

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

1. Áttekintés

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

A munka első részében tárgyaljuk, hogy mRNS-szinten azonosítottuk a *Lumbricus rubellus* gilisztafajban korábban már leírt lumbricin (antimikrobiális fehérje) két homológját *E. andrei*-ben. A prolin-gazdag aminosavak családjába tartozó peptidek nagyfokú szekvencia azonosságot mutatnak a rokon fajokban leírt lumbricinekkel. Szöveti szinten a legnagyobb mértékű mRNS expressziós mintázat az előbélben volt megfigyelhető. Ellentétben az előzetes tanulmányokkal mindkét *lumbricin* homológ expressziója kimutatható volt a coelomasejtekben és az embrionális fejlődés során, illetve indukálhatónak bizonyult a 48 órás *in vivo* Gram-pozitív bakteriális kezelést követően. Eredményeink alátámasztják a lumbricin fehérjék konzerváltságát az *Annelida* csoporton belül, illetve 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 lehet 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 és posterior regeneráció jellemzése során számos, karakterisztikus sejt-, és génszintű változást figyeltünk meg a gyűrűsféreg 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 magyarázhatják a kialakuló

érzékenységbeli különbségeket. Eredményeink rávilágíthatnak arra, hogy milyen hatással lehetnek ezek a részecskék a magasabb rendű szervezetek immunrendszerére.

2. Általános bevezetés

A kevéssértéjű gyűrűsférgeket (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 inaktiválására is képesek.

Az első, passzív védelmi réteget a bőrizomtömlő képezi, amely elhatárolja az állat szervezetét a külvilágtól. Felépítését tekintve epidermisz, vékony, mukopoliszacharidokat ill. fehérjéket tartalmazó kutikula és izom rétegekből áll, mely antimikrobiális barrierként funkcionál¹.

A törzsféjlődés során ebben a gerinctelen állatcsoportban figyelhetjük meg elsőként a celluláris és a humorális immunfolyamatok együttes működését. A humorális immunfolyamatok nagy része a coelomafolyadékban zajlik, amely bizonyítottan proteolitikus, haemolitikus, antibakteriális, és citolitikus tulajdonságokkal rendelkezik². 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 fehérvérsejtjeivel³.

A coelomasejtek különböző alcsoportjai számos funkcióval rendelkeznek, amelyek közül a legfontosabbak a fagocitózis, enkapszuláció és a celluláris citotoxicitás. A coelomasejtek jellemzése kezdetben klasszikus fény és elektronmikroszkópos módszerekkel történt. A ma használatos, egyszerűbb csoportosítás alapján (áramlási citometria és monoklonális ellenanyagok alkalmazása) a coelomasejtek –eredetük, és morfológiájuk alapján- két nagyobb alpopulációja különíthető el. Ezek az amoebocyták (ezen belül hyalin és granuláris sejtek) és az eleocyták^{3,4}. Korábbi vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a granuláris és hyalin amoebocyták a celluláris immunmechanizmusok (fagocitózis és enkapszuláció) résztvevői, illetve ezek az effektor sejtek különböző mintázatfelismerő receptorokat (PRR) is expresszálnak. A chloragogén 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 fehérje termelését (pl. lysenin)^{2,3}.

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 szekrécióra és célsejtekkel szembeni lítikus reakciókra képesek.

3. 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 vizsgálni kívántuk **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 faj (*E. andrei* és *E. fetida*) coelomasejtjeinek érzékenységét 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 vizsgáltuk 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 vannak ismertetve.

4. Új, lumbricin-homológok azonosítása *Eisenia andrei* gilisztafajban

4.1. Bevezetés

A veleszületett immunrendszer humorális elemei közé tartozó, evolúciósan konzervált antimikrobiális peptidek (AMP) termelődése már a törzspejlődés korai szakaszában megfigyelhető. Kationos (pozitívan töltött) szerkezetük révén ezen peptidek széles körű antimikrobiális hatást mutatnak a Gram-pozitív, és Gram-negatív baktériumok, gombák, egszejtűek és vírusok ellen. 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 elrendezésétől⁵.

