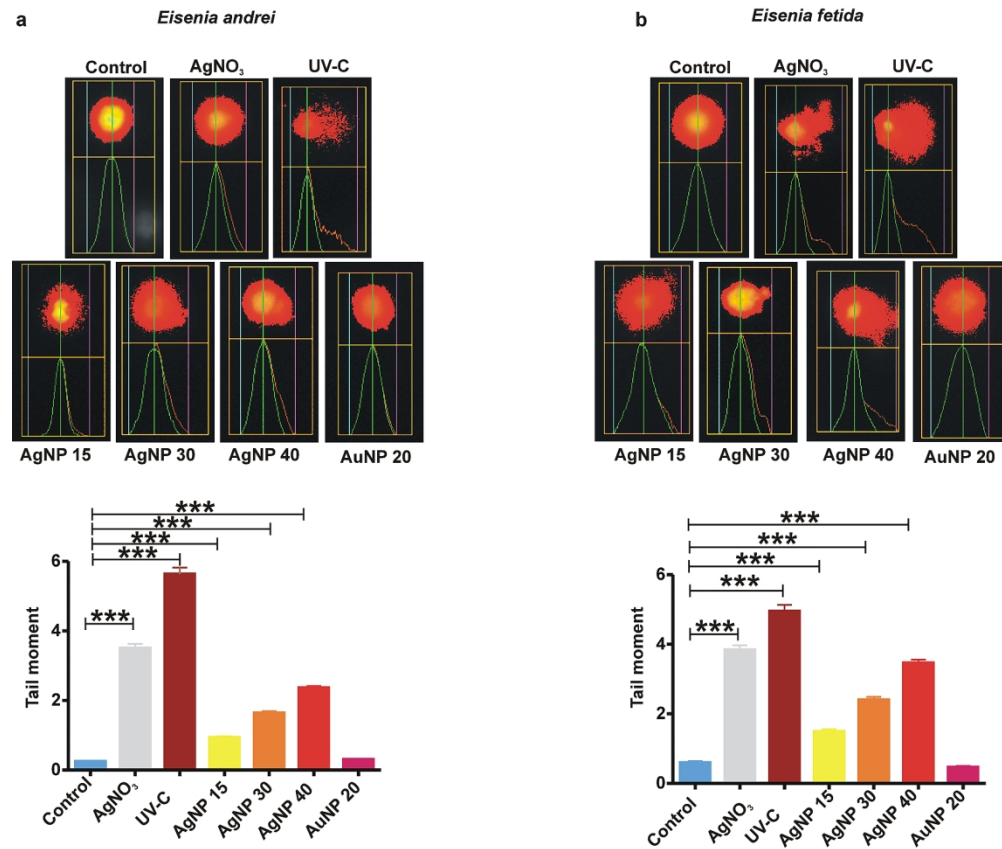


Figure 4. Degree of DNA-damage following 24 h exposure to AgNP, AuNP or AgNO<sub>3</sub> (1.35 µg/mL). Numbers shown after "AgNP" and "AuNP" refer to the test concentration in µg/mL. Comet-assay was performed in coelomocytes of *E. andrei* (a) and *E. fetida* (b). UV-C treatment served as a positive control. Representative images from one Comet-assay are shown in the top panel. Blue lines show the "front of the head", green lines the "middle of the cells" and purple lines the "end of the tail". Each treatment was independently performed three times (n=3), and in one experiment at least 80 cells were evaluated. Graphs in the bottom panels demonstrate "Tail-moment" values with standard error of the mean (±SEM). Asterisks (\*) denote a significant difference between the control and the specified treatments (one-way ANOVA, \*\*\*p < 0.001).

150x129mm (300 x 300 DPI)



