

**A TERMÉSZETES IMMUNITÁS VIZSGÁLATA GERINCTELEN
MODELLÁLLATBAN: *EISENIA FETIDA* COELOMASEJT-
ALCSOPORTOK MORFOLÓGIAI ÉS FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE
IMMUNOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL**

PhD tézisek

Engelmann Péter

PTE - ÁOK

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Alprogramvezető, témavezető: Dr. Németh Péter egyetemi tanár

P é c s

2004

TARTALOMJEGYZÉK

1. ÁBRA- ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK.....	3
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3. ÖSSZEFOGLALÁS	6
4. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
4. 1. <i>A gerinctelen állatok természetes immunrendszerének általános jellemzése</i>	8
4. 1. 1. Celluláris védekezési mechanizmusok.....	9
4. 1. 2. Humorális védekezési mechanizmusok	9
4. 1. 3. Mintázatfelismerő molekulák, lektinek	13
4. 2. <i>A giliszta immunrendszere</i>	16
4. 2. 1. A giliszták általános felépítése.....	16
4. 2. 2. A giliszták immunrendszerének szerveződése	18
4. 2. 3. Celluláris mechanizmusok.....	24
4. 2. 4. Humorális védekező mechanizmusok.....	30
4. 2. 5. Antigénkötő proteinek, antigén feldolgozás	36
5. CÉLKITŰZÉSEK	38
6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	40
7. EREDMÉNYEK.....	48
7. 1. <i>A coelomasejtek fizikai paraméterek alapján történő elkülönítése</i>	48
7. 2. <i>Konzervatív emlős antigénekre specifikus monoklonális antitestek reakciója giliszta immunsejt lizátummal</i>	49
7. 3. <i>Emlős sejtfelszíni antigéneket felismerő monoklonális ellenanyagok reaktivitása coelomasejteken</i>	50
7. 4. <i>Intracelluláris festődés coelomasejteken α-TNF-α, α-TSH-α, -β-dimer, α-Cu/Zn SOD monoklonális ellenanyagokkal. α-TNF-α reaktivitás mezodermális szöveteken</i>	50
7. 5. <i>Lizoszomális enzim (savi foszfatáz) eloszlása coelomasejt populációkban</i>	53
7. 6. <i>A coelomasejtek áramlási citometriai analízise specifikus monoklonális ellenanyagokkal</i>	55
7. 8. <i>Monoklonális ellenanyagok reakciója giliszta metszeteken</i>	59
7. 9. <i>Coelomasejtek lizátumának immunprecipitációja monoklonális ellenanyagokkal</i>	61
7. 10. <i>α-EFCC1 ellenanyag epitópjának meghatározása random peptid könyvtár segítségével</i>	62
7. 11. <i>Giliszta coelomasejt specifikus ellenanyagok reakciója más fajokon</i>	63
7. 12. <i>Coelomasejt alpopulációk fagocitózisa</i>	64
7. 13. <i>Enkapszulációs folyamatok vizsgálata</i>	65
7. 14. <i>Savi foszfatáz enzim változások coelomasejteken fagocitózis után</i>	68
7. 15. <i>Coelomasejtek citotoxicitása</i>	69
8. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	71
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	79
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	80
11. A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	93
12. MELLÉKLETEK.....	95

1. ÁBRA- ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. ábra. <i>Limulus polyphemus</i> rák immunsejtje (granuláris sejt), koagulációs kaszkád.....	13
2. ábra. Az immunrendszer fejlődésének szempontjából fontos elemek megjelenése a törzsfajlás során.....	15
3. ábra. Földgiliszta keresztmetszeti képe.	17
4. ábra. A giliszta természetes immunrendszerének összetevői.....	19
5. ábra. A coelomasejtek típusai: hialin és granuláris amöbociták, chloragociták.....	22
6. ábra. A coelomasejtek enzimek kémiai jellegzetességei.....	23
7. ábra. Coelomasejtek fagocitózisa.....	26
8. ábra. <i>In vivo</i> és <i>in vitro</i> enkapszulációs reakció.....	27
9. ábra. Transzplantációs kísérlet gilisztafajokon..	29
10. ábra. A különböző citolitikus (antimikrobiális) peptidok más-más sejtalkotóhoz kötődnek a célsejt felszínén.....	36
11. ábra. Coelomasejtek fizikai paraméterek alapján három nagyobb csoportra különíthetők el ...	48
12. ábra. Emlős antigénekre előállított monoklonális ellenanyagok reakciója coelomasejt lizátumon indirekt ELISA rendszerben.....	49
13. ábra. Coelomasejtek áramlási citometriai analízise intracelluláris jelölés alapján..	51
14. ábra. Immuncitokémiai és -hisztokémiai reakciók anti-TNF- α mAt-tel giliszta sejteken és szöveteken.....	52
15. ábra. Savi foszfatáz kimutatása enzimek kémiai és immuncitokémiai módszerrel coelomasejtekben.	54
16. ábra. Különböző coelomasejt populációk áramlási citometriás analízise.....	56
17. ábra. Coelomasejt alpopulációk immuncitokémiai és immunfluoreszcens festése monoklonális ellenanyagokkal (a-EFCC klónokkal).....	58
18. ábra. Giliszta keresztmetszetek immunhisztokémiai és immunfluoreszcens festése specifikus monoklonális ellenanyagokkal.....	60
19. ábra. Coelomasejt lizátumok fehérjeprofili vizsgálata specifikus ellenanyagokkal.....	61
20. ábra. EFCC1 epitópot hordozó fág gátolja az anti-EFCC1 ellenanyag kötődését giliszta sejt-lizátumhoz.....	63
21. ábra. <i>Planorbarius corneus</i> csiga metszet immunfluoreszcens és immunhisztokémiai festése az a-EFCC1 ellenanyaggal.....	64
22. ábra. A coelomasejtek fagocita aktivitása, a sejtcsoportok funkcionális különbségének azonosítása mAt-ek segítségével.....	66
23. ábra. Coelomasejtek enkapszulációs folyamata.....	67
24. ábra. Coelomasejtek AcP tartalom változása fagocitózis hatására.....	68
25. ábra. Coelomasejtek citotoxikus aktivitása.....	70
26. ábra. A coelomasejtek kettős immunfluoreszcenciai és immuncitokémiai festése.....	74
27. ábra. A coelomasejtek védekezési reakciókban betöltött szerepének hipotetikus sémája..	78
1. táblázat. Rovarokban található antimikrobiális peptidok csoportosítása.....	12
2. táblázat. A coelomociták részletes csoportosítása.....	21
3. táblázat. Emlős sejt-felszíni antigénekre specifikus ellenanyagok coelomasejteken mutatott reakciója.....	50
4. táblázat. AcP enzimetartalom eloszlása coelomasejt alpopulációkban..	53
5. táblázat. Az a-EFCC 1/1 ellenanyag keresztreakciós mintázata más fajokon.....	63
6. táblázat. Áramlási citometriai méréseink során használt ellenanyagok táblázata, feltüntetve az ellenanyagok reakcióit a különböző sejtcsoportokkal.....	72

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABP- antigén kötő fehérje

AcP-savi foszfatáz

AEC-3-amino-9-etil karbazol

AP-alkalikus foszfatáz

APC-antigén prezentáló sejt

BCIP-5-bromo-4-kloro-3- indolil foszfát

BSA- marha szérum albumin

CCF-coeloma citolitikus faktor

Cu/Zn SOD- Cu/Zn szuperoxid dizmutáz

CTL-citotoxikus T limfocita

DAPI-4',6-diamidino-2-fenilindol

ECL- enhanced chemilumineszcens reagens

EFCC- *Eisenia fetida* coelomasejt cluster

EGF-epitheliális növekedési faktor

ELISA-enzyme linked immunosorbent assay

FCS-fötális borjú szérum

FITC-fluoreszcein-izotiocianát

IL- interleukin

HRP-torma peroxidáz

HSA-humán szérum albumin

KDO-2-keto 3-deoxyooktonát

KLH- tengeri csiga hemocianin

LBSS-„Lumbricus” sóoldat

LPS-lipopoliszacharid

MALDI-Matrix Associated Laser Desorption Ionisation

mAt-monoklonális antitest

MBL- mannóz kötő lektin

MHC- fő hisztokompatibilitási fehérje

MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazóliumbromid

NBT- nitro-blue tetrazólium

NGF- idegnövekedési faktor

NK- natural killer sejt

NOS-nitrogén monoxid szintáz

PAGE-poliakril amid elektroforézis

PI-propidium jodid

PBS-foszfát pufferolt sóoldat

proPO-profenol-oxidáz

ROI-reaktív oxigén intermedierek

OPD-orthofenilén-diamin

TLR-Toll like receptor

TNF-tumor nekrosis faktor

TSH- thyroid stimuláló hormon

WST-1-4-[3-{4-Iodophenyl}-2-{4-nitrophenyl}-2H-5-tetrazolio]-1,3 benzén disulfonát

3. ÖSSZEFOGLALÁS

1. A giliszták természetes immunitását kísérletesen vizsgálva sikerült megfigyelnünk olyan **sejtpopulációkat, melyek konzervált antigéneket (citotoxikus citokinek, sejtfelszíni molekulák, enzimek, hormonok) felismerő monoklonális ellenanyagokkal mutatnak keresztreakciót.** Az irodalmi adatok alapján ismert, hogy a gerinctelen állatokban is kimutattak már citokin-szerű molekulákat, melyek feltehetően részt vesznek immunológiai folyamatokban. Ezek az ún. gyulladásozó citokinek csoportjába tartoznak (IL-6, IL-8, TNF- α). Két coelomasejt populáción (R1 és R2) mutatott reakciót az anti-TNF- α monoklonális ellenanyag. Hasonló keresztreakciókat kaptunk két sejtfelszíni molekula (CD24 és a Thy-1) esetében is.

2. A fehérvérsejtek vizsgálatában alapvető a specifikus molekuláris markerekkel történő jellemzés, amihez elengedhetetlen a monoklonális ellenanyagok használata. A gerinctelen immunsejtekre csak néhány monoklonális ellenanyagot állítottak eddig elő, melyek elsősorban a rovar hemocitákra specifikusak. **Hibridóma-technika segítségével létrehoztunk egy monoklonális ellenanyag-könyvtárat (anti-EFCC klónok), melyek giliszta szövet és coelomasejt specifikusak.** Ezekkel az ellenanyagokkal a coelomasejtek szöveti lokalizációját is elvégeztük. Az ellenanyagok festődési mintázata összhangba hozható volt a korábbi morfológiai vizsgálatok eredményeivel és megerősítette a coelomasejtek mezodermális eredetére vonatkozó teóriákat. Ezzel megnyílt a lehetőség a coelomasejtek képződésének szisztematikus vizsgálatára és -további ellenanyagok segítségével - követni tudjuk majd a sejtek egymásközi leszármazási vonalait. Áramlási citometriában reprodukálni tudtuk az immuncitokémiai eredményeket, sikerült három, antigén mintázatában jól elkülönülő populációt azonosítanunk. Western-blot és immunprecipitációs vizsgálatokkal igazoltuk, hogy ellenanyagaink különböző fehérjespecifitással rendelkeznek.

3. Funkcionális tesztekkel (fagocitózis, enkapszulációs assay) sikerült bizonyítanunk, hogy **ellenanyagaink képesek elkülöníteni két, a védekezésben eltérő funkciójú sejtcsoportot.** Más fajokon végzett (elsősorban rovar) alapján ismert az, hogy a védekezősejtek egyes populációi funkcionális megoszlást mutatnak, és más-más védekezési folyamatban vesznek részt, sőt az egyes populációk képesek egymással „kooperálni” a folyamat során.

4. Random peptid könyvtárt hordozó fág-display segítségével térképeztük az ellenanyagaink epitóp specificitását és **meghatároztuk az EFCC1 antigént felismerő**

ellenanyagunk epitópját. Ez egy hat aminosavas peptidszakasznak bizonyult, aminek fejlődésbiológiai elemzését – bioinformatikai technikákkal - megkezdjük. A vizsgálatok továbbfolytatására egy coelomasejtes cDNS könyvtár kialakítását kezdtük el.

5. A coelomasejtek lizoszomális marker enzimaktivitását, immunreaktivitását tanulmányozva szintén heterogén populációkat találtunk a coelomasejtek között. **A savi foszfatáz enzimtartalom változást** (aktivitás növekedést) **mutatott a coelomasejtekben baktériumok fagocitózisa után.** Ez a megfigyelés párhuzamba hozható más fajokon (gerinceseken és gerincteleneken) kapott eredményekkel, amiből arra következtetünk, hogy a lizoszomális enzimeknek (savi foszfatáz) feltehetően jól regulált szerepe van a földigiliszta immunfolyamataiban is.

6. A celluláris funkciók mellett a humorális védekezésben is részt vállalnak a coelomasejtek. Citotoxicitási tesztekkel sikerült igazolnunk a coelomafolyadék, sejtlizátum, coelomasejt tenyészet sejtpusztító hatását emlős sejtvonalakon. Ez a faktor fehérjetermészetű, hődenaturáció, enzimatis emésztés (Proteináz K) hatására elvesztette aktivitását, míg tripszines emésztés nem változtatta meg a citotoxikus aktivitást.

4. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A földünkön jelenleg élő mintegy kétmillió állatfaj 95%-át a gerinctelen élőlények képviselik. Több százmillió évet felölelő evolúciójuk az egysejtű protozoáktól a bonyolult előgerincesekig óriási diverzitást eredményezett. E hosszú fejlődés során gyakran igen kedvezőtlen környezetben kellett túlélniük. Az életben maradáshoz a rövid élettartam és a nagy számú utód mellett az egyre sikeresebbé váló alkalmazkodás biztosította. Az evolúció folyamata nemcsak az élettelen környezeti faktorokhoz történő egyre sikeresebb alkalmazkodást, hanem a más élőlényekkel szembeni védekezés fejlődését is eredményezte. Az alkalmazkodás során a soksejtű élőlények olyan struktúrákat fejlesztettek ki, melyekkel sikeresen védekeztek a környezeti kórokozók ellen. A biológiai szabályozás egyre bonyolultabbá vált az evolúció során, ugyanakkor folyamatosan megőrizte azokat a struktúrákat, melyek a korábbi fázisokban a legfontosabbnak bizonyultak. Így a magasabbrendűek, köztük az emlősök és az ember védekező mechanizmusai is őrzik azokat a korábbi evolúciós fázisokban létrejött – és a védekezésben sikeres - elemeket, melyek közvetlen módon öröklődve, továbbra is fontos szerepet töltenek be a környezetből érkező kórokozók elleni védelemben. A természetes (veleszületett) immunitás evolúciójának vizsgálata tehát nemcsak teoretikus fontossággal bír, hanem gyakorlati jelentőségű is.

4. 1. A gerinctelen állatok természetes immunrendszerének általános jellemzése

A legtöbb gerinctelen számára nagyon fontos védelmet jelent a fizikai-kémiai barrier: ha ezen az első védelmi rendszeren átjutnak a kórokozók, az állatok természetes immunrendszerével találkoznak. Ez a rendszer nem specifikus, nem klonális védekező rendszer, válaszadó képessége ismételt fertőzés esetén nem javul, nincs memória. A természetes immunitás kialakításában különféle sejtek és oldott molekulák egyaránt részt vesznek, ennek megfelelően celluláris és humorális immunitásról beszélünk.

4. 1. 1. Celluláris védekezési mechanizmusok

A **celluláris** védekezésben immunsejtek több csoportja vesz részt, az elnevezésük, terminológiájuk törzsek, sőt fajok között is eltér. Legfontosabb sejtes védekezési mechanizmusok a fagocitózis, melanotikus enkapszuláció, valamint reaktív oxigén- és nitrogén intermedierek termelése. Bizonyos sejtek olyan molekuláris termékeket szintetizálnak és szekretálnak, melyek segítik a túlélést a számukra előnytelen környezetben (Ratcliffe és mtsai 1985).

Bár a gerincesekre jellemző klasszikus természetes ölüsejtek (NK) általában nincsenek jelen a gerinctelenekben, több gerinctelen szervezetben mégis mutattak ki NK-szerű citotoxikus aktivitást (Nappi és Ottaviani 2000). A *Planorbarius corneus* csigafaj hemolimfájában két különböző sejt található: adheráló és nem-adheráló, kerek hemociták. Mindkét típusú sejt szerepet játszik a graftok kilökődésében, a *P. corneus* ugyanis képes elpusztítani az allo- és xenograftokat enkapszuláció révén (Ottaviani 1992). Az autogén beültetések ezzel szemben nem váltanak ki választ.

4. 1. 2. Humorális védekezési mechanizmusok

Antibakteriális és citotoxikus molekulák

Lizozim

A tápcsatorna sejtjei által termelt antibakteriális fehérje, amely elsősorban a kültakarón vagy az emésztőcsatornán át behatolt mikroorganizmusok ellen fejt ki hatását. Proteinázként működik, pórusokat nyit a bakteriális membránban, és megzavarja az ionegyensúlyt.

Reaktív oxigén- és nitrogénintermedierek (ROI, NOI)

A paraziták vagy patogének által kiváltott gyors celluláris válaszok főleg a sejt felszínén következnek be. Az állati védelmi rendszerek evolúciójában valószínűleg a fagocitáké volt a kulcsszerep. A korai reakciókban gyakran a már meglévő komponensek aktiválódnak (pl.: extra-és intracelluláris pH, ionáramok megváltozása, membránproteinek keresztkötése és oxidatív immobilizációja). Miután aktiválódnak,

gyors és összehangolt reakciókat indítanak el, melyek egy része tipikusan oxigéntől függő, másik része attól független (Nappi és Ottaviani 2000).

A reaktív oxigén- és nitrogén intermedier molekulák (ROI és NOI) mint citotoxikus molekulák alkalmazása evolúciós szempontból ősi természetes immunválasz, a növényeknél és az állatoknál egyaránt megfigyelhető. A fagociták antimikrobiális hatású ROI és NOI termelését ligand-receptor interakciók váltják ki. A ROI termékek, melyek produkciójában részben a NADPH oxidáz játszik szerepet, minden eukarióta sejtben keletkeznek az elektrontranszfer folyamatokban, mégis leghatékonyabban a fagociták szintetizálják légzésük során. A fagocitózist kísérő anyagcserefolyamatok („oxigen burst”) a membránhoz kötött oxidázok aktiválódásával járnak, és a mikroorganizmusokra erősen toxikus szuperoxid-anionok képződését segítik elő. A szuperoxid további oxidáló anyagok (hidroxilgyökök, „singlet” oxigén, hidrogénperoxid) képződését indukálja. A hidrogénperoxid (H_2O_2) szuperoxiddal (O_2^-), átmeneti fémekkel vagy nitrogénmonoxiddal reagálva szintén hidroxilgyököt ($\cdot OH$) képezhet. Az aktivált fagociták ROI produkciójában a NADPH oxidázon kívül egyéb enzimek is részt vesznek, így a xantinoxidáz, glükózoxidáz, az arachidonsav metabolizmus és a mitokondriális elektrontranszport enzimeik.

A nitrogén reaktív intermedierjei (NOI) nitrogénmonoxidból származnak, amit L-argininből a nitrogénmonoxid szintáz (NOS) hoz létre. A NOS megtalálható a fonalférgekben, gyűrűsférgekben, rovarokban, rákokban, puhatestűekben és tüskésbőrűekben. Három izoformája közül kettő konstitutív és NADPH-t, megemelkedett Ca^{2+} -szintet és kalmodulin aktivációt igényel a NO szintézishez. A harmadik izoforma (iNOS) lipopoliszacharidokkal vagy citokinekkal indukálható, kalciumtól, kalmodulintól független, de működéséhez NADPH szükséges (MacMicking és mtsai 1997).