A gerinctelen organizmusok, mint például a giliszták összehangolt, veleszületett sejtes és humorális immunkomponensekkel őrzik meg integritásukat. A lumbricint elsőként a *Lumbricus rubellus* gilisztafajban azonosították⁶, azóta homológjait már számos gyűrűsféreg fajban megtalálták (*Metaphire tschilliensis*, *M. guillelmi*, *Hirudomedicinalis*). Több tanulmány alátámasztotta, hogy a lumbricin és ortológjai széleskörű antimikrobiális hatással rendelkeznek a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, illetve gombákkal szemben (haemolítikus aktivitás nélkül). Munkánk célja a lumbricin homológjának azonosítása és karakterizálása, szöveti és ontogenetikai megoszlásának megállapítása, illetve *in vivo* patogén indukció hatásának vizsgálata coelomasejteken, *E. andrei* gilisztafajban.

4.2. Módszerek

4.2.1. Kísérleti állatok tartása, RNS izolálás, cDNS szintézis és RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA ends)

4.2.2. Szekvencia- és filogenetikai analízis

4.2.3. Coelomasejtek izolálása, szortolása és áramlási citometria

4.2.4. RNS-izolálás, cDNS-szintézis és szemikvantitatív RT-PCR

4.2.5. A lumbricin és rokon-fehérje relatív expressziós értékének megállapítása különböző szövetekben és embriókban valós-idejű PCR alkalmazásával

4.2.6. *In vivo* bakteriális és zymosan kezelés, statisztikai analízis

4.3. Eredmények

Az elérhető lumbricin szekvenciák alapján egy degenerált, forward primert terveztünk, hogy detektálni tudjuk a lumbricin homológját *E. andrei*-ben 3'-RACE PCR segítségével, azonban meglepő módon nem egy, hanem két diszkrét sávot kaptunk a 3'-RACE PCR eredményeként. 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, KX816866). 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, KX816867).

A filogenetikai elemzés alapján nagyfokú szekvencia homológiát figyeltünk meg a rokon fajokban leírt lumbricinekkel. 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. 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. Általánosságban elmondható, hogy a lumbricin-homológok tipikus hossza 57 - 76 aminosav, emellett szembetűnő tulajdonsága ezen AMP-családba tartozófehérjéknek a magas prolin tartalmuk. További érdekesség, hogy az *Eisenia* lumbricin homológok aromás aminosav-tartalma (His, Trp, Tyr) is viszonylag magas (15-16 % molarányban), amely ezen peptidek antimikrobiális hatását fokozhatja.

Mindkét AMP mRNS expressziója az előbél proximális részén (garat, gyomor) bizonyult a legmagasabbnak, miközben a többi vizsgált szövetben nagyrészt közepes szintű kifejeződést tapasztaltunk (bőrizomtömlő, petefészek, ondóhólyag, metanephridium és idegrendszer), a legalacsonyabb mRNS szinteket a coelomasejteknél detektáltuk. 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. A coelomasejt

alcsoporthoz a *Lumbr* és *LuRP* expresszió szempontjából csak az amoebocita alpopuláció bizonyult pozitívnak, az eleocyta nem.

Kísérleteinkben mindkét *E. andrei* lumbricin-homológ kifejeződést mutatott az embrionális fejlődés stádiumai során, és a *LuRP* expressziója szignifikánsan magasabb volt összehasonlítva *Lumbr*-vel. Az expresszió folyamatos növekedést mutatott a negyedik fejlődési stádiumig (E4), amikor is a test már teljesen szegmentált és a szervek differenciálódása is befejeződött.

Az indukálhatóság vizsgálata során az *E. andrei Lumbr* és *LuRP* mRNS expressziós szintje a coelomasejtekben szignifikáns, de lassú emelkedést mutatott 48 órás *Staphylococcus aureus* baktérium-fertőzést követően, de az expresszió változatlan maradt az *Escherichia coli* vagy *zymosan* (*Saccharomyces cerevisiae* sejtalkivonat) kezelése után.