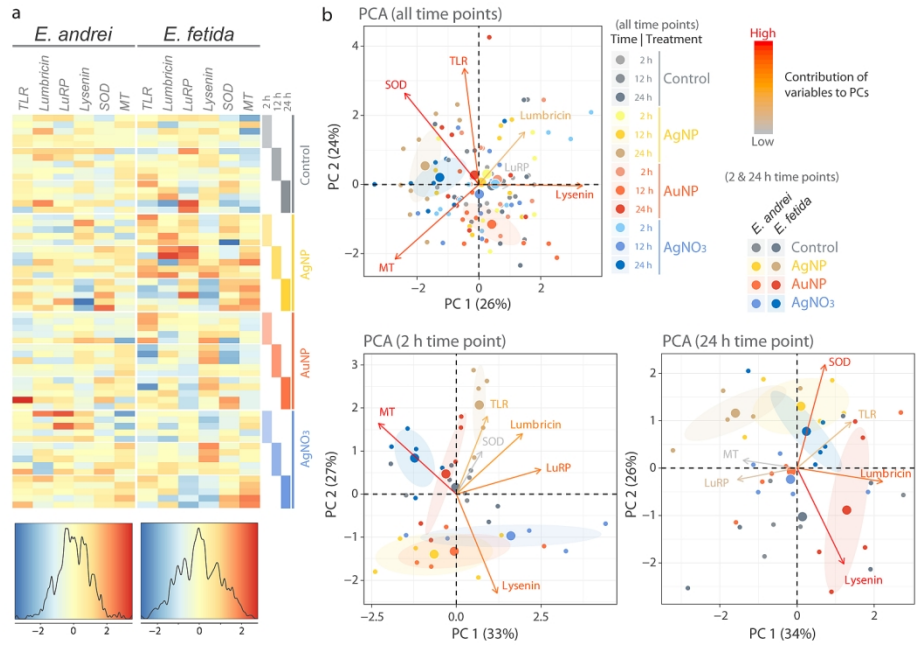


Figure 5. Heatmap and principal component analysis (PCA). The relative gene expression values are shown as a heatmap for each species along with the z-score density and a color key. Sample features are color-coded and each treatment is split into three groups (2, 12 and 24 h) consisting of 5 biological replicates (a). PCA biplots are shown for the species-pooled dataset with all-time points, or separately for the 2 h and 24 h time points with the two species color-coded. Individual samples (small dots) and mean points (large dots) are plotted according to the coordinates in the first two PCs, overlaid with variable coefficients (arrows). Contributions of the 6 variables (genes) to the two PCs are color-scaled from grey to red. Confidence ellipses are drawn for sample features that on average have greater PC scores than the rest of the samples (b).

150x96mm (300 x 300 DPI)

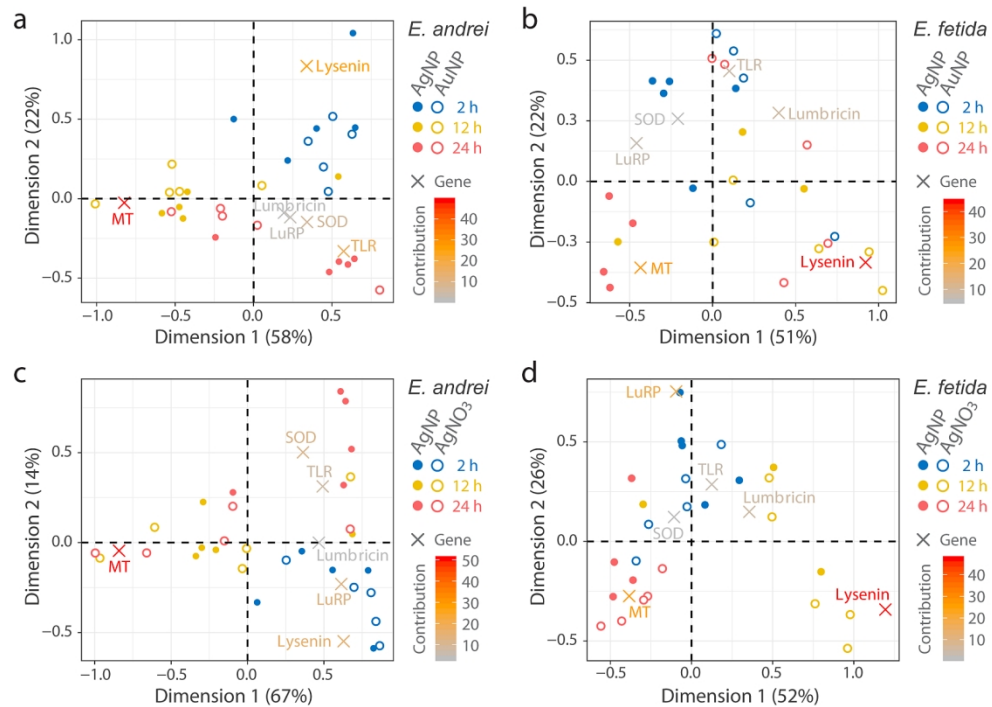


Figure 6. Correspondence analysis (CA). CA biplots for the temporal gene expression profiles are shown in a combination of AgNP and AuNP (a, b) or AgNP and AgNO<sub>3</sub> (c, d) for the two species, respectively. Individual samples (small dots or circles) and genes (crosses) are plotted according to the coordinates in the first two dimensions. Contributions of the 6 variables (genes) to the two dimensions are color-scaled from gray to red. Dots/circles (expression profiles at the specified time point) in the proximity of a cross (gene) signify an association between the exposure time and the transcriptional response, and its relative importance is determined by the contribution of the gene to each dimension. Three outlier samples were excluded from the AgNP dataset for *E. fetida* (2 replicates for the 12 h time point and 1 replicate for the 24 h time point), as they had predominant levels of LuRP expression affecting the analysis overall (b, d).

150x109mm (300 x 300 DPI)