Citokinszerű molekulák

A gerinctelenek számos citokinszerű molekulát termelnek, melyek a nem-specifikus immunválasz részei. Ezek a molekulák aktivált immunsejtekből szabadulnak fel, rendkívül fontosak az antimikrobiális védelem effektor mechanizmusainak indukálásában. A citokinek közé tartoznak gerinceseknél az interferonok (IFN), az interleukinek és a TNF- α család egyes tagjai. A citokinek több funkcionális analógját leírták különböző gerinctelenekben (pl.: IL-1, IL-2, IL-6 és TNF- α analógjait gyűrűsférgekben, puhatestűekben, tüskésbőrűekben). Ezek a gerinctelen eredetű, citokinszerű molekulák több biológiai funkciójukban hasonlítanak a gerincesek citokinjeihez, és

az emlős citokinekre specifikus antitestekkel gyakran keresztreakciót adnak (Beck és mtsai 1996; Beck 1998; Ottaviani és Franceschi 1997; Beschin és mtsai 2001), azonban nukleinsav és aminosavszekvencia homológia köztük egyelőre nem ismert.

Antimikrobiális peptidek

Molekulák hatalmas csoportját képviselik, nagy szerkezeti diverzitással és széles hatásspektrummal bírnak. Közös tulajdonságuk, hogy képesek a mikrobiális membránokat átjárhatóvá tenni (Rosetto és mtsai 1996; Bulet és mtsai 1999). A rovarokban eddig több, mint 150 antibakteriális és gombaellenes peptidet, polipeptidet találtak, melyeket a zsírtest (a gerinces máj funkcionális megfelelője, Bulet és mtsai 1999) mellett a gonádok és a bél termel, de puhatestűekben (pl.: myticin, defenzin, mytilin, mytimicin), rákokban (pl.: paneidin) és gyűrűsférgekben (pl.: lumbricin) is nagy számban található. Ezek általában 100 aminosavnál kisebb, amfipatikus molekulák, jól definiált alfa-hélix ill. béta-lemez szerkezettel. Elsősorban azokban a sejtekben termelődnek, amelyek először találkoznak a kórokozókkal, így a légző-, bél- és urogenitális traktust bélelő epiteliális sejtekben, másrészt a cirkuláló sejtekben. Szintézisük lehet konstitutív vagy indukálható. Konstitutív termelődés esetén a hemociták termelik és a citoplazmatikus granulumok tárolják, míg a másik esetben fertőzés hatására indukálódik a szintézis. Antibakteriális hatásukat a mikrobiális membrán permeábilisabbá tételével fejtik ki, ami ionegyensúly változást és depolarizációt okoz. A citoplazmatikus ATP szint csökkenése akadályozza a respirációt, ami végül sejthalálhoz (valószínűleg apoptózis) vezet. Az antifungális hatás a spóracsírázás és hifanövekedés gátlásában jelentkezik, ami abnormális sejtalakot eredményez.

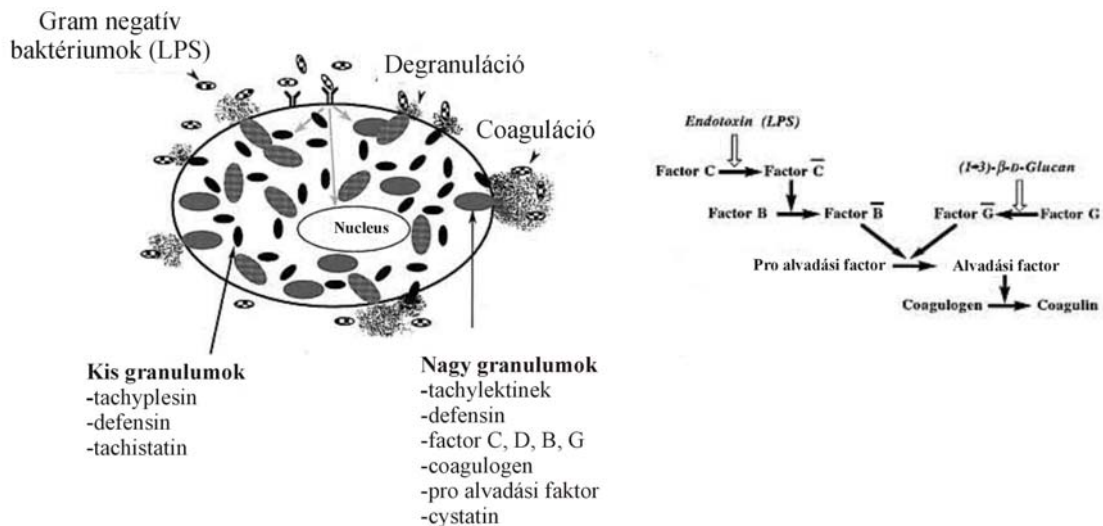
Az 1. sz. táblázat foglalja össze a rovarokban leírt antimikrobiális peptidek főbb jellemzőit.

Peptidcsoport	Kémiai jelek	Specifitás	Példák
Cekropinek	lineáris szerkezet, 2 α -hélix kapcsolódik össze, 4 kDa kationos peptidek	Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok ellen	<i>Hyalophora cecropia</i> cekropinja
Ciszteinben gazdag peptidek	1-4 diszulfid híd 2-6 kDa	antifungális és antibakteriális hatás	Rovarok defenzinjei, drosomycin, thanatin, heliomycin
Prolinban gazdag peptidek	2-3 kDa peptidek	Gram-negatív baktériumok és gombák ellen	drosocin, metchnikowin
Glicinben gazdag peptidek	8-24 kDa	Gram-negatív baktériumok indukálják	attacin, sarcotoxin II, diptericeinek

1. táblázat. Rovarokban található antimikrobiális peptidek csoportosítása (Bulet és mtsai 1999)

Koaguláció

A véralvadás - a testnedvek fehérjekomponenseinek koagulációja - szintén az immunológiai védekezést szolgálja. A hemolimfa alvadását a *Limulus polyphemus* rákban vizsgálták legalaposabban. Ebben a fajban LPS és β -1-3-glukán hatására szerin proteáz zimogének indítják el a koagulációs kaszkádot (Muta és Iwanaga 2003). A reakcióban részt vevő komponensek több protein domént is tartalmaznak: komplement-related domén, C-típusú lektin domén, EGF-szerű domén, NGF-szerű domén. A *Manduca sexta* lepkefajban egy olyan indukálható glükózspecifikus lektint izoláltak, mely szintén rendelkezik hemocita koaguláló aktivitással (Minnick és mtsai 1986). A scolexin a *M. sexta* lárvában vírus vagy baktériumfertőzés hatására termelődő plazmaprotein, mely hemagglutináló és lektinaktivitással is bír (Kyriakides és mtsai 1995). A zimogének valószínűleg proteolízis és sókötések révén aktiválódnak. De az is lehetséges, hogy szubsztráttal, kofaktorral képeznek komplexet pl.: egyfajta lektin/szerin-proteáz komplexet, hasonlóan a humán komplementrendszer aktiváló humán mannóz-kötő proteinhez (MBL) és asszociált szerin proteázokhoz (MASP) (Sato és mtsai 1994).



1. ábra. *Limulus polyphemus* rák immunsejtje (granuláris sejt), koagulációs kaszkád. LPS és glukán jelenlétekor degranulálódnak az immunsejtek, iniciálódik a kaszkád (Muta és Iwanaga 2003).

Melanizáció

Egyes gerinctelenek, köztük is elsősorban a rovarok (pl.: *Drosophila*), rákok fertőző ágensek elleni védelmében katekolamin eredetű pigment intermedierek is szerepet játszanak, mint például a melanin proteolitikus kaszkád citotoxikus elemei az enkapszuláció (tokképződés) folyamán. A melanin tirozinokból felépülő polimer, amelynek különböző formái a növényekben és a magasabbrendű állatok szervezetében is jelen van. Bioszintézisének folyamatában a fenoloxidáz döntő szerepet játszik. Ez a tirozináz enzim a rovarok hemocitáinak granulumaiban inaktív prekurzorként, pro-fenoloxidázként (proPO) található, amit más proteázok aktiválnak (Johansson és Söderhäll 1996; Smith 1996; Söderhäll és Cerenius 1998). Az enzimkaszkád akkor aktiválódik, amikor baktérium vagy többsejtű parazita kerül a rovar szervezetébe, a behatoló a melaninszintézis során keletkező toxikus anyagok hatására, hemociták alkotta tokba zárva eliminálódik.

4. 1. 3. Mintázatfelismerő molekulák, lektinek

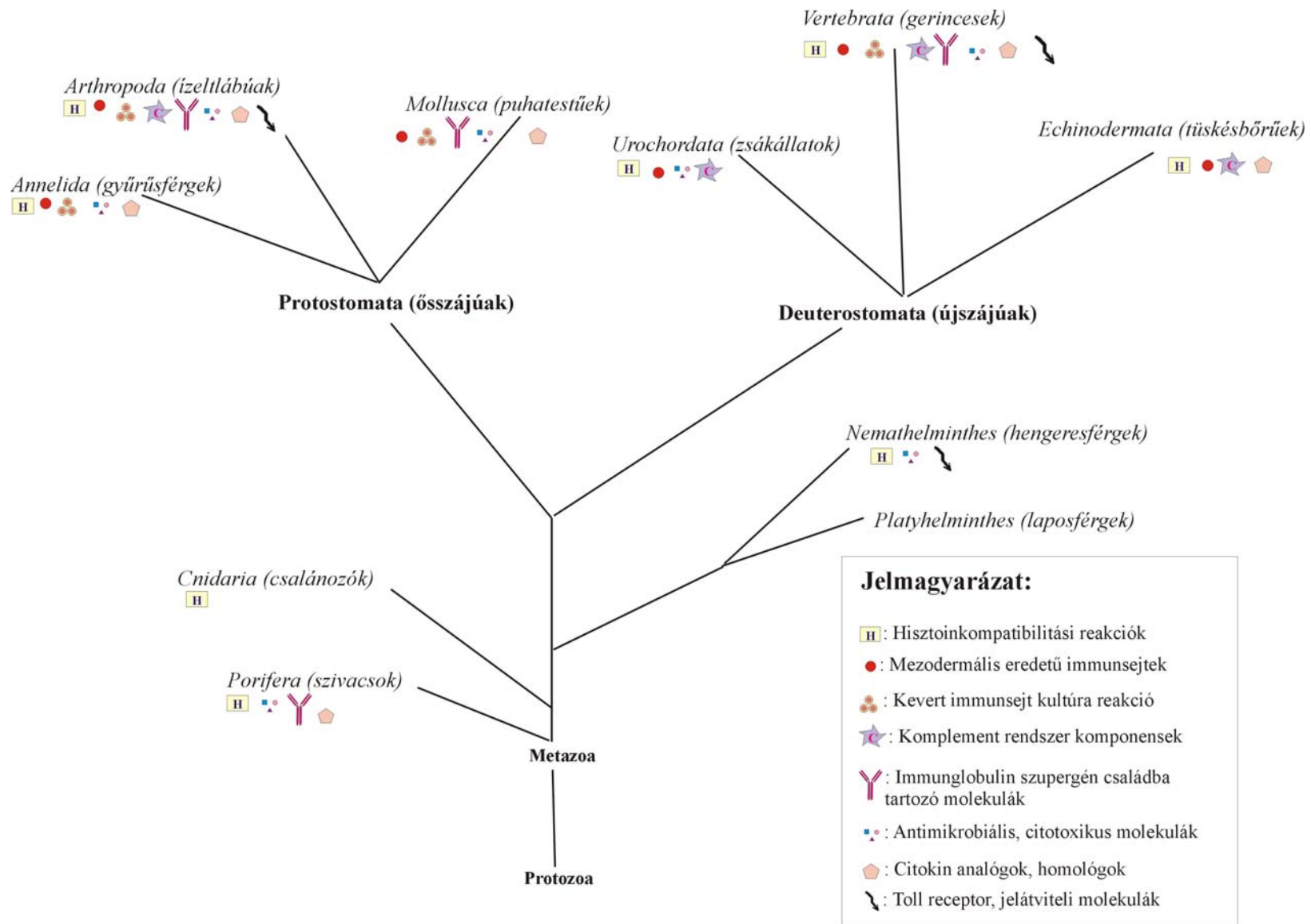
Olyan elemeket ismernek fel, amelyek azonosak a különböző patogéneknél. Rovarokban számos mintázatfelismerő molekulát azonosítottak, pl.: lipopoliszacharid-kötő protein, Gram-negatív baktérium-kötő protein, peptidoglikán-kötő protein és β-1,3-glukán felismerő protein (Trenczek 1998). A mintázatfelismerő fehérjék a plazmában

szabadon vándorló molekulák vagy plazmamembrán receptorok lehetnek, ebben az esetben mintázatfelismerő receptoroknak nevezik. A *Bombyx mori* selyemmoly fajban a specifikus peptidoglikán kötő fehérje és az exogén peptidoglikán kapcsolódása nélkülözhetetlen a melaninszintézist eredményező proPO kaszkád elindításában (Ochiai és Ashida 1999).

A lektinek enzimatis funkcióval nem rendelkező szénhidrátkötő proteinek vagy glikoproteinek. Opszonizáló és sejtagglutináló sajátságúak, a patogén mikrobákat és a Metazoa parazitákat agglutinálják, immobilizálják, elősegítve a fagocitózist és az enkapszulációt. Egyeseknek szerepe van a proPO rendszer, a melanotikus kaszkád aktivációjában (Ratcliffe és mtsai 1991).

A legismertebb jeltovábbító molekula a Toll, melyet először *Drosophila*-ban írtak le, majd megtalálták a gerinces Toll-szerű molekulákat is (jelenleg 9 molekulát ismernek). A receptor bakteriális LPS felismerésére képes (emlősökben a TLR-4) *Drosophila*-ban a Rel jelátviteli utat indukálja, antimikrobiális peptidek termelődését váltja ki (Horng és Medzhitov 2001). Érdekes, hogy a *Caenorhabditis elegans*-ban is ismertek a Toll molekulának a megfelelő homológjai, de ezek nem vesznek részt az antimikrobiális peptid termelés jelátviteli útjában (Couillaullt és mtsai 2004).

Az immunrendszer fejlődése során kialakult fontosabb komponensek evolúciós sémáját a 2. sz. ábra foglalja össze.



2. ábra. Az immunrendszer fejlődésének szempontjából fontos elemek megjelenése a törzsfajlás során.

4. 2. A giliszta immunrendszere

Az Annelida (gyűrűsférgék) törzs Oligochaeta osztályába tartozó földigiliszták, mint modellek a 60-as évek elején jelentek meg az összehasonlító immunológiában. Transzplantációs kísérletek hívták fel a figyelmet ezekre az állatokra, melyek a giliszta bőrízomtömlőből származó autológ transzplantátumokat befogadták, szemben az allogén és xenogén szövetekkel (Cooper és Roch 1994). Immunsejt által mediált, rövidtávú memória is megfigyelhető volt a transzplantációs kísérletekben (Bailey és mtsai 1971; Cooper 1975). Ezen eredményekhez hozzá kell fűzni, annak ellenére, hogy más fajokban is történtek hasonló megfigyelések, ez a kérdés még nincs megfelelően körüljárva és máig is sokan vitatják az immunológiai memória létezését gerinctelenekben (Kurtz és Franz 2003; Tettamanti és mtsai 2003). Ezek az eredmények a saját, nem-saját felismerés jelenlétének bizonyítékául szolgáltak a gilisztákban, lendületet adva a további összehasonlító immunológiai kutatásoknak, ezen belül a giliszta, mint modell alkalmazásának.

4. 2. 1. A giliszták általános felépítése

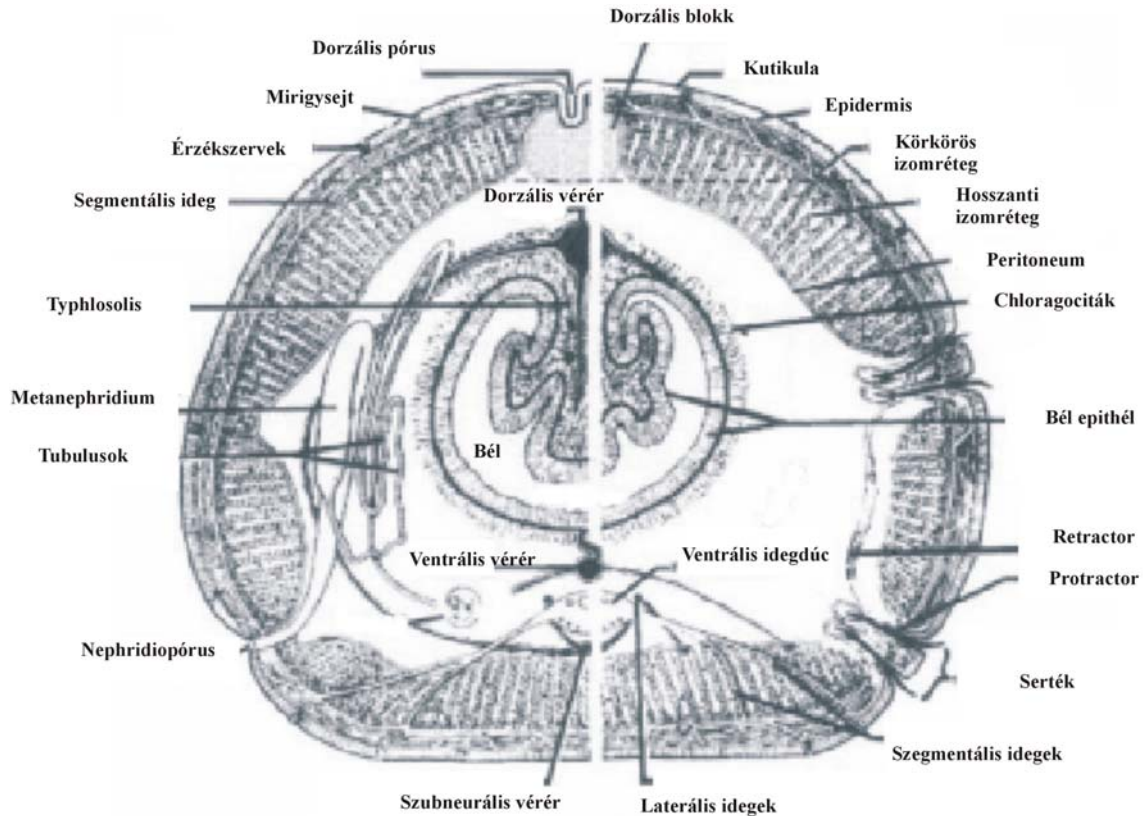
A giliszták rendszertanilag a gerinctelenek egyik legfőbb törzsébe a gyűrűsférgék (Annelida) közé tartoznak. Több mint 9000 faj tartozik ide. Ezeket 3 osztályra lehet osztani:

- Polychaeta (soksertéjűek)
- Oligochaeta (kevésertéjűek)
- Hirudinea (piócák)

A földigiliszták összajú (Protostomia) állatok, valódi mezodermális eredetű másodlagos testüreggel (coeloma) rendelkeznek. A coelomaüreg az érfalakon át a vérből kiszűrődött folyadékot tartalmaz, amelyben az üreg belső falából származó szabadon vándorló coelomociták találhatóak. A coelomafolyadék fontos szerepet tölt be a földigiliszták életében: ozmoregulátor, az átmeneti folyadéktárolás helye, segítségével a belső szervek között jelentős anyagcsere (anyagfelvétel és anyagleadás) zajlik, emellett immunfunkciókkal is bír. A coelomaüreg is szelvényezett, az egyes szelvényeket transzverzális szeptumok választják el egymástól, köztük a coelomafolyadék és a

coelomociták szabályozott transzportja a szeptumon keresztül szfinkterrel körülvett csatornákon át biztosított. Az üreg minden szelvénye páros metanephridiummal és egy dorzális pórusal érintkezik a külvilággal. A dorzális pórusok muskuláris szfinkterekkel rendelkeznek, így képesek az intracoelomikus nyomásviszonyok, valamint a külvilág és a testüreg közötti folyamatos anyagcsere szabályozására (Cameron 1932).