4.4. Összegzés

A gyűrűsféreg hatékony védekező rendszerrel rendelkezik a környezeti kórokozók 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 gyűrűsféreg esetében az AMP-kről kevés adattal rendelkezünk.

Jelen tanulmányunk feltárta a prolin gazdag AMP-ek családjába tartozó két új lumbricin-homológ jelenlétét *E. andrei* gilisztafajban, amelyek nagyfokú szekvencia azonosságot mutatnak a már leírt lumbricinokkal^{7,8,9}. A szöveti mRNS expresszió tanulmányozása során a *Lumbr* és *LuRP* széles körű expresszióját figyeltük meg számos szervben és szövetben. A földigiliszták embrionális fejlődéséről molekuláris viszonylatban még hiányosak az ismereteink, az eredmények összevetése más immunológiai rokon gének expressziójával a jövőben hasznos lenne a területen. Eredményeink alapján a *Lumbr* és a *LuRP* lassú indukcióját (48 óra elteltével) figyeltük meg *in vivo* *S. aureus* kezelés hatására.

Új eredményeink alátámasztják a lumbricin fehérjék konzerváltságát az *Annelida* csoporton belül, lehetséges szerepüket a földigiliszták immun-homeosztázisának fenntartásában, az ontogenezis és patogén fertőzések során.

5. A celluláris és humorális immunkomponensek szerepe az *Eiseniaandrei* szöveti regenerációjában

5.1. Bevezetés

A regeneráció olyan morfogenetikus események összessége, amely során a részlegesen, vagy teljesen elvesztett szerv vagy szövet helyreállítása történik meg¹⁰.

Az elmúlt években számos előrelépés történt a regeneráció filogenetikai hátterének és fejlődési alapjainak megértésében. A gerinctelen szervezetek közül a legtöbb gyűrűsféreg képes az elvesztett szelvényeinek regenerálására, amely epimorfózis (regenerációs blastema kialakulása) és morphallaxis (régli szelvények újraszerveződése) útján megy végbe¹¹. Az evolúció folyamán a gyűrűsférgekben valószínűleg azért alakult ki a regeneráció képessége, mert gyakran érik ragadozók támadásai, amelyeknek következménye a szelvények elvesztése¹⁰. Az *Oligochaeta* gyűrűsférgekben a regeneráció morfológiailag jól tanulmányozott, de a folyamat molekuláris háttere kevésbé ismert. A legtöbb molekuláris adat a fejlődést szabályozó génekhez köthető, míg a regeneráció és az immunbiológiai folyamatok kapcsolatáról kevés adattal rendelkezünk.

Mostanáig számos tanulmány igazolta, hogy az immunrendszer szerepe döntő a regenerációs folyamatban, illetve a regenerációs kapacitás növekedése fordítottan arányos az immunrendszer fejlettségével. Ezért fő célunk az *E. andrei* gilisztafaj 4 hetes anterior és posterior regenerációja során a sejtosztódás és sejthalál kapcsolatának kimutatása, a folyamatban a makrofág-szerű sejtek (coelomasejtek) részvételének igazolása és az immunválaszban szerepet játszó gének mRNS-expressziójának vizsgálata volt.

5.2. Anyagok és módszerek

5.2.1. Kísérleti állatok tartása és a regenerációs kísérletek kivitelezése

5.2.2. Hisztokémia és enzim hisztokémia

5.2.3. Sejtosztódás és sejthalál detektálása, immunfluoreszcencia

5.2.4. RNS-izolálás, reverz-transzkripció és valós-idejű PCR

5.2.5. Statisztikai analízis

5.3. Eredmények

Elsőként hisztokémiai festéseket végeztünk az anterior és posterior regeneráció folyamata során a regenerációs blastema megjelenésétől (4. nap) a regenerációs folyamat végéig (4 hét). A hematoxin-eozin festést követően jól látható az új szelvények képződése és a szövetek újraszerveződése mind az anterior és a posterior regeneráció folyamata alatt. A PAS festés, amely a szénhidrátok/glikogén-kimutatására alkalmas, nem mutatott lényeges különbségeket az intakt és regenerálódó állatok között. Ezzel szemben a savas-foszfátáz festés alkalmazásával (lizoszómális aktivitás egyik markere) lényeges különbségeket figyeltünk meg az intakt és regenerálódó (anterior és posterior) állatok között.