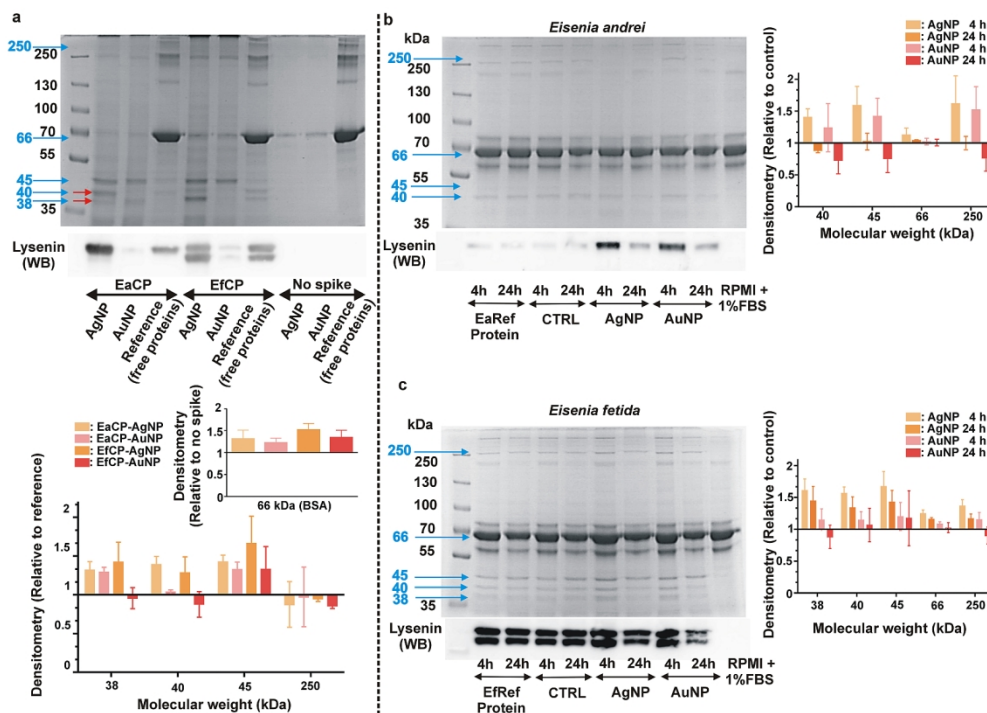


Figure 7. Ex-situ protein corona formation (a) and protein secretion profile of coelomocytes from *E. andrei* (b) and *E. fetida* (c) earthworms studied by SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining or Western blotting of lysenins. Representative gels from three independent experiments are shown. Red arrows indicate the members of the lysenin-protein family, supposedly lysenin (top arrow) and lysenin-related protein 2 (lower arrow) identified by LC-MS/MS. Blue arrows indicate lysenin (~37-38 kDa), lysenin-related protein 2 (~40kDa), other corona proteins (~45 kDa, >200 kDa) and BSA (~66 kDa). The associated graphs show the enrichment of these bands calculated as the band intensity normalized to the corresponding protein band in the reference protein lanes (a) or in the control lanes (b, c). Values represent the mean and  $\pm$  SEM. Protein corona profiles for AgNPs and AuNPs following 24 h incubation in CP-spiked cell culture media supplemented with BSA as a background protein source (a). Protein secretion profiles of *E. andrei* (b) and *E. fetida* coelomocytes (c) exposed to low-cytotoxic concentration of AgNP (*E. andrei*: 2.71  $\mu$ g/mL, *E. fetida*: 2  $\mu$ g/mL) and AuNP (20  $\mu$ g/mL). A blank (RPMI+1% FBS) is included showing serum proteins without coelomocytes. Western-blot analysis verified the dynamic changes of lysenin and lysenin-related peptide secretion (LRP) upon NP exposure.

150x108mm (300 x 300 DPI)

## ELECTRONIC SUPPLEMENTARY INFORMATION

### SPECIES-SPECIFIC SENSITIVITY TOWARDS NOBLE METAL NANOPARTICLES: A MULTIPARAMETRIC *IN VITRO* STUDY OF OECD STANDARD SOIL SENTINELS

Kornélia Bodó<sup>1</sup>, Yuya Hayashi<sup>2</sup>, Gellért Gerencsér<sup>3</sup>, Zoltán László<sup>4</sup>, Albert Kéri<sup>5,6</sup>, Gábor Galbács<sup>5,6</sup>, Elek Telek<sup>7</sup>, Mária Mészáros<sup>8</sup>, Mária A. Deli<sup>8,9</sup>, Gréta Tolnai<sup>1</sup>, Bohdana Kokhanyuk<sup>1</sup>, Péter Németh<sup>1</sup>, Péter Engelmann<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark

<sup>3</sup>Department of Public Health Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>4</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>5</sup>Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, Szeged, Hungary

<sup>6</sup>Department of Material Science, Interdisciplinary Excellence Center, University of Szeged, Szeged, Hungary

<sup>7</sup>Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>8</sup>Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Szeged, Hungary

<sup>9</sup>Department of Cell Biology and Molecular Medicine, University of Szeged, Szeged, Hungary

#### **\*Corresponding author:**

Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Medical School, University of Pécs, Pécs, H-7643, Szigeti u. 12, Hungary. Tel: + 36-72-536-288, Fax: + 36-72-536-289, email:

[engelmann.peter@pte.hu](mailto:engelmann.peter@pte.hu)

**Table of contents**

<b>Materials and methods</b> .....	3
<i>UV-visible light spectrophotometry</i> .....	3
<i>Transmission electron microscopy (TEM)</i> .....	3
<i>Quantification of dissolved ion content</i> .....	3
<i>Extrusion of coelomocytes and in vitro exposure conditions</i> .....	4
<i>Evaluation of concentration response curve by flow cytometry</i> .....	5
<i>RNA isolation, cDNA synthesis</i> .....	5
<i>In-gel digestion</i> .....	6
<i>LC-MS/MS analysis</i> .....	6
<i>Western blot</i> .....	7
<b>References</b> .....	8
<b>Tables</b> .....	9
<b>Figures</b> .....	13

## Materials and methods

### *UV-visible light spectrophotometry*

Aggregation state and particle morphology of 10 nm AgNPs and AuNPs (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were studied by quantifying the light absorbance profile characteristic to the localized surface plasmon resonance within the wavelength regime of 300-800 nm scanned on a UV-visible Spectrophotometer (Jasco V-660 UV/VIS Spectrophotometer). Following 24 h incubation (at RT, in the dark) in different solutions ( $\text{H}_2\text{O}$ , PBS, RPMI-1640, RPMI-1640 with 1% and 10% heat-inactivated FBS) each sample was diluted in 1:200 in the appropriate solution prior to the measurement.