A földigiliszták első, passzív védelmi vonala, a bőr. A giliszták kültakarója epidermiszből és vékony kutikulából áll, mely az egész testet beborítja. A kutikula mukopoliszacharidokat tartalmaz, melyek antimikrobiális barrierként is szolgálnak (Rahemtulla és Løvtrup 1974, 1975). Az epidermisz egyrétegű hengerhám támasztósejtekkel, bazális sejtekkel és kiválasztósejtekkel. A bazális sejtek fontos szerepet játszanak a regenerációban, gyakran fagocitotikus aktivitást mutatnak (Chapron 1970a; Valembois 1971). Előfordul, hogy ezeket a sejteket nem is tekintik igazán epidermális eredetűnek, sokkal inkább a coelomocitákkal homológoknak (Burke 1974 a-c). Az egysejtű mirigyek a mukopoliszacharid-lipid-protein komplexet tartalmazó nyákot termelnek. Ez a váladék a súrlódás csökkentésével elősegíti az állat mozgását, nedvesen tartja a felületet biztosítva a légzést, valamint antibakteriális faktorokat is tartalmaz (Valembois és mtsai 1986, 1988).



3. ábra. Földigiliszta keresztmetszeti képe (Davoli és mtsai 2002).

A hámot az izomrétegtől vékony, kötőszöveti rostokból álló alaphártya választja el. A testfal (bőrizomtömlő) erőteljes izomzata külső körkörös és belső hosszanti rétegből épül fel, belülről peritoneum borítja.

A tápcsatorna részei: szájnyílás, kiölthető garat, nyelőcső, begy, gyomor, középbél, utóbél, végbélnyílás. A nyelőcső járulékos mirigyei, az ún. mészmirigyek, melyek a talajból bekerülő és felszívódó anyagok közömbösítését, a belső környezet kémhatásának szabályozását biztosítják. A középbél felületét borító peritoneumot chloragogén sejtek alkotják.

A földigiliszták keringési rendszere zárt, központja a nyelőcső körüli öt pár pulzáló tág harántedény („szív”). Vérük a plazmában oldott hemoglobintól piros színű. A földigiliszták kiválasztószerve a szelvényenként ismétlődő páros metanephridium.

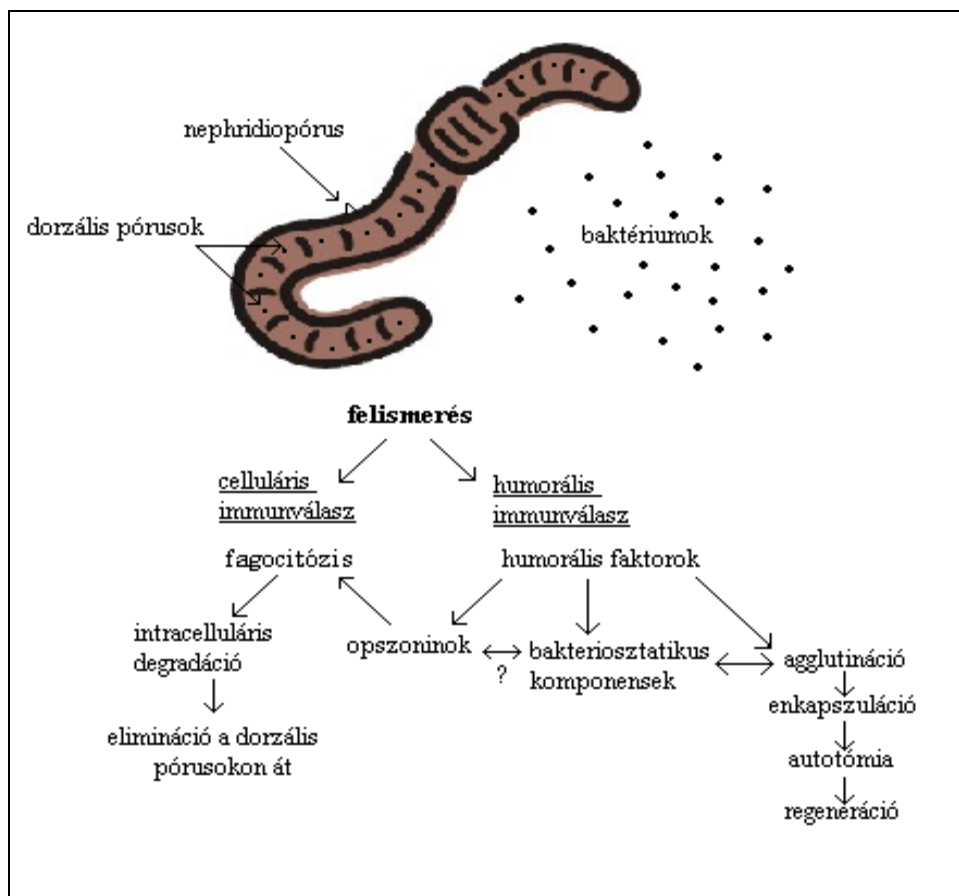
A központi idegrendszer agydúcból, garat alatti dúcból és hasdúcláncból áll, a dúcokból szelvényenként három pár perifériás ideg lép ki. A rostok főleg a testfalban futnak, de a belső szervekhez is adnak le ágakat, az epidermisz alatt az egész testre kiterjedő hálózatot képeznek. Hímnős állatok, a peték a párzási időszakban a megvastagodott nyereg által termelt, a kölcsönös megtermékenyítés után az állatról leváló tokban (cocon) fejlődnek (Mill 1978).

4. 2. 2. A giliszták immunrendszerének szerveződése

A patogén mikrobák mechanikai sérülés nélkül is bejuthatnak az állat szervezetébe, elsősorban a dorzális pórusokon és a nephridiopórusokon keresztül (Cameron 1932). Éppen ezért a coelomafolyadék sosem steril, mindig tartalmaz külvilágból származó baktériumokat, protozoákat és gombákat. A mikroorganizmusok eliminálása történhet a metanephridiumokon keresztül, de a nephrostoma (csillangós tölcsér) sejtjei is felvehetik a kórokozókat. Egy másik hatékony mechanizmus is szabályozza a mikroorganizmusok szaporodását: a coelomafolyadékban található fagociták valamint humorális faktorok együtt könnyedén akadályozzák meg a testüregbe került baktériumok invázióját (**4. ábra**).

A földigiliszták coelomafolyadéka többféle coelomocitát tartalmaz. Ez utóbbiak bizonyos gerinces leukocitákhoz hasonlóak morfológiai, citokémiai és funkcionális szempontból, ezért gyakran ezeket is leukocitáknak nevezik (Větvička és mtsai 1994). A coelomafolyadék antimikrobiális és citotoxikus molekulákat tartalmaz, melyek immunbiológiai folyamatokban vesznek részt (Kauschke és Mohrig 1987a, b; Stein és

Cooper 1988; Hirigoyenberry és mtsai 1990; Lassègues és mtsai 1997). Szerepet játszanak többek között az opszonizációban, agglutinációban, fagocitózisban, gyulladáskeltésben, lízisben, *in vivo* az allogén és xenogén transzplantátumok eliminálásában, *in vitro* különféle célsejtek elpusztításában. A coelomociták celluláris funkcióinak alapja a fagocitózis és a sejt-sejt felismerés (Roch 1996). A humorális komponensek: a fetidinek, az agglutininek, a lizozim, a fenoloxidáz rendszer.



4. ábra. A giliszta természetes immunrendszerének összetevői (Tučková és Bilej 1996; után módosítva).

A coelomasejtek eredete

A védekezési folyamatokban alapvető szerepet játszanak a coelomasejtek, melyek pontos származása, illetve egymás közötti leszármazási vonalai még nem tisztázottak. Több kutató szerint a sejtek a coelomaüreg epitheliális vonalából (splanchnopleura és somatopleura)

származnak, illetve az epitheliummal kapcsolatban álló speciális struktúrákból erednek és a coeloma a ventrális és dorzális coelomazsák összeolvadásából keletkezik.

Számos fajban a coelomasejtek közvetlenül a coeloma epitheliumából származnak (néhány fajban, pl. *Pheretima*, *Tubifex* a coeloma epithelből kialakult specializált „szervek” képezik a sejteket).

A Lumbricidae család (a legjobban ismert csoport) coelomasejtjei közt két elsődleges sejtcsoportot sikerült elkülöníteni:

- Amöbocita és
- Eleocita/Chloragogén csoportokat.

Az amöbocita vonal sejtjeit három különböző őssejt típusból vezetik le (Jamieson 1981a).

Az első típus fal peritoneum eredetű: **granuloblast**→granulocita



„fibrilláris” leukocita

A második típus: **hialoblast**→ „hialocita”

A harmadik egy bizonyos differenciálatlan „splanchnopleura” sejt, mely kapcsolatot hoz létre az előző két típus között. Ebből származtathatóak egyéb sejt típusok is.

A belső peritoneum képezi a nagymértékben specializált szöveteket, mint a **chloragogént**. Ezek a sejtek a középbél falán is megtalálhatóak rögzítve illetve a typhlosolis redőben is jelen vannak. A chloragogénsejtek gyakran megtalálhatóak a coelomaüregben is, bár itt a sejtek egy része már előregedett formában van jelen. Ezeket a levált chloragogénsejteket eleocitáknak nevezik. Elterjedt olyan elképzelés is, mely az eleocitát, elvonatkoztatva a chloragogénsejttől, külön coelomasejt típusként tárgyalja (Jamieson 1981b).

A coelomasejtek morfológiai és citokémiai jellemzése

Az Oligochaeták coelomasejtjeinek morfológiáját öt-hat faj elemzése alapján (Lumbricidae, Enchytracheidae) állapították meg. A Lumbricidae coelomasejteket több, különböző csoportra osztották. Végül két nagyobb csoportra a már korábban bemutatott amöbocitákra és eleocitákra tipizálták a sejteket (Cooper és Stein 1981; Cooper 1996; Cooper és mtsai 2002; Jamieson 1981a, b).

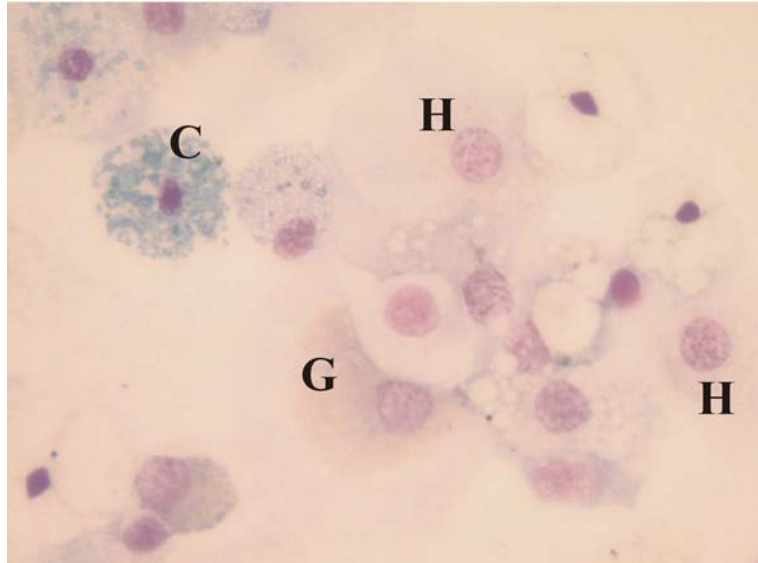
Név	Sejttípus	Frekvencia	Nagyság (µm)
Granuláris amöbociták	Acidofil I	6,2±3,4	10-30
	Acidofil II	0,7±0,5	10-15
	Granulocita	8,1±6,6	8-40
Hialin amöbociták	Bazofil	63,5±6,1	5-30
	Neutrofil	18,0±5,9	12-15
Eleociták	Chloragogén I	1,4±0,9	10-60
	Chloragogén II	1,4±0,9	12-20

2. táblázat. A coelomociták részletes csoportosítása (Jarosz és Glinski 1997)

A coelomasejtek (5. ábra) szerepére vonatkozó adatok elsősorban trágyagilisztából (*Eisenia fetida*) és a közönséges földigilisztából (*Lumbricus terrestris*) ismertek. A szabad coelomociták a mezenchimából származhatnak, vagy lehetnek szabadon proliferálódók. Egyes szerzők az amöbocitákat a vérsejtek prekursorainak tekintik. A kisebb sejtek transzplantációs graft és sérülés hatására stimulálhatók, a mezenchimából származók az antigén ingerekre azonnal proliferálnak.

Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a coelomocitáknak két populációját különítették el: ezek a leukociták és a chloragociták. Az előbbi, nem granulált sejteket további két csoportra osztották: gerinces limfocitákhoz hasonló kis (5-10 µm), kerek, illetve nagy (15-25 µm), szabálytalan alakú amöboid, makrofágra emlékeztető sejtekre. A chloragociták mérete 15-30 µm, citoplazmájuk jellegzetes intracitoplazmatikus granulumokat, a 0,2-1 µm nagyságú, trilamináris membránnal határolt (Lindner, 1965) chloragosomákat tartalmazza.

Fénymikroszkóposan több csoportot különítettek el, melyeket alábbiakban részletezünk.



5. ábra. A coelomasejtek típusai: hialin (H) és granuláris amöbociták (G), chloragociták (C) (May-Grünwald Giemsa festés, 400x).

A **bazofil** coelomasejtek erősen festődő citoplazmával rendelkeznek, melyben gyakran sötétkék granulomok figyelhetők meg, a mag általában a sejt középső részén található, sötétibolyaszínűre festődik. Gyakran képeznek pseudopodiumokat (állábakat). Jellegzetességük, hogy képesek erősen adherálni egymáshoz. Mind savi foszfatáz, mind β -glukuronidáz aktivitás jelen van a sejtekben.

A **neutrofil** sejtek méretileg igen változóak, szintén képeznek állábakat. Kis, sötét granulomok találhatóak a citoplazmában, melyek fagocitált anyagokat tartalmaznak. Citokémiailag jellemző rájuk a kis RNS tartalom és viszonylag kevés lipid. Savi foszfatáz és β -glukuronidáz aktivitásuk jelentős.

Az **acidofil** sejtek általában granulárisak, a citoplazmájuk vörösesre festődik, granulumaik kitöltik a sejteket. Megfigyelték, hogy a granulomok egy része közel helyezkedik el a sejtmembránhoz, feltehetően tartalmukat az extracelluláris térbe ürítik ki, a szekretált anyag ismeretlen. A sejtek neutrális mucopoliszaharidokat, glicoproteineket, kevés lipidet tartalmaznak és egyáltalán nincs bennük hemoglobin. Savi foszfatáz és β -glukuronidáz aktivitásuk elenyésző.

A **granulociták** világoskék citoplazmája számos granulomot tartalmaz és az élő sejtekben a vakuolumok is jól láthatóak. Savi foszfatáz nagyon kis mennyiségben van jelen.

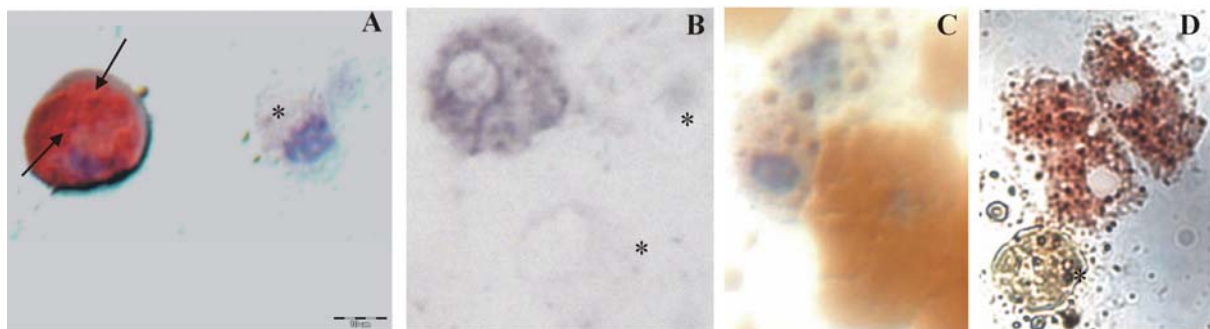
A **chloragogén** sejtek vagy eleociták morfológiai különbségek alapján egy vagy két formára oszthatóak. Erősen granulált sejtek, melyek nem képeznek pseudopodiumokat. Az

első típus a 10-25 μm -s mérettartományba tartozik, a coelomafolyadékban részben szétesve jelenik meg, granulumai sárgásbarnák. A másik típus kisebb (12-20 μm), granulumai vörösesbarnák.

Funkciójuk több szerző szerint összehasonlítható a gerinces máj feladataival (analóg funkció). Az eleociták több kiegészítő, elsősorban táplálkozással kapcsolatos funkciókkal rendelkeznek (tápanyagraktározás, hemopoezis, exkréció). Granulumaikban nagy mennyiségű lipid és glükózszármazék halmozódik fel, citoplazmájuk nagy, nem festődő, kisméretű sejtmaggal rendelkezik. Az eleociták bevándorolnak a szövetekbe, ahol a felszabaduló sejttartalom tápanyagként használódik fel.

Az eleociták feltételezhetően a középbelet borító chloragogén szövetből származnak (Liebmann 1926, 1942). A chloragogén sejtekben számos, a szervezet számára még hasznosítható, valamint detoxikált anyag halmozódik fel. A chloragogén szövet és az eleociták különböző anyagokat vesznek fel a vérből és azt a coelomaüregbe bocsátják (Stein és mtsai 1977, Stein és Cooper 1978). Egyes vélemények szerint az ammónia- és ureatermelésben is szerepet játszanak (Stein és mtsai 1977). Sikerült bennük kimutatni flavin-típusú pigmentet, ferritin és hemoglobin tartalmú granulumokat, melyek felelősek lehetnek a peroxidáz aktivitásért is. Enzimaktivitásuk széleskörű: nem specifikus észteráz, foszforiláz, alkalikus foszfatáz, kataláz, peroxidáz (6. ábra) (Fischer 1978; Stein és Cooper 1978).

A coelomasejtek másik csoportosítása: granuláris amöbociták, hialin amöbociták és eleociták (szabad chloragogén sejtek). A továbbiakban az egyszerűsítés kedvéért ezt a három csoportot használjuk (2. táblázat, 5. ábra)



6. ábra. A coelomasejtek enzimcitokémiai jellegzetességei. Savi foszfatáz (A), alkalikus foszfatáz (B), nem specifikus észteráz (C), endogén peroxidáz reakció (D) coelomasejtekben. Enzimatikusan inaktív sejtek láthatók az A és B ábrán (csillag). A magfestés hematoxilinnal történt. Méretarány: 10 μm .