A sejtosztódás kimutatása során a 2 hetes regenerálódó állatokban az osztódó sejtek száma jóval magasabb volt, mint az intakt és 4 hetes regenerálódó állatok esetében. Megfigyeléseink alapján a sejtosztódás az anterior regenerációban jóval kifejezettebb, mint a posterior regeneráció folyamatában.

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. Ezzel szemben a posterior regeneráció során már a második hét elteltével anti-EFCC5 pozitív, eleocyta-csoportosulásokat figyeltünk meg a regenerációs blastema lacunáiban. A lysenin-szekretáló eleocyták jelenléte, így az antimikrobiális környezet kialakítása a regenerációs folyamatban összekapcsolódhat a kórokozók elleni védelemmel. Apoptózis a regeneráció teljes folyamata alatt kimutatható volt. A legnagyobb mértékű sejtpusztulást a 4 hetes anterior és posterior regenerálódó állatokban volt megfigyelhető, ezért egy regeneratív sejthalálról beszélhetünk. Eredményeink alapján az anti-EFCC4 pozitív sejtek megtalálhatóak voltak az apoptotikus sejtek körül, így feltehetőleg azok eltakarításában vesznek részt. Az anti-EFCC4 pozitív, migrációra és fagocitózisra képes granuláris amoebocyták is jelen voltak a regenerációs blastemában, de nem csak a coelomaüregekben, hanem a testfalban és izomzatban is.

A regeneráció során az immunválaszban szerepet játszó gének csökkent mértékű mRNS expresszióját tapasztaltuk az intakt állatokhoz képest. Az anterior és posterior blastemában a *toll-like receptor* hasonló mennyiséget mutatott, de különbséget figyeltünk meg egyes AMP-ek (*lysenin*, *lumbricin*) expressziójában. A *Lumbr* és *LuRP* esetén is szembetűnő, hogy amíg a sejtosztódás kifejezett (2. hét), az AMP-ek mRNS expressziója csökkenést

mutatott, azonban a 2. hét után a sejtosztódás lényegesen csökkent, és ekkor a mRNS expresszió növekedését tapasztaltuk.

5.4. Összegzés

A regenerációs képesség törzsfjlődésileg ősi tulajdonság, melynek sikerességét számos faktor határozza meg¹⁰. Az *E. andrei* anterior és posterior regenerációjának jellemzése során számos, karakterisztikus sejt és génszintű változást figyeltünk meg a gyűrűsférgék veleszületett immunválaszában, mely párhuzamba állítható más gerinctelen fajok regenerációja során megfigyelt immunológiai változásokkal.

Eredményeink alapján morfológiai különbségek tapasztalhatóak 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-ek) alacsonyabb mértékű expressziós mintázatot mutatott az intakt állatokhoz képest. A hasonló témájú tanulmányok (gyűrűsférgék és magasabb rendű szervezetek esetén is) eddig főként a fejlődésben szerepet játszó gének expressziójára koncentráltak¹², mert a mai elképzelések szerint a regeneráció az embrionális fejlődés újraindításaként értelmezhető felnőtt szervezetekben. A vizsgált immunológiailag-rokon 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, így a sikeres regenerációs képesség oka lehet, hogy a blastema időlegesen egy immunológiailag tolerált terület^{13,14}.

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

6.1. Bevezetés

A nanotoxikológia a toxikológia egy új ágának tekinthető, mely a nanopartikulumok interakcióját és potenciálisan káros hatásait vizsgálja az élő szervezeteken és környezetükön, azonban hiányosak az ismereteink arról, hogy a környezetbe kikerült részecskék milyen hatással lehetnek az élő szervezetek immunrendszerére. A különféle nano-méretű anyagok hajlamosabbak a kémiai reakciókra, különböző erősségű vagy eltérő elektromos tulajdonságaik révén mobilisabbak lehetnek a nagyobb méretű, hasonló anyagoknál¹⁵.