### *Transmission electron microscopy (TEM)*

The AgNPs and AuNPs (with a nominal primary size of 10 nm) were imaged under a JEOL-1400 transmission electron microscope. For the characterization of NPs-protein complexes, free (unbound) proteins were removed through 3-times washing in ddH<sub>2</sub>O by centrifugation (30 min, 16 kRCF, RT). After re-suspending the NPs in approximately 20  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, they were further diluted twice and dropped directly onto the middle of 300 mesh grids coated with colloid ion film (Hatfield, USA, PA). Grids were dried at the ambient atmosphere for at least one day. Several grids were prepared for all treatments, and more than 15 images were captured for estimation of the size distributions.

### *Quantification of dissolved ion content*

AgNPs and AuNPs were incubated at the highest test concentration (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) under the exposure conditions and after ultra-centrifugation (1 h, 164-192 kRCF, 4 °C). For quantitative

1  
2  
3 metal analysis a quadrupole Agilent 7700X inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-  
4 MS) was used. The sample introduction system consisted of an Agilent I-AS autosampler and a  
5 Micro Mist pneumatic nebulizer equipped with a Peltier-cooled Scott-type spray chamber. The  
6  
7  
8  
9  
10 sample uptake rate was 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Instrumental parameters were set up as follows: 1550 W RF  
11  
12 power, 15.0 L/min plasma gas flow rate, 1.05 L/min carrier gas flow rate, 10.0 mm sampling  
13  
14 depth. Measurements were carried out by monitoring the signal of  $^{197}\text{Au}$  and  $^{107}\text{Ag}$  isotopes. In all  
15  
16 ICP-MS experiments trace-quality de-ionized labwater (MilliPoreElix 5 with Synergy, Merck)  
17  
18 was used for preparing solutions and dilution. Ultra trace quality HCl and HNO<sub>3</sub> acids (VWR  
19  
20 Chemicals, USA) were used for sample preparation. To determine the total metal concentrations  
21  
22 in the NP suspensions from which the supernatants were collected by ultracentrifugation, hot  
23  
24 HNO<sub>3</sub> acid (for Ag) or hot aqua regia (for Au) were used to completely dissolve the NPs for 1 h  
25  
26 at 180 °C. ICP-MS tuning was performed prior to the analytical measurements using tuning  
27  
28 solutions supplied by Agilent (No. G1820-60410). Calibration was performed using the Agilent  
29  
30 Multi-Element Calibration Standard-3 (for gold) and Inorganic Ventures IV-ICPMS-71A (for  
31  
32 silver). The 99.996% purity argon gas was purchased from Messer Hungarogáz (Hungary). ICP-  
33  
34 MS data processing was performed within the Agilent Mass Hunter software.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

#### 42 *Extrusion of coelomocytes and in vitro exposure conditions*

43  
44 Coelomocytes were harvested from *Eisenia andrei* and *E. fetida* as we described earlier<sup>1</sup> and  
45  
46 washed twice (5 min, 100 RCF) with *Lumbricus* Balanced Salt Solution (LBSS: 71.5 mM NaCl,  
47  
48 4.8 mM KCl, 1.1 mM MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mM  
49  
50 NaHCO<sub>3</sub>, pH: 7.3). Coelomocyte numbers were enumerated by a dead-cell exclusion method  
51  
52 using 0.14 % trypan-blue dye.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### *Evaluation of concentration response curve by flow cytometry*

Coelomocytes were exposed to a concentration series of NPs (1.25-40  $\mu\text{g/mL}$ ) or  $\text{AgNO}_3$  (0.05-1.35  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h at RT (as mentioned in the main article). Following treatments, coelomocytes were washed twice in LBSS (5 min, 100 RCF). 7-aminoactinomycin D (7-AAD, 1  $\mu\text{g/ml}$ , Biotium) was added to each sample just prior the flow cytometry measurements. Amoebocytes (a subpopulation of coelomocytes) were gated and the fluorescent signal of 7-AAD was measured in FL3 (670 LP filter). Concentration-response results were fitted to a 4-parameter logistic non-linear regression curve fit to derive  $\text{LC}_x$  values using Prism v5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA USA).

### *RNA isolation, cDNA synthesis, qPCR*

Total RNA was extracted from coelomocytes applying NucleoSpin® RNA isolation kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol (including DNase I digestion). The quantities of total RNA were measured at 260 nm by NanoDrop 1000 spectrometer (Thermo Scientific) and the qualities inspected by 1% agarose gel electrophoresis. Total RNA samples were stored at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

The cDNA was reverse-transcribed following DNase I digestion (Sigma-Aldrich) using High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Scientific) in 20  $\mu\text{l}$  total volume and stored at  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Maxima SYBR Green/Low Rox MasterMix reagents (Thermo Scientific) were used on an ABI Prism 7500 instrument (Applied Biosystems, Warrington, UK). The amplification profile started with pre-denaturation at  $95\text{ }^\circ\text{C}$  for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at  $95\text{ }^\circ\text{C}$  for 35 s, annealing at  $58\text{ }^\circ\text{C}$  for 35 s and elongation at  $72\text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min.



### *In-gel digestion*

The excised gel bands of interest were subjected to in-gel trypsin digestion<sup>2</sup>. Briefly, after destaining, reduction was performed using 20 mM dithiothreitol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 1 h at 56 °C followed by alkylation with 55 mM iodoacetamide (Bio-Rad) for 45 min at RT in the dark. The trypsin digestion was carried out using stabilized MS grade TPCK-treated bovine trypsin (Sciex, Framingham, MA, USA) at 37 °C overnight. The digested peptides were extracted, lyophilized and re-dissolved in 10 µL 1% formic acid (VWR Ltd., Radnor, PA, USA).