4. 2. 3. Celluláris mechanizmusok

A coelomasejtek igen szerteágazó feladatokat látnak el, beleértve az idegen anyagok felismerését és eliminálását, mivel a coelomaüreg közvetlenül kapcsolatban van a külső környezettel a dorzális pórusokon és a nefridiopórusokon keresztül, maga az üreg baktériumokat, gombaspórákat, protozoákat (gregarina) és nematódákat (hengeresférgeket) tartalmazhat (Valembos és mtsai 1992). A földigiliszta amöboid sejtjei vesznek részt elsősorban a sejtvesztés védekezési folyamatokban. Szerepük az idegen anyag felismerésével kezdődik, majd az endocitózissal folytatódik végül az enzimek általi lebontással, feldolgozással fejeződik be. Nagyobb objektumok esetén a környezettől való izolálás enkapszulációval, tokképzéssel történik. Az amöboid sejteknek - természetesen - fontos szerep jut az alvadási folyamatokban, a sebgyógyulásban, a regenerálásban is. Elsődlegesen a fagocitózis és az enkapszuláció általi megsemmisítés a legfontosabb sejt szintű hatás. Ezeket a védekezési mechanizmusokat elsőként MecsNIKOV és Cuénot vizsgálta gyűrűsférgekben. Az utóbbi 30 évben új információk kerültek publikálásra a sejtek szerepéről a transzplantációs immunológiában, az antigén felismerésében és a sejtvesztés citotoxicitásában (Větvička és mtsai 1994).

Fagocitózis

A coelomasejtek alapvető szerepet játszanak a mikroorganizmusok elleni védekezésben, ennek egyik jellegzetes formája a fagocitózis. Az Oligochaeták fagocitózisát először MecsNIKOV vizsgálta 1891-ben, *in vivo* és *in vitro* kísérleteknél. Elsősorban a bazofilok fagocitálnak, kevésbé az acidofilok (Cooper és Stein 1981). A kórokozók közt is különbségek mutatkoztak, pl. a *Bacillus tetanus*, *Streptococcus pyogenes* fajok igen lassan kerülnek be a sejtekbe a fagocitózis során (Cooper és Stein 1981, Dales és Kalaç 1992).

A hialin és granuláris amöbociták effektor immunsejteként szerepelnek, elsősorban fagocitálnak. Ennek mértéke a két amöbocita típusnál különbözik, a hialin amöbocitáknál jelentősebb, e sejtek citoplazmája szinte tele van a különböző bekebelezett részecskékkel, idegen sejtekkel, mikrobiális sejtfal komponensekkel, egyéb fagocitált anyagokkal (Stein és mtsai 1977). A baktériumok bekebelezését követően a fagociták a dorzális póruson át távozhatnak. A fagocitózis többlépéses folyamat, részei a felismerés, kemotaxis, kapcsolódás, bekebelezés, valamint intracelluláris pusztítás lizoszomális

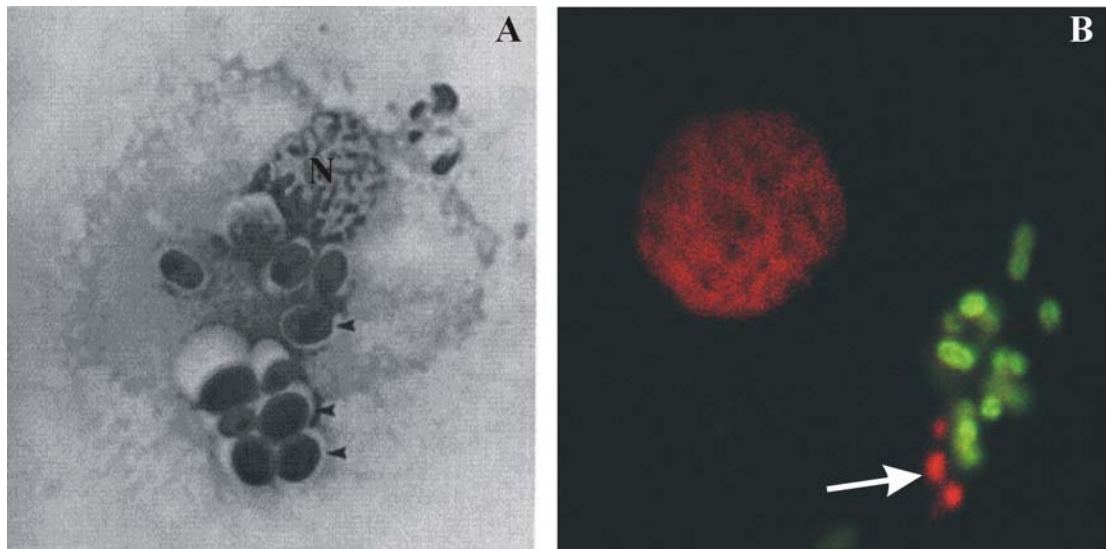
enzimek révén. A kötődés erősségét, specifitását a fagocitálandó partikulum és a fagocitasejt sejtfelszíni tulajdonságai egyaránt befolyásolják. Az interakció történhet direkt, receptorokon keresztül, illetve indirekt, kötőmolekulák (opszoninok) által. Az agglutininek és az aktivált profenoxidáz kaszkád komponensei is részt vesznek a felismerés és kapcsolódás folyamatában. A fagocita sejtmembránjához kötődés után az állábak (pseudopodiumok) révén bekebelezi, majd fagoszómába zárja az eliminálandó részecskét. A fagoszóma és a lizoszóma egyesülésével keletkező fagolizoszómában a lebontás lizoszómális enzimekkel (savas és alkalikus foszfatáz, nonspecifikus észteráz, proteínáz, amiláz, glükózidáz, lipáz) történik.

Az idegen eukarióta sejtek elleni válaszban alapvető fontosságú az idegen struktúrák felismerése. Ha xenogén fajból (pl.: emlős vagy más giliszta) származó spermatozoot injektáltak a giliszta testüregbe, az válaszreakciót, fagocitózist váltott ki., ugyanakkor az allogén spermatozoon túlélte a coelomaüregben 3-4 napig (Cameron 1932).

A coelomafolyadékban található humorális komponensek opszonizáló aktivitásuk révén befolyásolják a fagocitózist. Két fő emlős opszonin, az immunglobulinok és a komplement C3 fragmensek hatását vizsgálták coelomasejtek fagocitózisára (Laulan és mtsai 1988). A gerinces IgG és C3b jelenlétében a leukociták nagyobb mértékben fagocitálták a birka eritrocitákat, míg az IgM és C3d fragmens nem volt értékelhető hatással. A gerinces opszoninok valószínűleg a coelomociták felületén lévő molekulákkal reagálnak, amelyek Fc receptor-szerű molekulák, és jelen vannak a coelomafolyadékban és a coelomociták mintegy 20%-ának a felszínén (Rejnek és mtsai 1986).

In vitro és *in vivo* vizsgálatokkal különböző idegen részecskék fagocitózist figyelték meg. A coelomasejtek típusától függően a szénpartikulumokat és kárminfestéket különbözően veszik fel, a hialin amöbociták gyorsabban, a granuláris sejtek lassabban fagocitálnak. A coelomába kerülő részecskéket a coelomasejtek 50%-a fagocitálja, kivéve az eleocitákat, melyek végig inaktívak (Cameron 1932).

Cameron kísérleteit ismételték meg Stein és mtsai (1977), akik szénpartikulumokat fagocitáltattak a sejtekkel. Hasonló eredményeket kaptak, bár egyes mérésekben a granuláris sejtek mutatták a legnagyobb fagocita aktivitást, a fagocitózis index (bekebelezett partikulum / sejt) változatosan alakult a sejtcsoportok között. A granuláris sejtek csak átlagos mennyiségű partikulumot kebeleztek be, míg a hialin sejtek citoplazmája tele volt a fagocitált anyaggal. A chlorogén populáció nem fagocitált, bár membránjukhoz számos partikulum tapadt.



7. ábra. Coelomasejtek fagocitózisa. Élesztőpartikulomokat (A), (Nucleus [N] Cooper 2001), FITC-cel jelzett baktériumokat fagocitálnak a coelomasejtek (B). Nyíllal jelölve láthatók a propidium-jodidot gyorsan felvevő sejten kívüli baktériumok (vörös). A fagocitált intracelluláris partikulumokba lassabban jut be a festék (zöld). A módszerrel elkülöníthetők a sejten kívüli és a fagocitált baktériumok. Konfokális mikroszkópos felvétel.

További *in vitro* kísérletekben élesztő sejtek felvételét mérték. Hasonló eredményeket kaptak, mint az *in vivo* kísérletekkel, itt is a hialin sejtek mutatták a legnagyobb frekvenciát (Větvička és mtsai 1994; Stein és mtsai 1977).

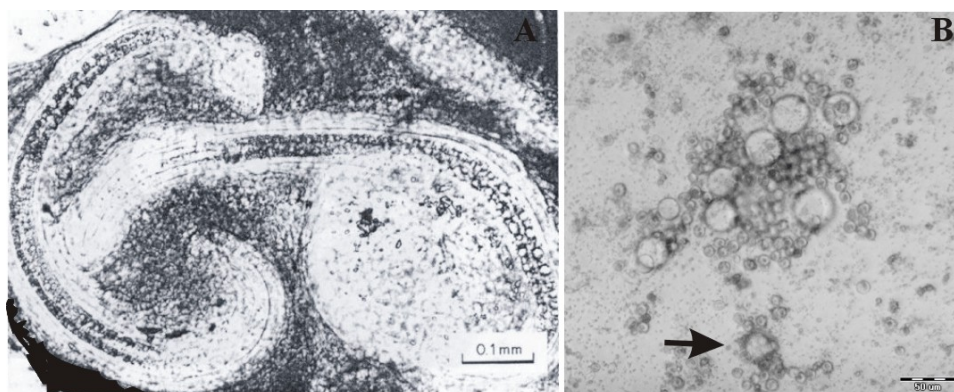
Dales és Kalaç (1992) kimutatták, hogy a coelomafolyadékban normálisan jelen lévő baktérium mennyiséget ($6,35 \times 10^5/\text{ml}$) szépen kontrollálni tudja a számbeli túlsúlyban lévő coelomasejt készlet ($8,6 \times 10^6/\text{ml}$).

Enkapszuláció

Nagyobb idegen objektumokat, melyeket a sejtek nem képesek fagocitálni, enkapszulációval semlegesítik az immunsejtek. A behatoló idegen anyagot a coelomasejtek vonala izolálja a coelomafolyadékból, ezzel védve a gazdát. A széteső sejtek a kapszula belső falában toxikus anyagot bocsátanak ki az idegen felszínre. Ezt a folyamatot a kapszula színéről barna testeknek („brown body”) is nevezik.

Az amöbociták részt vesznek az enkapszulációban (Ratcliffe és mtsai 1985; Valembois és mtsai 1992) is. E folyamat eredményei a sejtes-fibrilláris kapszulák, az un. „brown body”-k, melyek melanintartalma az aktiválódó profenol-oxidáz kaszkád során keletkezik, aktiválásáért – feltehetőleg - egy 42 kDa-os protein, a coeloma citolitikus faktor (CCF) felelős (Bilej és mtsai 1995; Beschin és mtsai 1998). A barna testek többsége szövetmaradványokat, pl.: nekrotikus izomsejteket, agglutinált baktériumokat,

fonalférgeket tartalmaz. Az enkapszuláció a fagocitózishoz hasonlóan az idegen objektum felismerésével kezdődik, de a bekebelezés az adott részecske méreténél fogva nem lehetséges. Első nap szabad coelomociták veszik körül, néhány nap múlva már ellaposodott sejtekből álló sűrű szerkezetű hüvely zárja magába az idegen testet. A kapszulába zárt paraziták nem jutnak oxigénhez, sem tápanyaghoz, elpusztításukban a coelomocitákból felszabaduló különböző lítikus enzimek is részt vesznek. Amikor a tok már 1-2 mm átmérőjű, a külső sejtek rögzítése megszűnik, és a kapszula a coelomaüreg posterioráris szelvényei felé vándorol, ahol szelvényleválás (autotómia) útján eliminálódik (Keilin 1925). A caudális szegmentek autotómiája, és az ezt követő regeneráció a földigilisztákban jól fejlett, és valószínűleg neurohormonális szabályozás alatt áll (Hubl 1956; Herlan-Meewis 1965; Alonso-Bedate és Sequeros 1983). Nincs bizonyíték arra, hogy a gyűrűsférgeknél ez a sérülés leukopoiesissel társulna, mint a gerincesekben, mivel a coelomociták fokozott mitózisa nem figyelhető meg (Burke 1974 a-c). E sejteknek valószínűleg aktiváló szerepe van, az elvesztett szövetrétegek pedig a környező differenciált szövetekből regenerálódnak.



8. ábra. *In vivo* és *in vitro* enkapszulációs reakció. Két nematoda (*Rhabditis pellio*) egyed látható a „brown body”-ban (Poinar és Hess 1977) (A). Kísérletes enkapszuláció Sephadex gyöngyökkel (B). A gyöngyök körül hatalmas sejtömeg jön létre, a sejtek rátapadnak a targetre (nyíl). Méretarány: 100 µm (A), 50 µm (B).

Sebgyógyulás és regeneráció

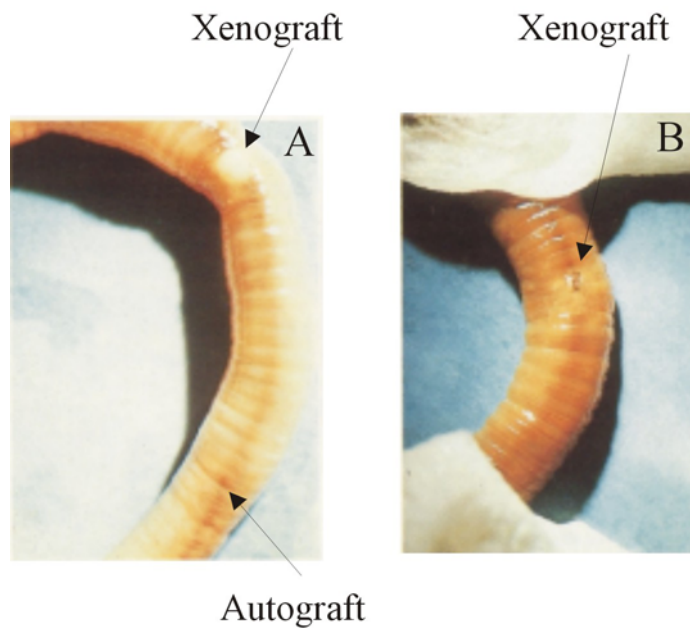
Lumbricus terrestris és *Eisenia fetida* fajokban tanulmányozták leginkább a sebgyógyulást. A szövetkárosodás után 24 órával megfigyelhető a fagocita sejtek beáramlása a sérült szövetbe, a teljes szöveti regeneráció általában 10 nappal a sérülés után fejeződik be (Burke 1974 a, b, c; Chapron 1970a; Cooper és Roch 1984).

Szövet (allograft, xenograft) kilökődés

A coelomasejteknek az immunfelismerésben játszott szerepét a transzplantációs kísérletek is alátámasztották. Ezeket a kísérleteket Cooper és munkacsoportja (Cooper 1968, 1969; Cooper és Rubilotta 1969) végezte *Eisenia fetida* és *Lumbricus terrestris* fajokon. Különböző gilisztafajok testszelvény darabját ültették át egyik egyedből a másikba (allograft), illetve más-más fajba is történt átültetés (xenograft). Természetesen a testszelvények cseréjét is végezték ugyanazon az egyeden (autograft). Az emlős szöveteken tapasztaltakkal összhangban, itt is kilökődési reakciót figyeltek meg az allo- és xenograft esetében, míg autograftoknál a beültetett szövetet tolerálta a szervezet. A transzplantációs kísérletek megmutatták, hogy a földgiliszták képesek felismerni és kilökni az idegen szövetet és elfogadni a sajátot. Érdekesség, hogy a legősibb többsejtűekben (Metazoa), a szivacsokban is megfigyelhetők már hasonló jelenségek: a nem saját graft kilökődése (Müller és mtsai 1999).

A fénymikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy 24 órával a graft beültetése után a coelomasejtek aggregálódnak és a grafthoz közel helyezkednek el. A neutrofil sejtek infiltrálódnak a graft mátrixába. A finomabb elektronmikroszkópos vizsgálatok során látható, hogy a transzplantáció után három nappal a belső izomszövet roncsolódik, megváltozik az izomfibrillumok szerkezete. A transzplantáció után öt nappal a neutrofil sejtek számos fagoszómát tartalmaznak. A sejtek 11-13 nap múlva átvándorolnak a külső izomszövetbe, melyet szintén roncsolnak (Linthicum és mtsai 1977).

A graftok beültetése után ugrásszerűen megemelkedik a coelomasejt szám. Eltérő emelkedést tapasztaltak allo- ill. xenograft beültetése esetén. Hostetter és Cooper (1973) *Eisenia fetida* graftot ültettek *Lumbricus terrestris* gazdába. A válasz nagyon gyors volt, már az első 24 órában emelkedett a sejtszám és csak 72 óra múlva tért vissza a normál szintre (Cooper 1968; Bailey és mtsai 1971). Allograft beültetése esetén a válasz jóval lassúbb volt, kicsit emelkedett csak a sejtszám és 3 nap múlva tért vissza az eredeti állapotba (Cooper és Rubilotta 1969; Bailey és mtsai 1971). A xenograft szétesés 17 nap után történik meg 20°C-on. Ha a transzplantációt megismételjük, a második graft kilökődése jóval gyorsabb (6-7 nap). A gyorsított kilökődési válasz egy memória komponens jelenlétére utal (Hostetter és Cooper 1973; Cooper 1975; Roch és mtsai 1975).



9. ábra Transzplantációs kísérlet gilisztafajokon. Bőrizomtömlő darabok átültetése történt különböző fajok (*Eisenia fetida* és *Lumbricus terrestris*) között. Jól látható, hogy az átültetést követően húsz nappal a xenograft kifehéredett, megduzzadt, szemben az autografttal (A). A beültetést követően 50 nappal a szövetdarab teljesen elhal, nekrotikus pigmentáció jelenik meg a graft felszínén (B) (Cooper 1968).

Sejt mediálta citotoxicitás

Gerinctelen állatok immunsejtjei spontán citotoxicitást mutatnak a legkülönbözőbb targetsejtek ellen, amely különbözik a citotoxikus T-limfociták (CTL) általi sejtpusztítástól, de nagyon hasonlít a természetes ölósejtek (NK sejt) által mediált folyamatokra. További érdekesség, hogy mind xenogén, mind allogén *in vitro* sejt kultúrában jelentkezik a sejtpusztító aktivitás. Ebben a folyamatban általában nem kitapadó kis coelomasejtek vesznek részt. Az emlős mielo-erithroid eredetű K562 sejtvonalat használva target sejtnek jól mérhető a coelomasejtek spontán citotoxikus aktivitása ^{51}Cr felszabadulási assay-vel. Ezek a megfigyelések a coelomasejtek őslimfocita (NK) sejt eredetét sugallják (Quagliano és mtsai 1996).

Sejtfelszíni markerek, adhéziós molekulák

Az előzőekben leírt funkciókban közös tehát, hogy a sejteknek fel kell ismerniük az idegen anyagot. Ehhez viszont speciális struktúrák, sejtfelszíni receptorok szükségesek. A giliszta coelomasejtek rozettát képeznek a birka vörösvértestekkel, hasonlóan a T-sejtekhez (Toupin és Lamoureux 1976). Felvetődik az immunglobulin szupergén családba tartozó molekulák jelenlétének kérdése és esetleges szerepe a folyamatban.

A sejt-sejt kapcsolatokban nélkülözhetetlen sejt felszíni struktúrák vizsgálata során, áramlási citometriás vizsgálatokkal kimutattak két jellegzetes sejtípust. A sejtek tipizálását egér anti-humán ellenanyagokkal végezték, melyek különböző immunglobulin családba tartozó sejt felszíni fehérjékre voltak specifikusak.