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. Számos tanulmány számolt be a NP-ok (leginkább AgNP) toxikus 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 károsodás közötti erős korrelációra¹⁶. A legtöbb esetben az AuNP expozíció nincs hatással a sejtek életképességére és a hatásmechanizmus kimenetele máig ismeretlen. 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 (un. protein korona) képződése¹⁷.

Az *Eisenia andrei* és az *E. fetida* giliszták morfológiai tulajdonságaik révén két megkülönböztetett, de szoros rokonságot mutató földigiliszta faj, melyeket széles körben alkalmaznak toxikológiai vizsgálatok során¹⁸.

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

6.2. Anyagok és módszerek

6.2.1. Coelomasejtek izolálása és az *in vitro* kezelés körülményei

6.2.2. A dózis-hatás görbék alkalmazása, a koncentrációk kiválasztása

6.2.3. Génexpressziós profil

6.2.4. *Ex-situ* protein korona és fehérje szekréción profil vizsgálata

6.2.5. Statisztikai analízis

6.3. Eredmények

Mindkét gilisztafajból származó coelomasejtek esetében csak az AgNP (és alacsonyabb koncentrációkban az AgNO₃, de az AuNP nem) mutatott koncentrációfüggő citotoxicitást a vizsgált koncentráció tartományban. A fajok közötti különbségeket illetően az *E. fetida*-ból származó coelomasejtek nagyobb érzékenységet mutattak az AgNP-okkal és AgNO₃-kal szemben, mint az *E. andrei* coelomasejtek, a becsült alacsonyabb LC_x értékek és a meredekebb Hill-Slope-ok alapján. Ezekből adódóan az AgNP és az AgNO₃ esetében a gén- és fehérje expressziós vizsgálatokhoz az alacsony citotoxikus koncentrációkat (LC₂₀) választottuk ki, míg az AuNP-kat ugyanabban a koncentrációban alkalmaztuk.

Az általános génexpressziós mintázat nem különbözött nagymértékben a két faj között, azonban *E. fetida* faj relatív expressziós profilja alapján érzékenyebben reagált az alkalmazott kezelésekre. A 2 órás kezelés elteltével kontrasztos tendenciát figyeltünk meg a fajok között: az *E. andrei* alacsony *metallothionein* (MT)/magas *lysenin*-profillal, az *E. fetida* pedig magas MT/alacsony *lysenin*-profillal rendelkezett. A legszembetűnőbb volt, hogy az AgNP-ok mindkét fajra jellemzően -a *lysenin* folyamatos csökkenését idézték elő 24 óra felé egyidejűleg a *szuperoxid-dizmutáz* (SOD) indukciójával, *E.fetida*-nál a MT-nel is (*Lumbr* és *LuRP* expressziója változatos volt a fajok között). Bár az AuNP-kezeléseknél nem figyeltünk meg citotoxicitást, mindkét fajnál okozott mRNS-szinten változást.

A fajbeli különbségeket illetően megfigyeltük a *lysenin* fehérjék (38 kDa-os és 40 kDa-os sávok) nyilvánvaló eltérését a két faj között, és az így létrejövő, különböző fehérjekoronákat az AgNP-ok körül. A *lysenin* fehérjecsaládon kívül az aktin is az AgNP-ok körül kialakult fehérjekoronák egyik alkotóeleme.

A fehérje szekréción profil vizsgálata során az AgNP vagy AuNP expozíció kezdetben (4 óra elteltével) a *lysenin* fokozott szekréciónját eredményezte a kontrollokhöz képest

mindkét gilisztafaj esetében. Ezt követően 24 órára a lyseninek mennyisége redukálódott, mely hasonlóságot mutatott a génexpresszió csökkenésével.