### *LC-MS/MS analysis*

Peptides were separated with a flow rate of 300 nL/min on a 180 min water/acetonitrile gradient using an EASY-nLC 1200 nano UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The peptide mixture was desalted on an Acclaim PepMap 100 C18 trap column (20 × 75 µm, 3 µm particle size, 100 Å poresize, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), followed by separation on Acclaim PepMap RSLC C18 analytical column (150 mm × 50 µm 2 µm particle size, 100 Å poresize, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Data-dependent analyses were carried out on an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The 14 most abundant multiply-charged ions were selected from each survey MS scan using a scan range of 350-1600 m/z for MS/MS analyses (Orbitrap analyse resolution: 60000, AGC target: 4.0e5, acquired in profile mode). CID fragmentation was performed in the linear ion trap with 35% normalized collision energy (AGC target: 2.0e3, acquired in centroid mode).

The acquired LC-MS/MS spectra were used for protein identification with the help of MaxQuant 1.6.2.10 software<sup>3</sup> searching against the *Eisenia* proteins downloaded from the

1  
2  
3 UniProt knowledge base (33430 sequence entries). Cys carbamidomethylation was set as fixed  
4  
5 modification; Met oxidation and N-terminal acetylation were set as variable modifications.  
6  
7 Maximum 2 missed cleavage sites were allowed. Proteins were accepted with at least 3 identified  
8  
9 peptides using 1% FDR criteria.  
10  
11  
12  
13

#### 14 *Western blot*

15  
16  
17 The *ex-situ* protein corona or protein secretion samples were transferred onto  
18  
19 nitrocellulose membranes following SDS-PAGE. Nitrocellulose membranes were incubated in  
20  
21 blocking buffer (1×PBS, 0.1 % Tween-20, 1 % BSA) for 1 h at RT, and then with polyclonal  
22  
23 anti-lysenin antibody (rabbit, Pepta Nova GmbH, Sandhausen, Germany) diluted (1:1500) in  
24  
25 blocking buffer for overnight at 4 °C. Next, blots were washed in PBS-T for 30 min and  
26  
27 incubated with HRP-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody diluted (1:1000) in PBS-T  
28  
29 for 1 h at RT. Finally, ECL detection reagent (Super Signal West Pico Plus, Thermo Scientific)  
30  
31 was used for visualization.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

- 1 P. Engelmann, L. Pálincás, E. L. Cooper, and P. Németh, Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers, *Dev. Comp. Immunol.*, 2005, **29**, 599–614.
- 2 G. Kalló, M. Emri, Z. Varga, B. Ujhelyi, J. Tózsér, A. Csutak, and É. Csósz, Changes in the chemical barrier composition of tears in Alzheimer’s disease reveal potential tear diagnostic biomarkers, *PloS One*, 2016, **11**, e0158000.
- 3 J. Cox, and M. Mann, MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification, *Nat. Biotechnol.*, 2008, **26**, 1367-1372.

1  
2  
3 **Tables**  
4

5 **Table S1. Lists of primers and GenBank Accession numbers used for qPCR analysis**  
6  
7  
8  
9

Target Gene	Gene Bank Accession #	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Amplicon size (bp)
<i>RPL 17</i>	BB998250	ATT GTG TCA AAC GCC TTC GC GTCGGCGATCTCTTCCAACA	159
<i>TLR</i>	JX898685	ATT GTG TCA AAC GCC TTC GC GTCGGCGATCTCTTCCAACA	123
<i>Lysenin</i>	D85846	CTT GTG AGC GAT GTC GGC TA TGA TCC ACA CTG GTG CTT CC	117
<i>Lumbricin</i>	KX816866	ACT CGG AAC GCA AGA ACC AA GGT TCT GCG TGA CCT CCT TC	139
<i>LuRP</i>	KX816867	GGT CGA GAG AAT CAA CCC AAC TA TGC GAG TAC AGG CTC GTT AAC	133
<i>MT</i>	AJ236886	GCT GTG GAA AAT CTA CCT GCG CAC ATT TGC CCT TCT CAG CG	129
<i>Cu/Zn SOD</i>	KR106132	TGC CAA GTT TGA AGT GAC GG TTT GCC AAG ATC GTC CAC CA	103

35  
36  
37 <sup>a</sup>Upper and lower primer sequences indicate forward and reverse primers.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table S2. Estimated LC<sub>x</sub> values**

Species	Treatment	LC <sub>20</sub> (µg/mL)	LC <sub>50</sub> (µg/mL)	Hill-Slope
<i>E. andrei</i>	AgNP	2.76±0.64	6.72±1.71	1.37
<i>E. fetida</i>	AgNP	2.04±0.53	5.24±1.22	1.7
<i>E. andrei</i>	AgNO <sub>3</sub>	0.206±0.04	0.48±0.10	1.49
<i>E. fetida</i>	AgNO <sub>3</sub>	0.207±0.01	0.41±0.01	3.13

LC<sub>x</sub> values of 24 h exposures represent the mean ± SEM (n=3).