A kisebb elektronenz sejteken pozitív immunreakciót tapasztaltak az anti-Thy-1, α - β_2 microglobulin, α -CD45 és az α -CD54 ellenanyagok esetében (Cossarizza és mtsai 1996; Cooper és mtsai 1999). Immuncitokémiai módszerekkel is lokalizálták a coelomasejtmembránban a β_2 -microglobulin szerű molekulát, elsősorban a granuláris sejteken. Radioizotópos immunoassay-vel más giliszta szövetek is adtak reaktivitást. Ez tulajdonképpen nem meglepő, mivel ez a kis molekula igen erősen konzervált az evolúció során és a fajok között igen nagy a homológia (Shalev és mtsai 1981; Roch és mtsai 1983 Roch és Cooper 1983).

J lánc-szerű fehérjét (immunglobulinok [IgM/IgA]) detektálták a földigilisztákban. A földigiliszta J gén igen erős homológiát mutatott az emlős J lánc génekkel. A gerincesek mindegyik osztályában kimutatták a lánc jelenlétét. Gerinctelenek közül puhatestűek, gyűrűsférgesek, ízeltlábúak, tüskésbőrűek törzsében figyelhető meg. A J lánc azokban a gerinctelenekben jelenik meg, ahol már kialakul a mezoderma és a bélcsatorna. A lánc az epitheliális és a makrofág-szerű sejteken található meg, ahol az állat közvetlenül kontaktusba kerül külső környezetével, ezért feltételezhető, hogy a láncnak szerepe van a védekezési rendszerben, bár ezek az állatok nem képeznek immunglobulinokat (Takahashi és mtsai 1996). A coelomasejtek felszíne képes megkötni néhány gerinces immunglobulint. Nemcsak a sejtek, hanem maga a coelomafolyadékban található fehérjekomponensek bizonyos frakciói is képesek erre, ezeket a proteinek 47-50 kDa körül karakterizálták (Rejnek és mtsai 1986). A gyűrűsférgesek másik osztályában (piócák) is kimutattak olyan sejt felszíni molekulákat, amelyek reagálnak sejt felszíni antigénekre (CD molekulák) specifikus ellenanyagokkal (de Eguileor és mtsai 2000a, b).

4. 2. 4. Humorális védekező mechanizmusok

A gyűrűsférgesek, így az *Eisenia fetida* coelomafolyadékának biológiai funkciói közül kiemelkedik a citolitikus, hemolitikus aktivitás. A hemolizinek többsége hemagglutinációra is képes, illetve antibakteriális és/vagy bakteriosztatikus hatású a

giliszták biotópjában előforduló talajlakó baktériumokra (Roch 1979; Valembois és mtsai 1982, 1986; Roch és mtsai 1991).

Fetidinek

A fetidinek polimorfikus és multifunkcionális glikoproteinek, citolitikus, antibakteriális aktivitással. Elsőként az *E. fetidá*ban írták le őket, mint hemolitikus faktorokat (Roch 1979; Roch és mtsai 1981, 1984). Emellett agglutinálják is a vörösvérsejteket, feltehetően az eleocita szekretálja. A fetidineket két, egymástól független gén határozza meg. A 45 kDa tömegű proteint nem polimorfikus gén kódolja, egyetlen izoformája a pI 6.0. A 40 kDa nagyságú fetidint négy allél kódolja, ennek megfelelően négy protein izoforma lehetséges, ezek pI 6.3, 6.2, 5.95 és 5.9. A pI 6.0 mellett minden földgilisztában egy vagy két aktív protein fejeződik ki (Roch 1979; Roch és mtsai 1986). A 40 és 45 kDa tömegű fetidinek teljes aminosavszekvenciája (aszparaginsav, glutaminsav, glicin nagy mennyisége) nagyfokú homológiára utal (Roch és mtsai 1986), a poli-és monoklonális antitestek nem tesznek különbséget a két tisztított fehérje között (deglikolizált fetidin: 34,14 kDa) (Hirigoyenberry és mtsai 1992; Lassègues és mtsai 1997). Az aminosavszekvenciában N-glikozilációs hely (250-252. pozíció), valamint a peroxidázal homológ hely (52-62. pozíció) található. A fetidinek peroxidáz aktivitással rendelkeznek, a rekombináns protein antibakteriális hatású Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokra, főleg a patogénekre (Roch és mtsai 1987; Valembois és mtsai 1986; Roch és mtsai 1991), gátolja pl.: a *Bacillus megaterium* növekedését. A testüregbe patogén baktériumot injektálva expressziója indukálható, a fetidinszintézis nő (Lassègues és mtsai 1997).

4 és 45 °C között változatlan mértékben, Ca^{2+} és Mg^{2+} jelenléte nélkül is lizálják az eritrocitákat, ezért a kinetikai görbékük szerint nem tekinthetők enzimeknek (Valembois és mtsai 1986). Szfingomielinhez kötődve fejtik ki a hatásukat, 10nm-es csatornákat nyitva a szfingomielinvezikulumok kettős lipidrétégebe, vagy a vörösvérsejtek membránjába (Roch és mtsai 1981, 1989). Bakteriolitikus/sztatikus aktivitásuk mellett az opszonizációban is szerepet játszanak (Šinkora és mtsai 1993). Részt vesznek a coelomafolyadék alvadásában, mely sohasem terjed ki az egész szervezetre (Valembois és mtsai 1988). A földgilisztánál ez a mechanizmus a sérülések regenerációjában nem vesz részt (Chapron 1970b). Spontán jelentkezhethet az epidermális felszínen, elsősorban a dorzális pórusok közelében, így foglyul ejti a giliszta biotópjában élő baktériumokat, megelőzve az inváziót.

Lisenin

A lisenin az *E. fetidá*ból izolált, nagy coelomociták és chloragociták által termelt 41 kDa tömegű protein, mely patkány vasculáris simaizomzatára kontraktilis hatást fejt ki (Sekizawa és mtsai 1996, Ohta és mtsai 2000). A lisenin-related protein 42 kDa nagyságú gyengébb izomösszehúzó hatással. A lisenin 297 aminosavat tartalmazó, 33,44 kDa molekulásúlyú cDNS-ében egy potenciális N-glikolizációs szakasz található (248. pozíció). Két, 300 aminosavból álló, a lisenin-related proteineket kódoló cDNS-t izoláltak (Sekizawa és mtsai 1997), aminosavsorrendjük 76% illetve 96%-ban egyezik a liseninnel. Emellett a lisenin és a lisenin-related protein nagyfokú homológiát mutat a fetidinekkel, amely e lítikus molekulák szoros rokonságára utal. Ugyanakkor a lisenineknek nincs szfingomielináz aktivitása, a vörösvértestek lízise során specifikusan a szfingomielineket a membránokhoz kötik (Yamaji és mtsai 1998). A koleszterol jelenléte a membránban elősegíti a fetidinek és lisenin szfingomielinekhez való kapcsolódását, ezáltal elősegíti a hemolízist. Valószínű, hogy a lisenin vízpórusokat nyit a membránokon, így idézi elő azok károsodását, ami végül a sejt halálához vezet.

Eiseniapore

Az eiseniapore az *E. fetida*-ból származó, szintén citolítikus protein, molekulásúlya 38 kDa. A membrán kettős rétegben található, meghatározott, hidrofil feji résszel rendelkező lipidek, szfingomielin vagy galaktozilceramid szükséges a membránhoz kötődéséhez és lízis indukálásához (Lange és mtsai 1997). A fetidinekhez és liseninhez hasonlóan az eiseniapore aktivitását, szfingomielinhez való kapcsolódását is növeli a koleszterol. Kísérletek azt mutatták, hogy az eiseniapore másodlagos szerkezete nem változik a lipidmembránhoz kötődés során, valamint a denaturáció és a poliklonális antitestekkel történő preinkubáció megszünteti a protein lítikus aktivitását (Cooper és mtsai 2002).

A protein valószínűleg a coelomafolyadékban egy természetes inhibitorhoz, az eiseniapore-reguláló fehérjéhez kötődve található (Mohrig és mtsai 1997). Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a célmembránban hat eiseniapore molekula alkot egy gyűrű alakú, 228 kDa nagyságú, 10 nm külső és 3 nm belső átmérőjű hidrofil pórust, amin keresztül megnyílik a környező oldat ill. plazma útja az intracelluláris tér felé, a folyadék beáramlása a sejt szétdurranásához vezet. Így az eiseniapore sejtekkel való interakciója csatorna vagy hordódonga modellel lenne leírható (Cooper és mtsai 2002). Ez

valószínű magyarázat lehet arra a mechanizmusra, ahogy a földigiliszta humorális immunrendszerének egyes komponensei közvetlenül pusztítják el a nem-saját sejteket.

Hemolizinek

Különböző tisztítási módszerekkel és próbákkal a hemolizinek és agglutininek elkülöníthetők egymástól az *Eisenia* és *Lumbricus* fajokban. Ugyanakkor más vizsgálatok szerint rokonság mutatható ki a fetidinek és CCF, valamint a három hemolizin faktor, a H1 (46 kDa), H2 (43 kDa) és H3 (40 kDa) között (Eue és mtsai 1998). Preparatív PAGE-n izolálva a H1 és H2 stabil SDS-ben és merkpto-etanolban, míg a H3 két, egy 18 és egy 21 kDa tömegű fragmensre hasad. Izoelektromos fókuszálással mindegyik proteinnak több izoformája különíthető el pI 5.1 és 6.2 között. A H3 bifunkcionális protein, lizálja és agglutinálja is a vörösvértesteket. 56 °C-on mindhárom fehérje hemolítikus aktivitása megszűnik, a H3 agglutinációs aktivitása azonban megmarad. Eritrocitáknak a coelomába injektálásakor a hemolizinek száma háromról kettőre csökken. A H1, H2 és H3 elleni monospecifikus antitestekkel a három hemolizin szoros szerkezeti rokonságát bizonyították. Kötődési helyük a vörösvértestek membránjában valószínűleg N-acetilneuraminsav receptor, a H3 agglutinációs aktivitásánál N-acetil-glükózamin kötőhely is szerepelhet.

A hemolítikus peptidek összefoglalása

Az *E. fetidá*ból izolált effektor molekulák hasonló lítikus funkciót töltenek be, ugyanakkor egyedek közötti heterogenitást mutatnak (Valembos és mtsai 1986). Eszerint 6 különböző hemolítikus és/vagy antibakteriális fenotípus létezik, az azonosított hemolizin izoformák kifejeződésének megfelelően. Több adat is bizonyítja, hogy valamennyi citolizin rokon fehérje. Hasonló biokémiai sajátosságokkal rendelkeznek, izoformáik molekulatömege 40 kDa körül mozog, az izoelektromospont is hasonló. A cDNS szekvenciák összehasonlítása azt mutatja, hogy a fetidinek és a lisenin között jelentős aminosav homológia van. A H3 különbözik valamennyi lizintől, mivel dimerikus. A MALDI analízis szerint a H1, H2 és H3 eltér a lisenintől és a fetidinektől. A lipidspecifitás szempontjából az eiseniapore különbözik a lisenintől és valószínűleg a fetidinektől is, mivel nem csak szfingomielinhez, hanem galatozilceramidhoz is képes kötődni. Inhibíciós kísérletek azt mutatták, hogy a coelomikus folyadék hemolítikus aktivitását az acetilált vagy metilált cukrok, így a N-acetil-D-glükózamin, metil- α -D-mannopiranozid, N-acetil-D-galaktózamin és N-acetilneuraminsav, részben gátolják (Roch és mtsai 1981; Eue és

mtsai 1998). A zymozan, inulin, LPS, hidrazin vagy metilamin nem gátolja a coelomafolyadék lítikus aktivitását, azaz az *E. fetida* hemolizinek nincsenek rokonságban a C3b komplementrendszer komponenssel (Roch és mtsai 1989). Az eiseniapore működése analóg lehet a perforin membránkárosító komplexével, mert heparin, vitronektin és lizofoszfatidilkolin gátolja vörösvértestekhez való kötődését, de nem befolyásolja a membránban a pórus kialakítását (Lange és mtsai 1999). Eszerint elképzelhető a komplementkaszád és az *E. fetida*-ból izolált eiseniapore hemolítikus aktivitás rokonsága.

Lumbricin I

A lumbricin I a *Lumbricus rubellus* fajból izolált protein, mely kettős funkcionális aktivitással bír. Jelentősége abban van, hogy az eddig tárgyalt proteinekkal ellentétben a lumbricin I az egyetlen, amely a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal, valamint gombákkal szemben antimikrobiális hatást fejt ki, a humán eritrocitákat viszont nem lizálja (Cho és mtsai 1998). Kiemelkedő tulajdonsága, hogy prolinban gazdag (15m/m%), ebben hasonlít az apidacinokra, drosocinra, metchnikowinra, bactanecinekre, melyek ízeltlábúakban előforduló antimikrobiális peptidek. Közös sajátosságuk még a pozitív töltésű aminosavak nagy aránya, az antimikrobiális spektrumban és működésük módjában azonban különböznek. A lumbricin I gén bakteriális fertőzéssel nem indukálható, expresszáldása inkább folyamatos. A lumbricin I a felnőtt *L. rubellus* egyedekben jelenik meg, a petékben és egyhetes egyedekből nem kimutatható. Ezért valószínű, hogy a kifejeződéséért felelős gén specifikusan a kifejlett példányokban működik (Cho és mtsai 1998).

CCF (coeloma citolitikus faktor)

Az *Eisenia fetida* coelomafolyadékából izolált 42 kDa tömegű protein (Bilej és mtsai 1995; Beschin és mtsai 1998). A chlorogogén szövet sejtjeiben lokalizált, ill. a szabad nagy coelomocitákban, pl.: a makrofág funkciójú sejtekben is megtalálható (Bilej és mtsai 1998). A CCF szénhidrátkötő mintázata homológiát mutat a bakteriális és állati β -1,3-glukanázzal, az ízeltlábúak Gram-negatív baktériumokat kötő proteinjével és β -1,3-D-glukán felismerő fehérjével, valamint az atlanti törzfarkú (*Limulus polyphemus*) glukánszenzitív G faktorával. A CCF hatékonyan kötődik a LPS O-antigénjéhez, az β -1,3-D-glukánhoz és a N,N'-diacetilketobiózhhoz. A Gram-negatív baktériumok és élesztő sejtalkomponenseinek felismerése után, a CCF aktiválja a profenoloxidáz kaszkádot. Az aktivált enzim a monofenolok o-hidroxilációját katalizálja, majd a difenolokat kinonokká

oxidálja. A kinonok melaninná polimerizálódnak, ami citotoxikus és antibakteriális anyagok felszabadulásához vezet (Smith 1996; Johansson és Söderhäll 1996). Az *E. fetida* CCF szerepét a proPO aktiválásában bizonyítja az, hogy a faktor coelomafolyadékából való kísérletes eltávolítása esetén a kaszkád gátolt. A melanin és prekurzorjai a profenoloxidáz rendszerben betöltött szerepük és antimikrobiális sajátságaik mellett számos más biológiai folyamat stimulálásában is részt vesznek: fagocitózist, opszonizációt, enkapszulációt és sebgyógyulást váltanak ki.

A földigiliszta citotoxikus és antimikrobiális aktivitása szorosan kapcsolódik az aggregációs, hemolítikus, opszonizációs folyamatokhoz (Roch 1996; Valembos és mtsai 1982; Milochau és mtsai 1997; Lassègues és mtsai 1997). Kísérletek szerint az *E. fetida* coelomociták *L. terrestris*-ből származó coelomocitákra kifejtett citotoxicitása anti-CCF monoklonális antitestekkel gátolható, a CCF tehát a sejtmediált citotoxikus reakciókban is szerepet játszhat a földigilisztákban (Bilej és mtsai 1998). A CCF agglutinálja a sima felszínű Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokat (Beschinn és mtsai 1998), sőt a coelomafolyadék opszoninjai közé is tartozik (Bilej és mtsai 1995). Önmagában nem, hanem csak H3 jelenlétében hemolítikus hatású (Eue és mtsai 1998). A coelomafolyadék hemolítikus aktivitása megszűnik, ha a CCF-t eltávolítják, vagy a coelomafolyadékot β -1,3-D-glukánnal preinkubálják. A CCF tehát pleiotróp hatású mintázatfelismerő molekula: bakteriosztatikus, hemolítikus, proteolitikus, citolitikus.

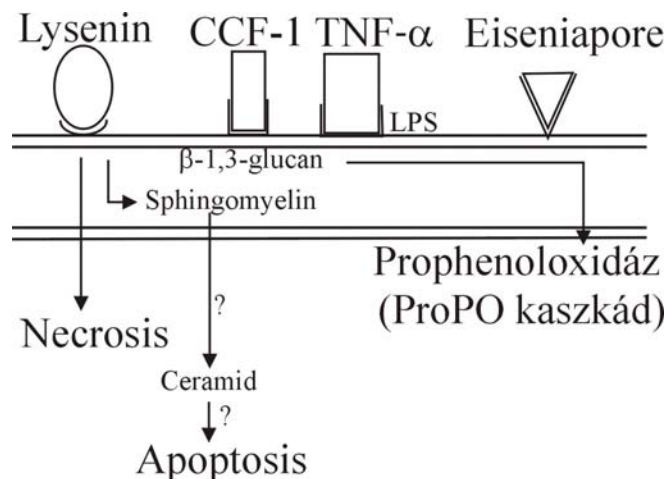
Tumorölő aktivitása alapján analógiát feltételeztek a gerincesek TNF- α (tumor nekrosis faktor) citokinjével, ami szintén ilyen funkcióval rendelkezik. Az anti-TNF monoklonális antitestek viszont nem gátolják a CCF aktivitását, ami azt jelenti, hogy a két fehérje különbözik egymástól.

A két protein hasonló sejtekben szintetizálódik: a TNF- α makrofágokban, a CCF makrofágszerű coelomocitákban LPS stimulációra termelődik (Bilej és mtsai 1998). Közös tulajdonságuk az opszonizációban való részvétel. A CCF és TNF- α egyaránt lektinszerű interakcióval kötődik a β -1,3-D-glukánokhoz, N,N'-diacetilketobióz ezt a kötést gátolja. Ez ugyanakkor fordítva is igaz: a β -1,3-D-glukánok blokkolják a N,N'-diacetilketobióznak a fehérjékhez való kapcsolódását (Beschinn és mtsai 1998, 1999). A TNF- α lektinszerű doménje (TIP domén) elleni monoklonális antitestek keresztreakciót mutatnak a CCF-el, ezért lehet, hogy a két protein hasonlít: β -1,3-D-glukán és N,N'-diacetilketobióz-kötő lektinszerű aktivitással/doménnel bír. Ezen alapszik az is, hogy mind a CCF, mind a TNF- α hatásos az afrikai tripanoszóma (*Trypanosoma brucei*) ellen (Beschinn és mtsai 1999, Olivares Fontt és mtsai 2002). A coelomafolyadék és a tisztított

CCF tripanolítikus hatása anti-CCF monoklonális antitesttel, N,N'-diacetilketobiózzal és anti-TIP TNF- α antitesttel egyaránt gátolható. Vice versa a TNF- α mediálta tripanolízist az anti-CCF blokkolja. A funkcionális analógiák ellenére a CCF és a TNF- α között nem találtak génhomológiát, ami a közös evolúció hiányát jelzi (Beschlin és mtsai 1999). A citokin és gerinctelen megfelelője tehát inkább konvergens evolúció eredménye, ami strukturálisan nagyon hasonló lektinszerű felismerő domént hozott létre.