6.4. Összegzés

Jelen tanulmányban vizsgáltuk két szoros rokonságban lévő földgiliszta faj (toxikológiai vizsgálatokban mindkettő elterjedt modell) coelomasejtjeinek nemesfém NP-okkal szembeni érzékenységét különböző módszerek alkalmazásával. Általánosságban az *E. fetida* coelomasejtek nagyobb érzékenységet mutattak az AgNP-okkal szemben, mint az *E. andrei* coelomasejtek, 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 thiol-mediált méregtelenítési folyamatok jelentős szerepét¹⁹. Mindkét fajban megfigyeltük, hogy a *lyseninek* expressziója/szekréciónja stressz szabályozottnak tűnik, amely egy összetett visszacsatolási mechanizmust von maga után az AgNP-ok számára^{17,19}. 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*, *toll-like receptor (TLR)*, és *MT*-génnek erősen indukálhatóak stressz körülmények között. Bár az AuNP citotoxikus hatást nem idézett elő egyik faj esetében sem, génexpressziós változást indukált²⁰, ezért az AuNP-ok potenciális hatása a veleszületett immunitásra olyan terület, amely a jövőben további figyelmet érdemel.

Az egyik lehetséges magyarázat az *E. fetida* nagyobb érzékenységére az, hogy természetes környezete jelentősen különbözik az *E. andrei*-től¹⁸. 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. Eredményeink továbbá igazolták a *TLR* korai (2 h) indukcióját *E. fetida*-nál, amely összefüggésben lehet az AgNP-ok gyorsabb sejtbe kerülésével¹⁹.

7. 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 lumbricinokkal, 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 AgNO₃ kezelés hatására 2 óra elteltével az *E. andrei* alacsony *MT*/magas *lysenin*-profillal, az *E. fetidapedig* 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 coeloma proteinek (CP-k) 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 bizonyította, 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*-fehérje család mellett az aktin szerepe is jelentős lehet a protein korona kialakulásában.
14. A *lysenin* fehérje szekréción profija egybevág a génexpressziós eredményekkel, mindkét fajnál 4 óra elteltével az AgNP és AuNP kezelés hatására magas *lysenin* (*E. fetida*-nál mindkettő izoforma) jelenlét 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 szekréción befolyásolta mindkét fajnál.

8. Irodalomjegyzék

1. Bilej M., Procházková P., Silerová M., Josková R. (2010). Earthworm immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **708**, 66-79, 2010.
2. Engelmann P., Hayashi Y., Bodó K., Molnár L. (2016) 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.
3. Engelmann P., Hayashi Y., Bodó K., Ernszt D., Somogyi I., Steib A., Orbán J., Pollák E., Nyitrai M., Németh P., Molnár L. (2016). 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.
4. Engelmann P., Pálincás L., Cooper E. L., Németh P. (2005). Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Dev. Comp. Immunol.* **29**, 599-614.
5. 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.
6. 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.
7. 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**, 1146-50.
8. 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.
9. Wang X., Wang X., Zhang Y., Qu X., Yang S. (2003). An antimicrobial peptide of the earthworm *Pheretima tschiliensis*: cDNA cloning, expression and immune localization. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1317-23.
10. Bely A. E., Nyberg K.G. (2010). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 161-70.
11. 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.
12. 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.
13. Godwin J. W., Rosenthal N. (2014). Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: immunological influences on regenerative success. *Differentiation.* **87**, 66-75.
14. 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.
15. Prajitha N., Athira S. S., Mohanan P. V. (2019). Bio-interactions and risks of engineered nanoparticles. *Environ. Res.* **172**, 98-108.
16. 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.
17. Hayashi Y., Miçlaus 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.
18. 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.
 19. 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.
 20. 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.

9. 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 Rumpler 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 ÚNKPO-19-3-I kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja.

10. 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: 7, 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: 3, 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., NémethP., Engelmann P. Unraveling the evolutionary conserved cell- and immunobiological mechanisms of tissue renewal in a non-classical invertebrate model organism. (Előkészületben).

Egyéb, a témában megjelent tudományos közlemény

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. *független idézetek száma: 8, 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: 0, IF: 4,718.*

Czigler A., Toth L., Szarka N., Berta G., Amrein K., Czeiter E., Lendvai-Emmert D., **Bodó 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: 31

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, Bükkfűdő, 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. Tavasz 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, Bükkfüdő, 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* earthwormes 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.