**Table S3. Basal gene expression levels of *E. fetida* / *E. andrei* (where the value of >1 indicates a higher expression level in *E. fetida*).**

	<i>TLR</i>	<i>Lumbricin</i>	<i>LuRP</i>	<i>Lysenin</i>	<i>SOD</i>	<i>MT</i>
2 h	0.465	0.248	0.184	0.469	0.419	0.413
12 h	1.426	0.158	2.096	0.179	0.828	12.170
24 h	2.496	1.167	6.583	0.332	0.420	25.917
All	<b>1.183</b>	0.358	<b>1.364</b>	0.303	0.526	<b>5.068</b>

Values were calculated by taking a geometric mean of the control  $R_0$  values at each time point or all time points.

**Table S4. Tandem mass spectrometry-based identification of *E. andrei* and *E. fetida* coelomic proteins enriched by AgNPs after 24 h incubation.**

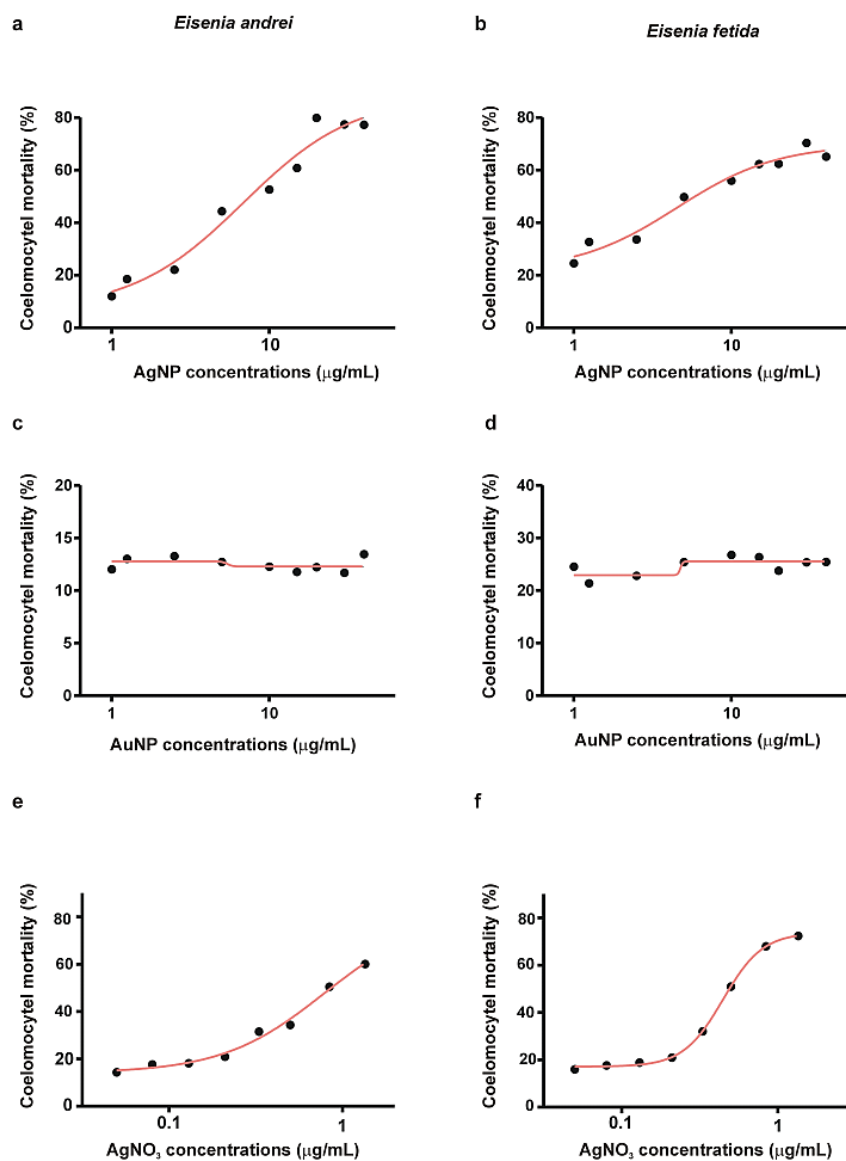
SDS-PAGE band range (kDa)	Unique peptides #	Unique sequence coverage (%)	Protein name (accession #)	Species	Mw <sup>a</sup> (kDa)	pI <sup>a</sup>	Functions <sup>b</sup>
35-55	10	37.4	<b>Lysenin</b> (O18423)	<i>Eisenia fetida</i>	33.44	5.86	Hemolysis Cytolysis Ion transport Antimicrobial
35-55	11	38.3	<b>Lysenin-related protein 2</b> (O18425)	<i>Eisenia fetida</i>	34.142	5.64	Hemolysis Cytolysis Ion transport Antimicrobial
35-55	34	73.1	<b>Actin</b> (A0A2I7YV73)	<i>Eisenia fetida</i>	41.919	5.30	Cytoskeleton Transport mechanisms

All samples listed here contained BSA as a non-specific background protein source.

<sup>a</sup>Before post-translational modification according to the Protein knowledgebase (UniProtKB) from the whole amino acid sequences and pI were calculated by Compute pI/MW (ExpASY).