Lizozim

A bakteriális sejtfal β -1,4-D-glikozidos kötéseit hidrolizáló 13 kDa tömegű ubiquiter enzim, amely a Gram-pozitív baktériumfertőzések elleni hatékony védelem része. A coelomocita extraktumból és a coelomafolyadékából is kimutatták (Çotuk és Dales 1984). Az *E. fetidá*ból kivont lizozim N-terminális aminosavszekvenciája nagyfokú homológiát mutat más gerinctelen állatok lizozimjével (nematodák, puhatestűek, tüskésbőrűek)



10. ábra. A különböző citolitikus (antimikrobiális) peptidek más-más sejtalkotóhoz kötődnek a célsejt felszínén. A giliszta CCF-1 és a gerinces TNF- α hasonló glükózszármazékhoz kötődik, amiből a működésbeli hasonlóságra következtetünk (Cooper és mtsai 2002 alapján).

4. 2. 5. Antigénkötő proteinek, antigén feldolgozás

Régóta a kutatások előterében van az a kérdés, hogy antigén stimulációra képződnek-e antigén felismerő molekulák a gerinctelenekben?

Rovarokban már sikerült kimutatni adaptív molekulákat, ezek a molekulák nincsenek meg eleve az élőlényekben, antigén stimulusra képződnek és specifikusan

ismerik fel az adott idegen molekulát. *Lumbricus terrestris*-be juttatott szintetikus haptén kiváltja a sejtek fehérje termelését, ez a fehérje, pedig megköti az adott haptént. Mind elsődleges, mind pedig másodlagos reakció kiváltható. Az első stimuláció után a legmagasabb szintet az ötödik illetve a nyolcadik napon érte el a fehérje. A második beadás jóval gyorsabb és intenzívebb választ eredményezett. Az antigént különböző hordozóhoz (carrier-molekula) kapcsolva juttatták be az állatba (KLH, BSA). Rejnek és Tučkova arzénsav-HSA komplexet vitt be az állatokba. Egy antigén-kötő-protein (ABP) képződését tapasztalták, mely rendelkezett specifikus régióval is (Bilej és mtsai 1993; Rejnek és mtsai 1993).

Ez az ABP a coelomafolyadékban kívül bizonyos coelomasejtek felszíni membránjában is kimutatható volt. A legmagasabb proteinszint az elsődleges stimuláció utáni negyedik és nyolcadik napon jelentkezett.

Az ABP molekulásúlya 56 kDa, redukált állapotban két molekulát találtak egy 31 és egy 33 kDa súlyút. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a pontos természetét megismerjék, de az már ismert, hogy két diszulfid híd által összekötött polipeptid lánc vesz részt az antigén megkötésében, hasonlóan az emlősökben leírt többláncú antigén-felismerő receptorokhoz (MIRR). A gyűrűsférgekben az antigén prezentáció konkrét mechanizmusa sem ismert jelenleg. Az antigén stimulálta sejtekben magas a proteolitikus aktivitás, így valószínűleg itt történik az antigén lebontása és egy következő fázisban bemutatása az ABP-t hordozó sejtek számára (Bilej és mtsai 1990; 1992; Tučková és Bilej 1994).

5. CÉLKITŰZÉSEK

Intézetünkben évek óta folyik a természetes immunitás vizsgálata, *Eisenia fetida* gilisztán, mint gerinctelen állatmodellen. Kutatási célkitűzéseink az alábbi témakörök vizsgálatát jelentették:

1. Kísérleteinkben először a coelomasejteken immunmorfológiai és immunszerológiai **összehasonlító vizsgálatokat** végeztünk **monoklonális ellenanyagokkal**. Az antitesteket korábbi munkák során az intézetben különböző **konzervatív emlős antigénekre** állították elő: citokinekre (TNF- α , TGF- α), enzimekre (Cu/Zn SOD), sejtfelszíni molekulákra (Thy-1 [CD90], CD24) és hormonokra (TSH- α , - β , -dimer) (Németh P., Bebök Zs, Balogh P). A feladatot annak tisztázása jelentette, hogy kimutathatók-e ezekkel az ellenanyagokkal a magasabbrendűekben konzerváltnak tartott struktúrák a földigilisztában is.
2. Hibridóma technika segítségével **specifikus monoklonális ellenanyagokat** állítottunk elő a **giliszta immunsejtekre**. Célunk az volt, hogy a sejtpopulációkat molekuláris markerekkel (un. **CD könyvtár**) tudjuk vizsgálni és az alpopulációkat az immunológiai differenciálódási markerek alapján tudjuk elkülöníteni. Coelomasejt specifikus ellenanyagokkal lehetőség nyílik arra is, hogy a sejtek leszármazását nyomon tudjuk követni, szöveti elhelyezkedésüket, eredetüket és kompartmentalizációjukat vizsgálni tudjuk, a funkcionális szempontokat is figyelembe véve.
3. A földigiliszta coelomasejtek ellen előállított **monoklonális ellenanyagaink antigén specifitásának meghatározását** is el kívántuk végezni, első lépésben **random peptid könyvtárt hordozó filamentózus fágot** használtunk az ellenanyagok epitópjának meghatározására.
4. Vizsgáltuk a coelomasejtek **lizosomális enzim** (savi foszfatáz) **aktivitásának jellemzőit** (sejtcsoportok közötti savi foszfatáz enzimaktivitás, enzimtartalom különbségeket) és **aktiválhatóságát**. Nyomon követtük a mikrobiális hatásra történő lizosomális enzim változásokat.

5. Tisztázni kívántuk a **gilisza immunsejtek funkcionális szerepét a humorális immunfolyamatokban**. Ismert az, hogy a coelomafolyadék tartalmaz **antimikrobiális és citotoxikus** faktorokat, az viszont nem tisztázott részletesen, hogy a sejtek részt vesznek-e ezen molekulák termelésében, raktározásában.

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkben *Eisenia fetida* giliszta kifejlett példányait használtuk fel. A sejtizolálás előtt két napig az állatokat nedves vattán tartottuk.

6. 1. Sejtizolálás

A coelomasejteket izoláltuk, izoláló puffer (71,2 mM NaCl, 5mM EGTA, 50,4 mM guaicol glyceryl ether, 5% ethanol, pH: 7,3) segítségével, melynek hatására a giliszták védekezési reakcióként dorzális pórusukon keresztül kipréselik magukból a sejteket (Diogené és mtsai 1997). LBSS (Lumbricus Balanced Salt Solution) (71,5 mM NaCl, 4,8mM KCl, 3,8mM CaCl₂, 1,1mM MgSO₄X7 H₂O, 0,4mM KH₂PO₄, 4,2mM NaHCO₃, 0,3mM Na₂HPO₄X7H₂O, pH: 7,3) pufferben felvéve kétszer (100g x 5perc) centrifugáltuk a coelomasejteket.

6. 2. Enzimcitokémiai festések coelomasejteken

A sejteket (5×10^5 /ml) citocentrifugával tárgylemezre üleptítettük.

(a) Nem-specifikus észteráz (α -naftil-acetát-észteráz) kimutatása

A fixálás formalingőzben történt 10 percig, a formalint többszöri csapvizes mosással távolítottuk el (2-3 perc). Foszfát pufferben (pH 7.4) vettük fel a dimetilformamidban oldott naftil-acetátot, majd Fast Blue RR-t adtunk hozzá. Az inkubálás szobahőn történt.

(b) Alkáliás foszfatáz kimutatása

A sejteket fixálás nélkül, nitro tetrazólium kék (NBT) és bromo-kloro indolil foszfát (BCIP) (dimetilformamidban oldva) festőoldatával (100mM TRIS-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH 9,5) reagáltattuk. Az inkubálást szobahőn végeztük.

(c) Savi foszfatáz kimutatása

A lemezeket 0,1 M Na-acetátos (pH 5,2) oldattal mostuk 5-10 percig. A reakció keverékkel három órán keresztül inkubáltuk a sejteket. A reakcióelegy 10 mg naftol-AS-BI-foszfat dimetilformamidos és nátrium-nitrites oldatát tartalmazta.

(d) Endogén peroxidáz kimutatása

A reakciót 3-amino-9-etil-karbazol (AEC) acetát pufferes (AEC, H₂O₂) oldatával (pH: 5,2) végeztük.

6. 3. Immunizálás, sejtfüzió, hibridóma előállítás

Izolált coelomasejteket (10⁶/ml) LBSS-s mosás után adtuk be intraperitoneálisan nyolc hetes Balb/c egerekbe. Az újrainmunizálás három hét elteltével történt, a második immunizálást követően próbavért vettünk, a szérum titerét megteszteltük. Két nappal az utolsó immunizálás után végeztük el a sejtfüziót.

A hibridómákat Köhler és Milstein (1975) módszere alapján állítottuk elő. A lépsejteket Sp-2/0-Ag14 egér myeloma sejtvonallal (Flow Labs, UK) fuzionáltattuk 4:1 arányban, polietilén glikol-t használva (Mr: 6000, Sigma). A sejteket DMEM+10% FCS tartalmú tápoldatban növesztettük. A hibridómákat hypoxanthin (0,1mM) thimidin (0,016mM) és aminopterin (4x10⁻⁴mM) tartalmú DMEM + 20%FCS (Gibco) tápoldaton szelektáltuk. A hibridóma felülúszókat ELISA-val (enzyme linked immunosorbent assay) teszteltük, majd a pozitív vonalakat indirekt immuncitokémiával karakterizáltuk tovább, coelomasejt citoprepeken. A kiválasztott hibridómákat véghígításos módszerrel klónoztuk. Coelomasejteket (80 µl- 5x10⁵/ml) ülepítettünk tárgylemezre Cytospin 3 (SHANDON, USA) citocentrifugával ill. sejteket (8 µl-5x10⁵/ml) pipettáztunk a 12-lyukú „multiwell” lemezekre (ICN) majd szobahőn inkubáltuk a lemezeket 20-30 percig, hogy a coelomasejtek megfelelően kitapadhassanak.

6. 4. Giliszták preparálása, szövetek előkészítése

Az előkészített állatokat narkotizáltuk (alkoholban, szódavízben), majd a túlaltatás után kivágtuk a clittelum közeli szövetrégiót.

A blokkokat TissueTech-be ágyasztuk be, lefagyasztottuk majd 10µm vastag metszeteket készítettünk kriosztáttal. Az immunofluoreszcenciás protokoll előkezeléseként a metszeteket 15 percig 0,05 M NH₄Cl oldatban inkubáltuk, hogy lecsökkentsük az autofluoreszcenciát, majd PBS-ben mostuk (de Eguileor és mtsai 2000a, b).

6. 5. Immuncitokémia

A coelomasejteket acetonban fixáltuk, az endogén peroxidáz aktivitást fenilhidrazin-hidrokloriddal (1mg/ml PBS-ben) gátoltuk, a nem specifikus kötőhelyek

blokkolását 5%-os BSA-val végeztük 20 percig. A szöveteket és az izolált coelomasejteket hasonlóan kezeltük az alábbiaknak megfelelően. Hibridóma felülúszókkal (a-EFCC klónok), tisztított antitestekkel inkubáltuk a mintákat 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Kontroll ellenanyagként nem immunizált egér szérumát használtuk (1:500). HRP konjugált anti-egér IgG specifikus antitestet használtunk második ellenanyagként. Az előhíváshoz AEC-t használtunk. A magfestés Mayer-hematoxilinnal (Reanal) történt.

6. 6. Immunofluoreszcencia

A citoprepek nem specifikus kötőhelyeit blokkoltuk BSA-val, majd hibridóma felülúszókkal inkubáltuk a sejteket/szöveteket, FITC vagy biotin jelölt anti-egér ellenanyagot adtunk második reagensként. Streptavidin-R-fikoeritrin használtunk a harmadik lépésben a biotinált ellenanyag esetében. A reagenseket 1:100 hígításban használtuk, az inkubáció szobahőn történt 1 órán át. Propidium-jodid (Sigma) és DRAQ5 (Biostatus Lim.) festéket alkalmaztunk a sejtmagok jelölésére.

6. 7. Mikroszkópia

A festett sejteket, szöveteket a Bio-Rad MRC-1024 konfokális rendszerű Nikon Eclipse TE-300 és Olympus BX61 mikroszkóppal vizsgáltuk.

6. 8. Sejthomogenizálás

1. A sejteket lizálópufferben (0,5% Triton X-100, 50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH: 7,6) proteázgátlók (1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 1mM phenyl-methanesulphonyl-fluoride) jelenlétében homogenizáltuk (4 °C, 45 perc).

2. LBSS-ben vettük fel a sejteket, a sejtlizálást Ultrasonic homogenizátoron (Cole-Palmer Inst. Co USA, 600 W) 120 másodpercig 10% teljesítményen végeztük (4°C). Centrifugálás után (500xg, 15 perc, 4°C) a minták fehérjetartalmát micro-Bradford módszerrel határoztuk meg (Bradford 1976).

6. 9. ELISA

Coelomasejt lizátumokat, coelomafolyadékot (5µg/ml) kötöttünk ki ELISA lemez aljára (Nunc, Microelisa) egy éjszakán át 4°C-on, a nem specifikus kötőhelyek blokkolását

0,5% zselatinnal végeztük 20 percig 37°C-n. A mintákat inkubáltuk az antitestekkel (a-EFCC antitestek [hibridóma szupernatánsok hígíthatlanul], 1 órán át 37°C-n. A mosási lépések után HRP konjugált másodlagos ellenanyagokat (Dakopatts) használtunk (a-EFCC esetében: a-egér IgG, a többi egér ellenanyag esetében: a-egér Ig polivalens). Az előhívást orthofenilén-diamin-nal (OPD) végeztük, citrát-foszfát pufferben (pH: 5,0), a reakciót 4M kénsavval állítottuk le. Minden lépés között a mosást 0,05% Tween tartalmazó PBS-sel végeztük. A lemezeket Dynatech MR7000 fotométerrel mértük le.

6. 10. Izotípus meghatározás

A monoklonális ellenanyagok (a-EFCC klónok) izotípusát indirekt ELISA módszerrel, Monoclonal Antibody Isotyping Reagent Kit (Sigma) segítségével határoztuk meg, követve a cég utasításait.

6. 11. Immunprecipitáció

Triton X-100 lízis pufferrel coelomasejt lizátumokat készítettünk, melyeket precipitáltunk immunprecipitációs kit-tel (Sigma) a gyártó utasításai szerint, az a-EFCC1-4 mAt-k felhasználásával. A precipitátumot SDS-PAGE-n választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk.

6. 12. SDS-poliakrilamid gél elektroforézis és Western blot

Az immunprecipitátumok fehérjéit 10%-os gélen választottuk el Laemmli alapján (1970) Mini-Protean 3 apparátussal (Bio-Rad). Az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell) blottoltuk 4°C-on egy éjszakán át. A blottolás hatékonyságát Ponceau festéssel ellenőriztük a membránokon. A nitrocellulózt 2%-os sovány tejjel (Sigma) blokkoltuk PBS-ben egy órán keresztül. A blottokat biotinált a-EFCC klónokkal reagáltattuk (1:1000). Alkalikus foszfatáz konjugált avidin vagy HRP konjugált Streptavidin reagenseket használtunk a következő lépésekben. Az előhíváshoz az alkalikus foszfatáz enzim esetében NBT-BCIP festék elegyet szubsztrát pufferben (100 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) vagy ECL (Amersham) reagenst használtunk a HRP esetében. PBS/0,5% Tween oldattal mostuk a nitrocellulóz papírokat, a reakció lépések között. Festett molekulásúly proteineket (Sigma) használtunk standardként. A blottokat ScionImage szoftverrel (Windows) analizáltuk. Kontroll ellenanyagként biotinált a-FITC monoklonális antitestet használtunk.

6. 13. Áramlási citometria

Az izolált coelomasejteket DMEM 1640+10% FCS (Sigma Chem. Co., USA) tápoldatban vettük fel. Egy óra médiumos inkubáció után a sejteket lecentrifugáltuk (500 rpm, 5 min) és LBSS pufferben vettük fel (10^6 sejt/minta). A mintákat 4%-os PFA/LBSS elegyben fixáltuk. 0,1% NaN_3 tartalmú LBSS-ben mostuk a sejteket, melyet a permeabilizáló pufferben (LBSS/0,1% szaponin/0,1 % NaN_3) való mosás követett. Az antitesteket (FITC konjugált a-EFCC mAt-k) ebben a permeabilizáló pufferben adtuk a sejtekhez, majd 30 perc inkubáció következett 4°C-on. Az inkubáció letelte után megmostuk a mintákat kétszer szaponin pufferben és egyszer LBSS/BSA/ NaN_3 -ban. Végül 0,1% formalint tartalmazó LBSS-ben fixáltuk a mintákat és egy Becton Dickinson FACSCalibur citométerrel mértük és FCS Express szoftverrel analizáltuk.

6. 14. Monoklonális ellenanyag epitóp-meghatározása „phage-display” segítségével

A filamentózus fág (M13) pVIII-as köpenyfehérjén megjelenített kilenc aminosavas random peptid könyvtár Alessandra Luzzago (IRBM, Roma) nyújtotta rendelkezésünkre. A fágok dúsítását a korábban leírtak szerint (Felici és mtsai 1995) végeztük. Egy Petri-csészét egy éjszakán át érzékenyítettünk a-EFCC1 ellenanyaggal (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ az első, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a második dúsítási ciklusban). 0.05 % Tween tartalmazó PBS-es mosás majd 3%-os BSA-PBS-el való blokkolás és újabb mosás után, 10^{10} fágot (1% BSA/PBS-vel blokkolva) adtunk a lemezhez. 2 óras 37 °C-on végzett inkubáció és Tween (0,05% az első és 0.5% a második ciklusban) tartalmazó PBS-el történt mosás után, a fágokat eluáltuk (1 mg/ml BSA, 0.1M glicin pH 2.2), majd neutralizálást követően (2 M Tris Base) XL-1 Blue *E. coli*-t fertőztünk velük. M13KO7 helper fággal történt felülfertőzés után a fágokat kicsaptuk (16,7 % PEG 8000, 3.3 M NaCl) és egy második dúsítási ciklust kezdtünk. A második ciklus után a fágokkal fertőzött majd M13KO7 helper fággal felülfertőzött XL1-Blue *E. coli* telepeket nitrocellulóz membránokra emeltük. A membránokat blokkolás után (TBS/0,05% Tween20/5% tejjel) 2 órán át inkubáltuk a-EFCC1 ellenanyaggal (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), majd 1 órán át alkalikus foszfatáz konjugált anti-egér Ig másodlagos antitesttel. Pozitív klónokat választottunk ki, amelyeket ELISA-val tovább teszteltünk, oly módon, hogy a fágokat kötöttük ki a lemezre. Az ELISA alapján a legerősebb reakciót mutató klónokból DNS-t izoláltunk, amit egy ABI Prism 310-es készüléken megszekvenáltunk.

Annak bizonyítására, hogy ez az ellenanyagunk epitópja, indirekt ELISA-ban teszteltük a fágokat. Triton-X 100-al készített coelomasejt lizátumot kötöttünk ki ELISA lemezre egy éjszakán át, majd az ellenanyagot (a-EFCCC1 [3/C2klón]) összekevertük a fágokkal és egy órán át szobahőn inkubáltuk. A 43-as fágklón mellett egy irreleváns epitópot (CD45RC) hordozó (CA3 fág, Czömpöly és mtsai 2003) és a vad típusú fágot (M13KO7) is összehoztuk az ellenanyaggal.

Az inkubációs idő letelte után az oldatot (fág + ellenanyag) rápipettáztuk az ELISA lemezre. Peroxidáz konjugált anti-egér immunglobulinnal történt inkubálás után ortofenilén-diamin szubsztráttal előhívtuk a lemezeket.

6. 15. „In vitro” fagocitózis assay („quenching”)

Izolált coelomasejteket (10^6) inkubáltunk FITC jelzett hő-ínaktivált *Staphylococcus aureus* (OKI II2001) és *Escherichia coli* (ATCC 25922) baktériumokkal (10^7) szobahőn „end-over-end” rotációs készülékkel. A fagocitózis után megmostuk a sejteket LBSS-ben, centrifugáltuk 1000 rpm, 5 perc. A mosási lépés után citocentrifugával Cytospin (Shandon, USA) tárgylemezekre ülepítettük a sejteket. A lemezeket fixáltuk, majd megjelöltük a coelomasejt-alpopulációkra specifikus biotinált a-EFCC3 ill. a-EFCC4 ellenanyagokkal, majd Streptavidin-R-Phycoerithrin konjugátumot adtunk a sejtekhez. A mikroszkopizálás előtt propidium-jodid és DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) festékekkel inkubáltuk a lemezeket (a fagocitált és sejten kívül lévő baktériumok elkülönítése), majd PBS-es mosás és glicerines lefedés következett (Drevets és Campbell 1991).

A fagocitózis ráta és a fagocitózis index az alábbi egyszerű számítás alapján került meghatározásra:

Fagocitózis ráta (%) = Fagocitáló coelomasejtek száma / teljes coelomasejt szám X 100

Fagocitózis index = Bekebelezett baktériumszám / teljes coelomasejt szám

6. 16. „In vitro” enkapszulációs assay

Coelomasejteket (4×10^5) helyeztünk ki 96 lyukú sejttenyésztő lemezre 100 μ l DMEM+10% FCS médiumban, a tápoldathoz mértünk streptomycin és penicillin antibiotikumokat is. Enkapszulációs „célsejtként” 150-200 Sephadex G25 gyöngyöt tettünk a lyukakba. A lemezt szobahőn 130 rpm-mel forgattuk 24 órán keresztül (Pech és Strand 1996). A mintákat tárgylemezre centrifugáltuk (előtte LBSS-ben mosva hagytuk

leülepedni a gyöngyöket fél percig és az ülepítményt használtuk fel) és immuncitokémiával vizsgáltuk.

6. 17. Keresztreakciók más fajokon

Az ellenanyagok reaktivitását megnéztük más gilisztafajok coelomasejtjein (*Lumbricus rubellus*, *Tubifex tubifex*) és más gerinctelen állatfajok (Mollusca, Arthropoda) hemocitáin, szövetein (*Planorbarius corneus*, *Drosophila melanogaster*). A csigafajból kriosztátos metszetet készítettünk illetve hemocitáit a talpból Pasteur pipettával izoláltunk, *Drosophila* hemocitákhoz a lárva bőrének feltépésével és hemolimfájának kimosásával jutottunk (Franceschi és mtsai 1991, Vilmos és mtsai 2004). Emlős fajokból (egér, patkány, humán) izoláltunk leukocitákat, melyeken immuncitokémiai és áramlási citometriai méréseket végeztünk az EFCC specifikus ellenanyagokkal. Patkány szöveteken (lép, máj, tímusz, agy, vese) végeztünk immunhisztokémiai festéseket.

6. 18. Lizosomális aktivitás nyomon követése

Az izolált coelomasejteket enzimecitokémiával karakterizáltuk (ld. feljebb), majd a sejteket immuncitokémiára festettük a-humán AcP (1: 50 nyúl, Sigma) ellenanyaggal. A fixálást 4% PFA-val végeztük 20 percig, permeabilizáltuk a sejteket 0,5% Triton X-100-zal, majd az ellenanyag inkubáció következett. A-AcP-vel éjszakán át, a-nyúl HRP-val (1:100) 1 órán át történt az inkubáció, majd előhívás AEC-vel. Áramlási citometriában a már leírt módon történt a jelölés. Ellenanyagok, reagensek az áramlási citometriához: a-AcP (1:50), biotinált a-nyúl (1:100), Streptavidin-FITC (1:100). Coelomasejteket fagocitáltattunk hővel elölt baktériumokkal (leírt módon) majd lizátumot készítettünk a sejtekből, melyet Western blottal vizsgáltunk.

Ellenanyagok, reagensek Western blothoz: a-AcP (1:500), biotinált a-nyúl (1:1000), Straptavidin-HRP (1:1000). Az előhívást ECL reagenssel végeztük.

A fagocitált minták felülúszóját, coelomafolyadék ELISA-ban teszteltük, reagensek: a-AcP (1:500), a-nyúl HRP (1: 1000). Az előhíváshoz OPD-t használtunk.

A fehérjemeghatározást (Bradford 1976) a Western-blot vizsgálat és az ELISA vizsgálatnál végeztünk, a mintákból egyenlő mennyiségű fehérjét használtunk fel a vizsgálatokhoz.

6. 19. Citotoxicitási tesztek

Eukarióta sejteket (HeLa [ATCC CCL2], HEp-2 [ATCC CCL23], PC-12 [ATCC CRL1721] és PA317 [ATCC CRL9078]) tenyésztettünk 96 lyukú lemezeken (5×10^5 /lyuk), DMEM+10%FCS tartalmú tenyésztőmédiumban.

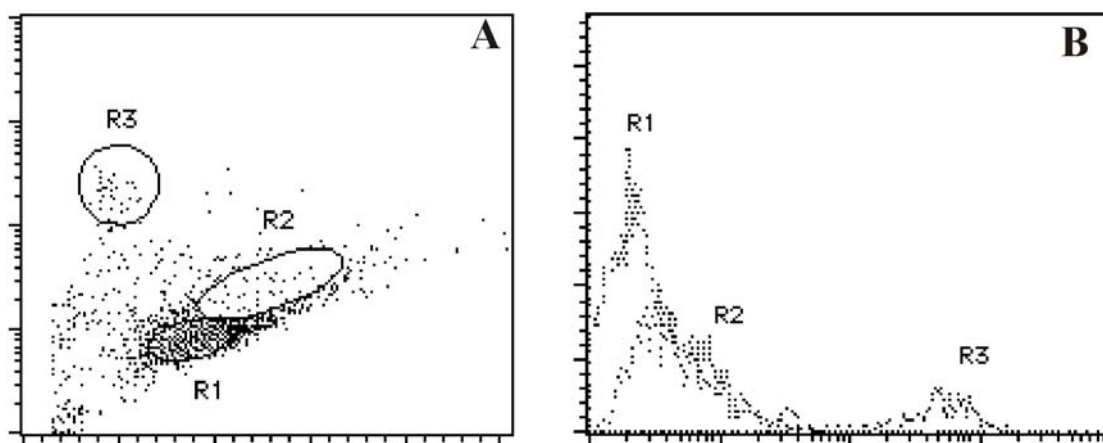
A sejteket egynapos coelomasejt felülúszóval, ultrahanggal homogenizált sejt-lizátummal, coelomafolyadékkal inkubáltuk a targetsejteket. Kontrollként DMEM+10% FCS tenyésztőmédiomot ill. a lizálómédiomot (LBSS) használtuk. A citotoxicitás gátlásaként a coelomasejt lizátumokat megkezeltek (hődenaturáció 95 °C-on, tripszin és proteináz K emésztés). Az inkubációs idő letelte után a sejtekhez MTT oldatot (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazóliumbromid) adtunk (5mg/ml, PBS-ben, pH7,2), majd a lemezt 4 órán át, 37°C-on inkubáltuk. A reakció leállítása izopropanol-HCl (24:1) oldattal történt, majd a kivált formazán kristályok abszorbanciáját 560nm-en mértük Dynatech MR 7000 fotométerrel. WST-1-el is végeztünk fotometriás méréseket 460 nm-en. A targetsejtek morfológiai változásait Olympus C-4040 mikroszkóppal követtük nyomon. A statisztikai analízisek során a kezelések szignifikanciáját Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze. $P < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

7. EREDMÉNYEK

7. 1. A coelomasejtek fizikai paraméterek alapján történő elkülönítése

A bevezetésből kitűnt, hogy a coelomasejtek csoportosítása, karakterizálása a klasszikus mikroszkópos morfológiai eljárásokkal nem könnyű feladat. Szerzőnként és kísérletenként is eltérhet a megnevezés, amely adódhat az eltérő sejt izolálási és festési protokollokból is. Munkánkban ezen ellentmondások feloldására is igyekeztünk megoldást találni.

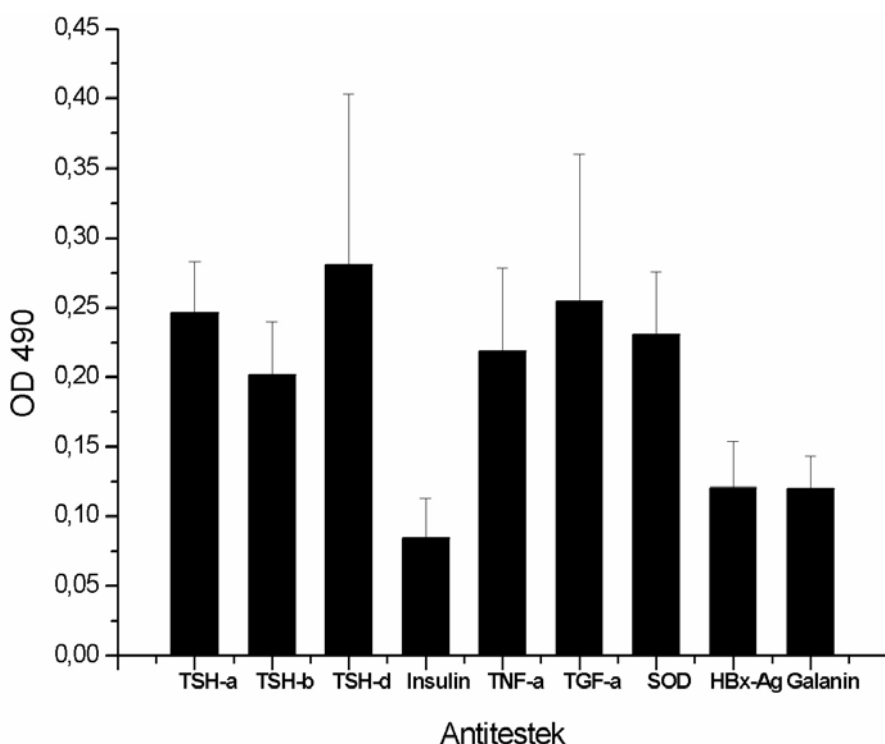
Áramlási citometriával, a fizikai paraméterek alapján (nagyság és granularitás) karakterizálhatók a sejt alcsoportok. Három csoportot tudtunk elkülöníteni a coelomasejtek között, melyek a következők: R1, R2 és R3 (11.A ábra). Az R1 csoport megfelel a granuláris-, az R2 a hialin amöbocitáknak. A harmadik (az R3) csoport intenzív autofluoreszcenciával rendelkező, granulált sejtársaság, e tulajdonságok alapján a chlorogogén sejtekkel hozható fedésbe (11.B ábra).



11. ábra. Coelomasejtek fizikai paraméterek alapján három nagyobb csoportra különíthetők el: (R1, R2, R3) (A), FL-1 csatornában vizsgálva a fluoreszcenciát, szembevetően az R3 csoport erős autofluoreszcenciája (B). A sejtek aggregálódását megakadályozandó az áramlási citometriai jelölések előtt DMEM tápoldatban inkubáltuk a sejteket.

7. 2. Konzervatív emlős antigénekre specifikus monoklonális antitestek reakciója giliszta immunsejt lizátummal

Az izolált coelomasejteket különböző emlős konzervatív antigénekre előállított monoklonális ellenanyaggal, immunszerológiai és immunmorfológiai eljárásokat alkalmazva jelöltük. Indirekt ELISA-ban a coelomasejt fehérjékkel intenzíven reagált az anti-TNF- α , anti-TGF- α és az anti-Cu/Zn SOD monoklonális ellenanyag. A legerősebb reakciót az anti-TSH-dimer ellenanyag mutatta, emellett a többi TSH izoformát (TSH- α , TSH- β) felismerő monoklonális antitest is reagált a lizátummal (12. ábra).



12. ábra. Emlős antigénekre előállított monoklonális ellenanyagok reakciója coelomasejt lizátumon indirekt ELISA rendszerben.

Kontroll ellenanyagként az anti-galanin (IgG1) ellenanyagot használtuk. Ezt a konzervatív peptidhormont már korábban kimutatták a giliszták neuronjaiban (hasdúc-lánc), de mi a coelomasejtben nem találtunk immunreaktivitást. Negatív kontrollként használtuk a Hepatitis B vírus X proteinje (HBx-Ag) ellen előállított monoklonális ellenanyagot (IgG1), mely nem mutatott specifikus reakciót. Inzulín-szerű növekedési faktort már kimutattak és izoláltak *Eisenia fetida* valamint *Lumbricus terrestris*

szövetekből, ám coelomasejtekből készített lizátumban mi nem találtunk inzulin-szerű molekulát ELISA módszerrel.

7. 3. Emlős sejtfelszíni antigéneket felismerő monoklonális ellenanyagok reaktivitása coelomasejteken

Az egér sejtfelszíni molekulákra (CD90, CD24) specifikus ellenanyagokkal áramlási citometriában markáns festődéseket kaptunk a coelomasejtek felszínén. Az anti-TNF- α mAb szintén jelölte a coelomasejtek membránját. Mindhárom, különböző ellenanyag esetében az R1 és R2 populáció bizonyult pozitívnak, az R3 sejtekkel nem reagáltak az ellenanyagok.

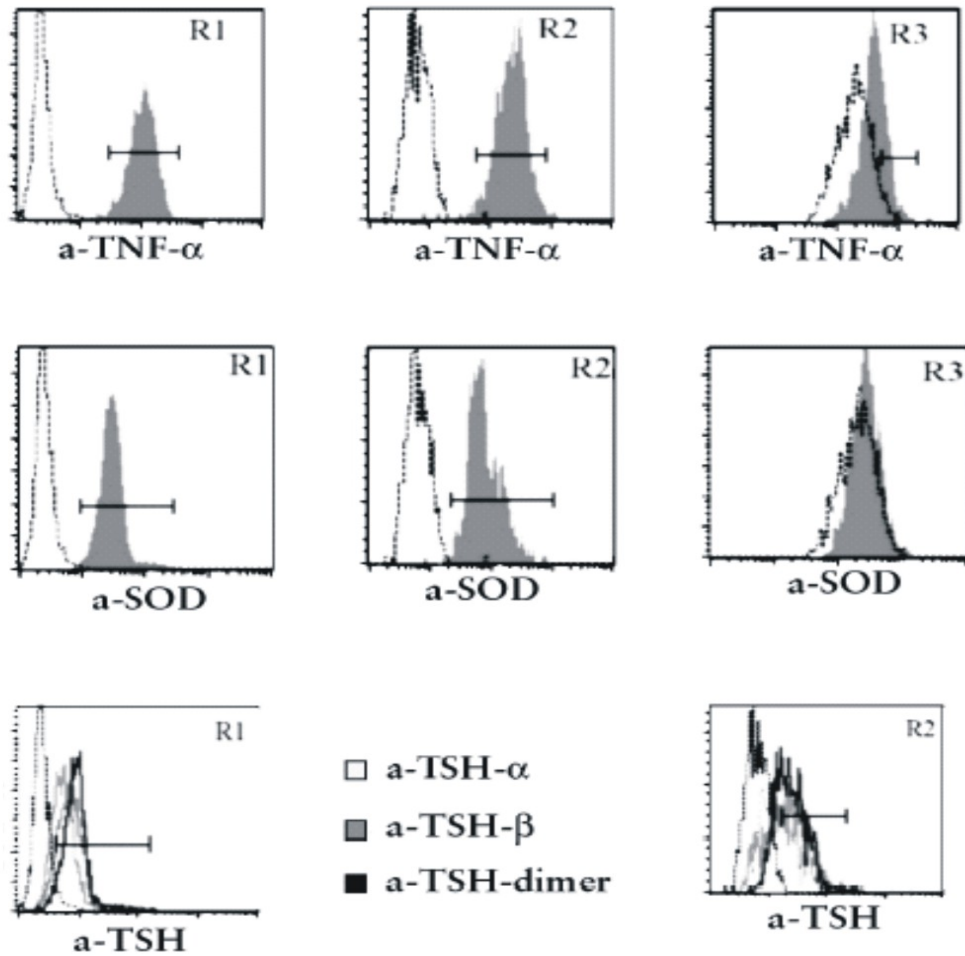
	R1	R2
a-CD90	24,61 \pm 10,10%	20,20 \pm 2,15%
a-CD24	42,75 \pm 0,89%	34,15 \pm 8,12%
a-TNF- α	38,04 \pm 4,64%	26,03 \pm 3,11%

3. táblázat. Emlős sejtfelszíni antigénekre specifikus ellenanyagok coelomasejteken mutatott reakciója.

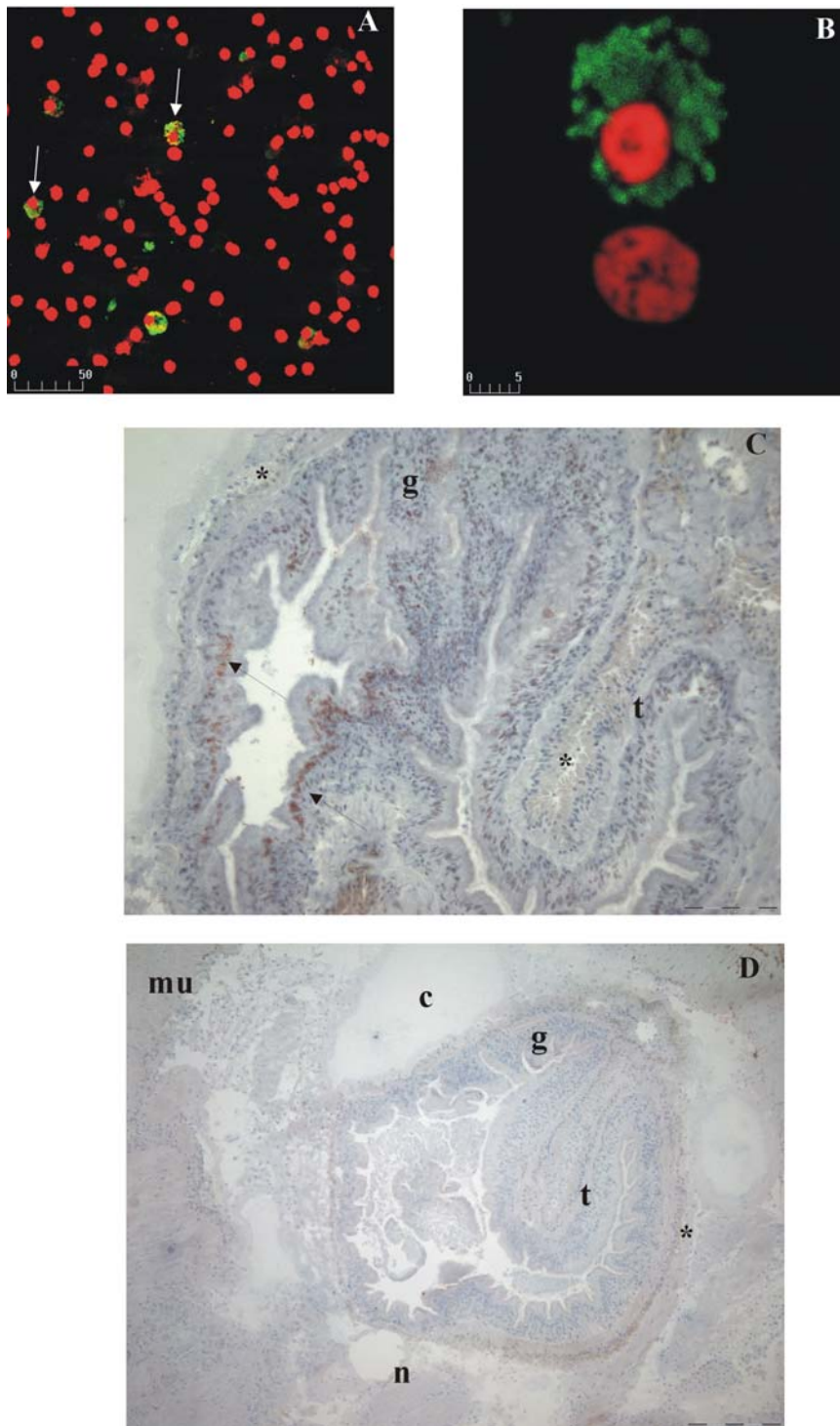
A táblázatban az immunpozitív sejtek százalékos aránya van feltüntetve.