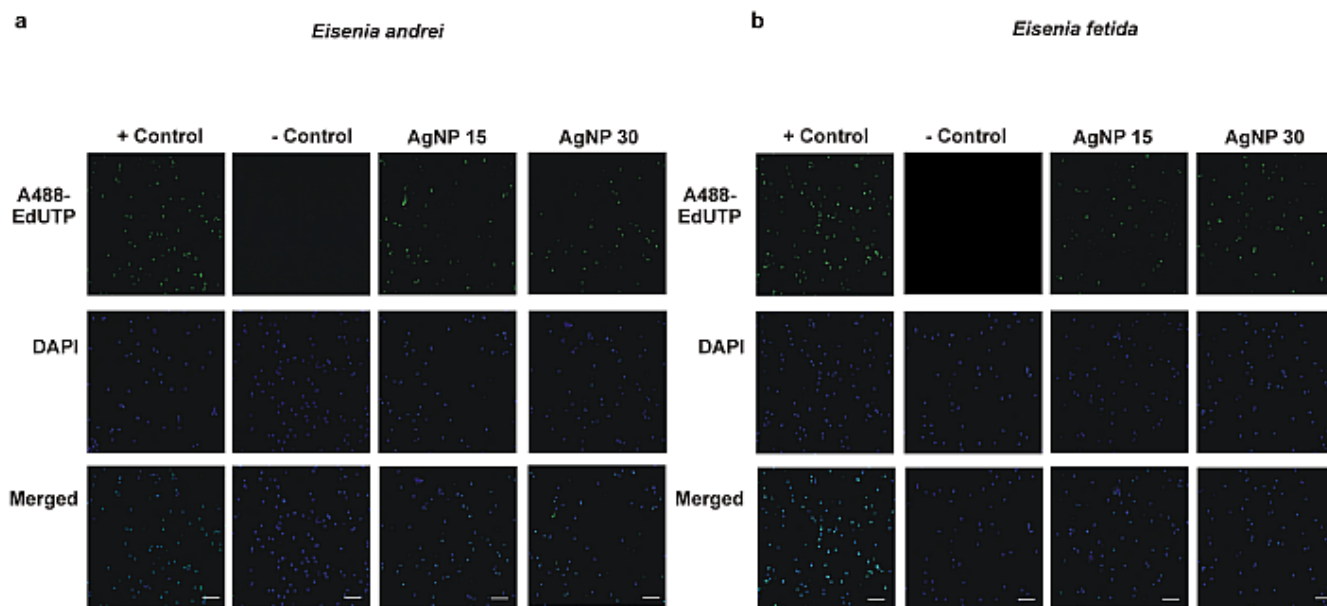
<sup>b</sup>Functions are derived from Protein knowledgebase (UniProtKB)

## Figures

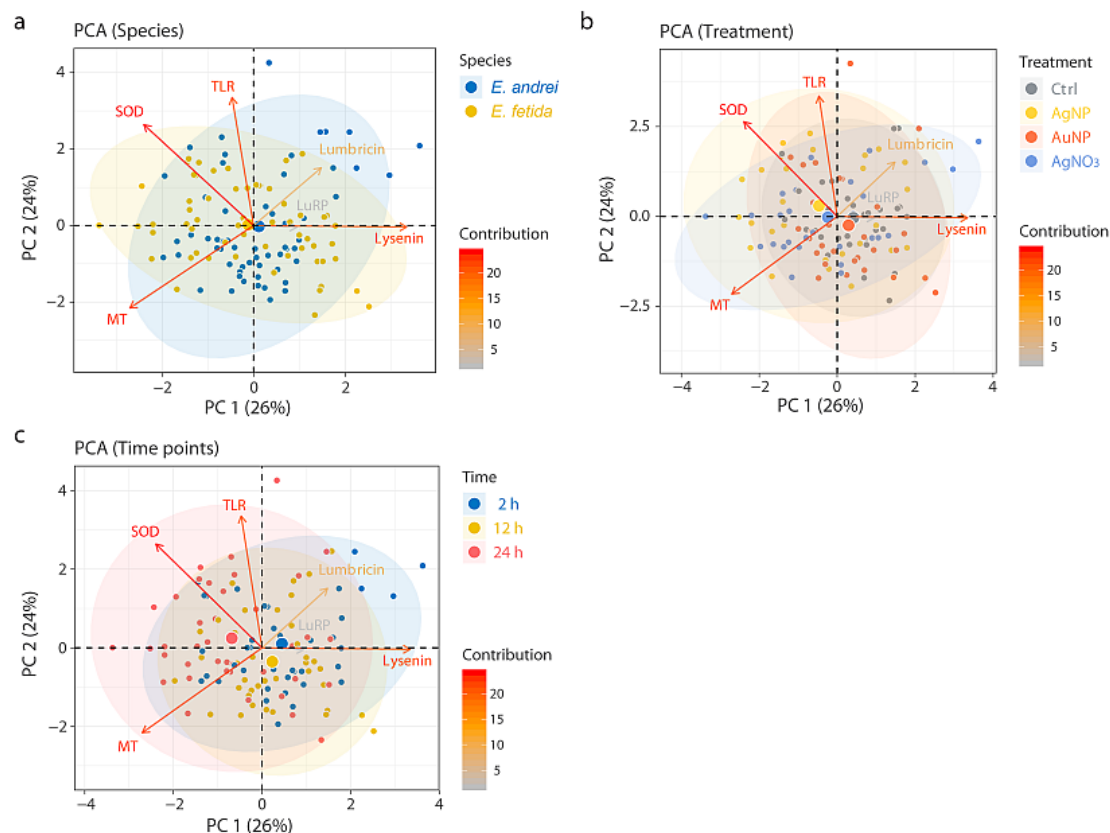


**Figure S1.** Concentration-dependent coelomocyte mortality curves for the concentration ranges of 1.25-40  $\mu\text{g/mL}$  AgNP (a, b), AuNP (c, d) and 0.05-1.35  $\mu\text{g/mL}$  AgNO<sub>3</sub> (e, f). Cytotoxicity was determined by the 7-AAD live/dead cell assay on flow cytometry following 24 h exposure. Dots represent the mean of three independent measurements.

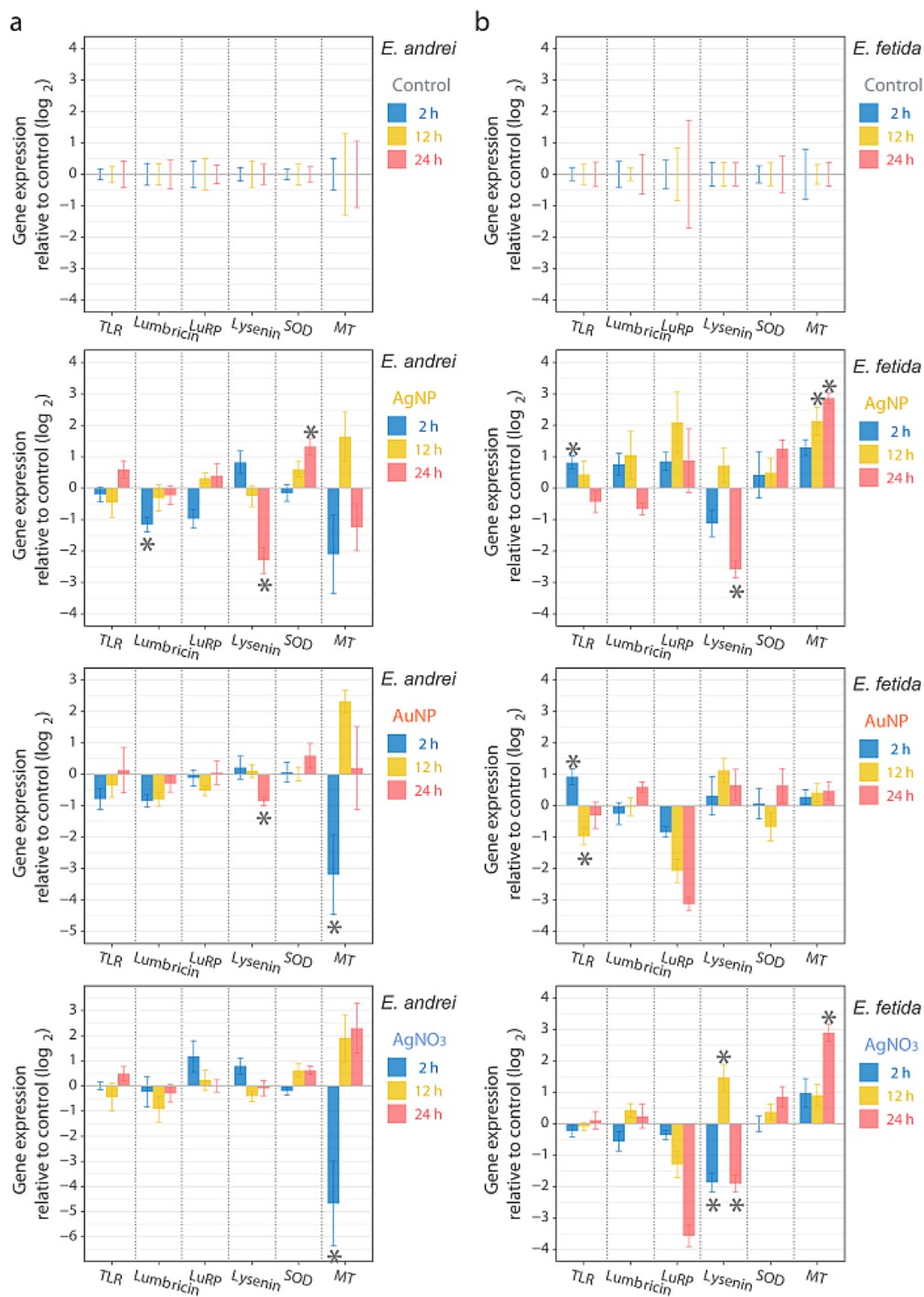




**Figure S2.** Representative images of one TUNEL-assay in coelomocytes of *E. andrei* (a) and *E. fetida* (b) earthworms after 24 h exposure to 10 nm AgNP (15  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$ ). Unexposed coelomocytes were applied for TUNEL-controls. The positive controls were treated with DNase-I for 30 min, negative controls did not receive TdT-enzyme (following the manufacturer's instructions). Each assay was repeated three independent times. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure S3.** Principal component analysis (PCA) on species-pooled gene expression datasets. The same PCA biplot is shown with color codes differentiating (a) species, (b) treatments and (c) time points. Note that the same PCA biplot is also shown in the main article, Fig. 5, with a color scheme for treatments  $\times$  time points. Individual samples (small dots) and mean points (large dots) are plotted according to the coordinates in the first two principal components (PCs), overlaid with variable coefficients (arrows). Percentage contributions of the 6 variables (genes) to the two PCs are color-scaled from grey to red. Concentration ellipses are drawn for each sample feature as a guide to identify overall trends along with the mean points (the distance from the center representing the degree of bias).



**Figure S4.** Univariate statistics. The log<sub>2</sub>-transformed relative expression values are plotted as mean ± SEM (*n* = 5). Asterisks (\*) denote a significant difference between the control and the treatment at the specified time point (Student's *t*-test, *p* < 0.05).