7. 4. Intracelluláris festődés coelomasejteken a-TNF- α , a-TSH- α , - β -dimer, a-Cu/Zn SOD monoklonális ellenanyagokkal. A-TNF- α reaktivitás mezodermális szöveteken.

Intracelluláris jelöléseket alkalmazva kaptunk egyértelmű festődést hormon (a-TSH), citokin (a-TNF) és enzim (a-Cu/Zn SOD) specifikus monoklonális ellenanyagokkal a coelomasejtek citoplazmájában (13. ábra). Hasonlóan a sejtfelszíni festődéshez az R1 és R2 populáció bizonyult pozitívnak, míg az R3 konzekvensen negatív volt.



13. ábra. Coelomasejtek áramlási citometriai analízise intracelluláris jelölés alapján. Az a-TNF- α , a-Cu/ZnSOD monoklonális ellenanyagok mutatták a legerősebb festődést az R1 és R2 populációban. Az a-TSH ellenanyagok közül a dimer formát felismerő mutatta a legerősebb reakció az izotípus kontrollhoz képest.



14. ábra. Immncitokémiai és -hisztokémiai reakciók anti-TNF- α mAt-tel giliszta sejteken és szöveteken. Izolált coelomasejtek intracelluláris festődése (nyíllal jelezve) anti-TNF- α monoklonális ellenanyaggal. Konfokális mikroszkópos felvétel, propidium-jodid magfestés (A, B). Kriosztátos metszeteken az anti-TNF- α mAt specifikusan a bél egyes sejtjeit (mezodermális sejtet) jelöli (C). A kontroll reakción (D) csak a bél felületén található chloragógén sejtek mutatnak gyenge aspecifikus reakciót (endogén peroxidáz, csillaggal jelölve). Hematoxilín magfestés. Méretarány: 50 μ m (A), 5 μ m (B), 100 μ m (C), 200 μ m (D). Jelmagyarázat: c-coeloma, g-bél, mu-izomrétegek, n-hasdúclánc, t-typhlosolis.

Immuncitokémiai festésekkel a citokin, hormon és enzim specifikus ellenanyagok jelölődése jól követhető volt a coelomasejtekből készült citoprepeken. A konfokális mikroszkópos képeken látszik az intracelluláris festődés a coelomasejtek citoplazmájában anti-TNF- α monoklonális ellenanyaggal történt festés után (**14.A** és **B** ábra). Kriosztátos gilisztá keresztmetszeteken alkalmazva ezt az ellenanyagot a bél belső sejtrétege mutatott specifikus jelölődést (**14.C** ábra). Kontroll reakcióban (normál egér szérumot használva) nem kaptunk festődést az említett szöveti struktúrákban. Halvány reakció látszik a bél felszínén, amit a chloragogén szövet endogén peroxidáz aktivitásának tulajdonítunk (**14.D** ábra). A szöveteken történt peroxidáz gátlás, mind a TNF- α -val festett, mind a kontroll metszeten látszik egy gyenge aspecifikus jelölődés a bél felszínén.

7. 5. Lizoszomális enzim (savi foszfatáz) eloszlása coelomasejt populációkban

Emlős hemopoetikus sejtek (monociták, makrofágok) jellegzetes enzimei a savi és alkalikus foszfatáz. A savi foszfatáz a lizoszomális savi hidrolázok csoportjába tartozik, lizoszomális expresszió mellett, az extracelluláris térben is gyakran megfigyelhető.

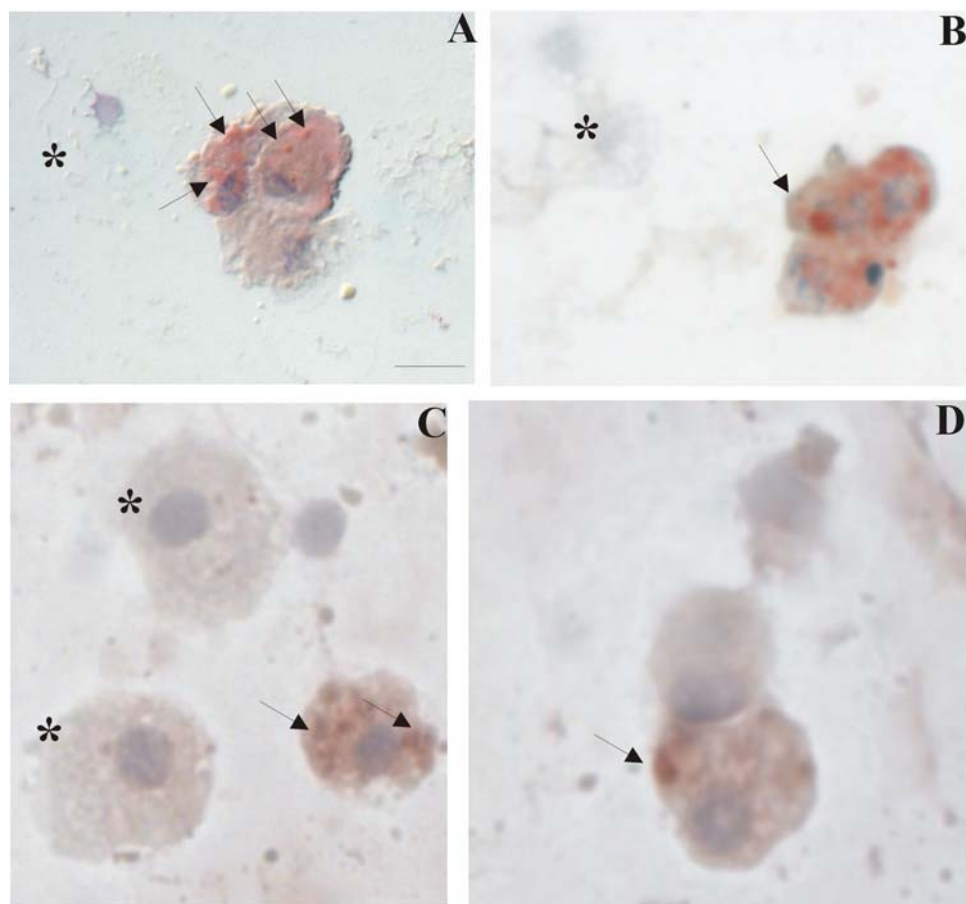
Enzimcitokémiai módszerrel sikerült kimutatnunk az enzim jelenlétét (**15.A** és **B** ábra) coelomasejtekben. Az enzimreakciót elsősorban lizoszomális struktúrákban tapasztaltuk, néhány alkalommal extracellulárisan is kaptunk festődést. A sejtcsoportok között enzimreaktivitási különbségeket tapasztaltunk, ezeket a különbségeket immunológiai módszerrel is sikerült reprodukálni (**15.C** és **D** ábra). Anti-humán savi foszfatáz poliklonális ellenanyaggal festettük a sejteket áramlási citometriás analízisre. A sejtpopulációk különböző savi foszfatáz tartalmát a **4.** táblázat mutatja be.

R1	19,38 \pm 10,74%
R2	43,3 \pm 19,15%
R3	11,0 \pm 11,69%

4. táblázat AcP enzimtartalom eloszlása coelomasejt alpopulációkban. Áramlási citometriában a hialin sejtekben találtuk a legmagasabb AcP tartalmat.

A citokémiai festések és az áramlási citometriai mérések során a granuláris (R1) és hialin (R2) sejtekben találtuk a magasabb savi foszfátáz enzimtartalmat, reaktivitást. A chloragogén sejtekben nem tapasztaltunk számottevő reakciót.

További adatként szolgál az is, hogy humán savi foszfátázra specifikus ellenanyaggal festve a sejteket, élénk granuláris festődést tapasztalunk kisebb sejtek citoplazmájában, amelyet a bazofil sejtekként (hialin altípus) azonosítottunk (15.D ábra). Chloragogén sejtek nem festődtek számottevően az ellenanyaggal.



15. ábra. Savi foszfátáz kimutatása enzimmikémiai és immunkémiai módszerrel coelomasejtekben. A coelomasejtek közül a hialin és granuláris sejtek voltak pozitívak (nyíl), a chloragogén sejtek negatívnak (csillag) bizonyultak. Az enzimmikémiai reakció során egyértelmű a granuláris aktivitás (A, B). Anti-AcP ellenanyaggal szintén granuláris lokalizációt mutatott az enzim (C, D). Méretarány: 10µm.

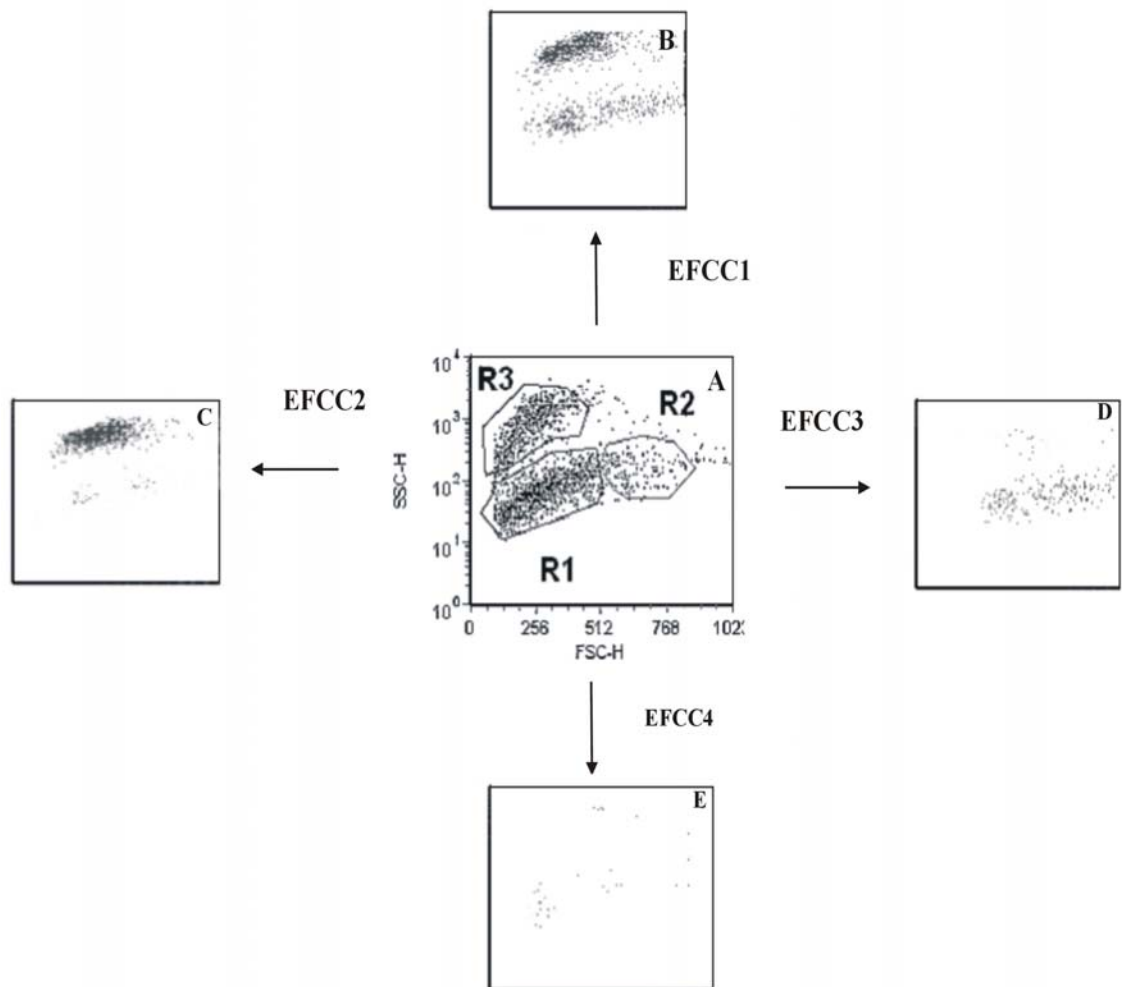
7. 6. A coelomasejtek áramlási citometriai analízise specifikus monoklonális ellenanyagokkal

A létrehozott hibridómák közül nyolc független IgG osztályú ellenanyagot szekretáló klónt izoláltunk (a-EFCC). A nyolc klónt festési mintázatuk alapján négy alcsoportra osztottuk. Áramlási citometriai mérések során a dot-plot ábrákon csak a pozitív sejteket tüntettük fel.

Az **A csoport** egy közös epitópot (EFCC1) ismer fel az összes coelomasejt populációban, az a-EFCC 1/1 (3/C2) jelű klón mindegyik alcsoportot (R1, R2 és R3) jelöli (**16.A, B** ábra). Ezzel szemben különböző sejttársaságokat jellemez az a-EFCC2, a-EFCC3, a-EFCC4 ellenanyaggal való reaktivitás. Az a-EFCC2 klón (**B csoport**) főleg az erősen granulált sejtpopulációt festi (R3 populáció), melyeknek nagy az autofluoreszcenciája (**16.C** ábra).

A két másik ellenanyag csoport (**C** és **D**) az effektor coelomasejtekkel (hialin és granuláris amöbociták) reagál. Az immunhisztokémiában aggregáló, összetapadó sejteket festő EFCC3 ellenanyag markánsan festette áramlási citometriában az R2 populáció sejtjeit (**16.D** ábra).

Az a-EFCC4 kis jelölődést mutatott áramlási citometriában, főleg az R1 csoport sejtjeit festette meg (**16.E** ábra).

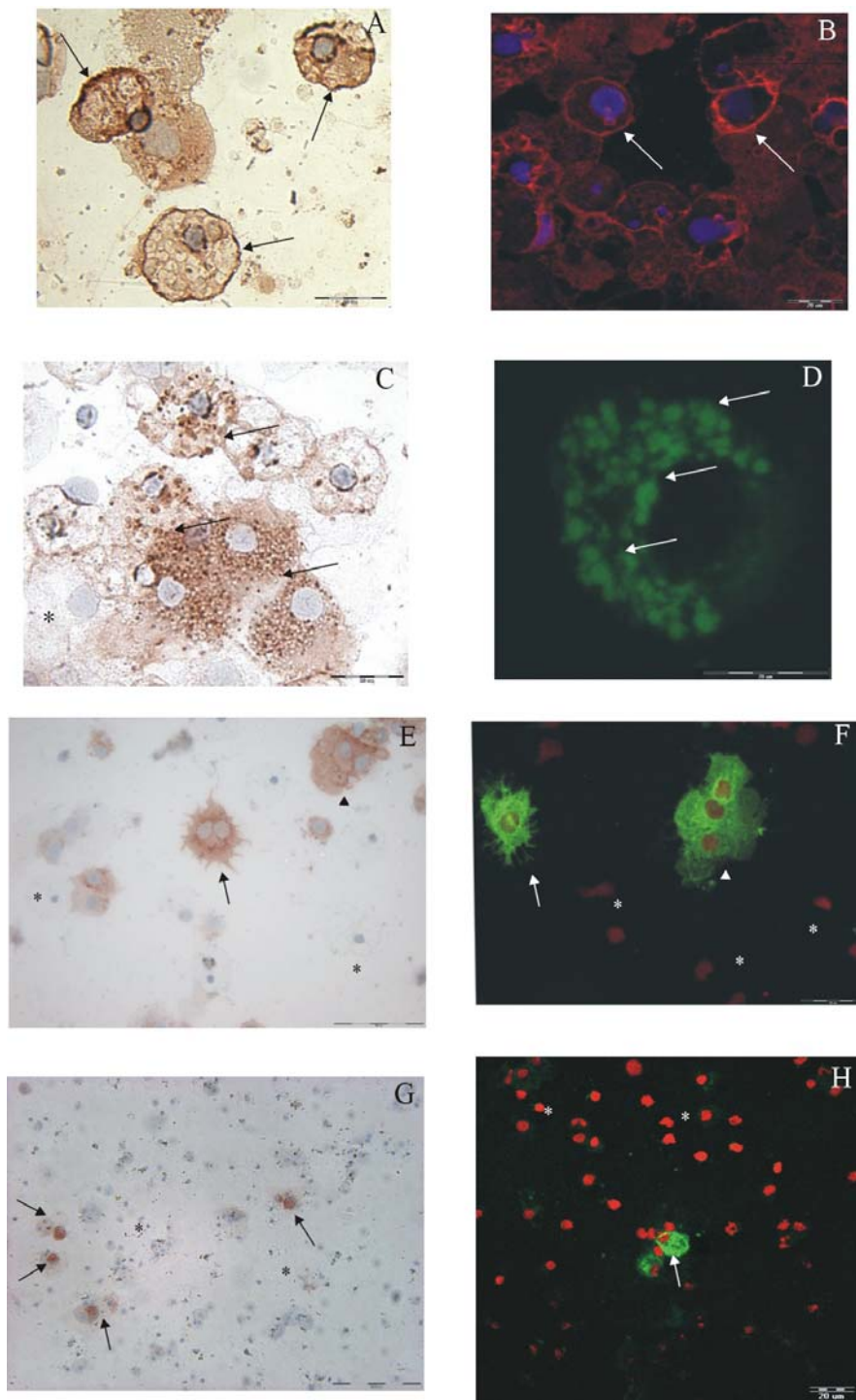


16. ábra. Különböző coelomasejt populációk áramlási citometriás analízise. Az analízáló program segítségével a dot-plotokon (B, C, D, E) a festés utáni immunpozitív populációkat mutatjuk be.

7. 7. Monoklonális ellenanyagok festési mintázata izolált coelomasejteken

Az a-EFCC1 ellenanyag a coelomasejtek membránján mutat reakciót, amint azt a fény- és konfokális mikroszkópos felvételeken láthatjuk (17.A, B ábra). Ez a klón elsősorban a sejtmembránt festi, bár némi reakció tapasztalható intracellulárisan (magmembrán) is. Fixálatlan, élő coelomasejtek is jelölődnek a sejt felszínen ezzel az antitesttel. Az a-EFCC2 (1/B1) intracelluláris granulumokat fest egy coelomasejt alpopulációban (17.C, D ábra), erre a sejt típusra jellemző, hogy citoplazmájuk nagyon granulált és sejtmagjuk viszonylag kicsi. A konfokális képen nagyon jól látszik a granuláris jelölődés (17. D ábra).

Ezek a sejtalkotók kitöltik a citoplazmát és méretük 1-6 μm közé tehető. E jellemzők alapján a chlorogén sejtpopulációval tudjuk fedésbe hozni ezeket a sejteket. A fénymikroszkópos képen három chloragocitát láthatunk melyek pozitívan festődnek, míg a körülöttük lévő coelomasejtek negatívak (**17.C** ábra). Az a-EFCC3 monoklonális ellenanyag intracellulárisan olyan coelomasejteket fest, melyek hajlamosak egymáshoz tapadni. Ezek a hialin amöbociták, melyek adherenciát mutatnak üvegfelületekhez, ezt mutatja a számos pseudopodium (**17.E** és **F** ábra) is. Az a-EFCC3 ellenanyaggal szemben a a-EFCC4 ellenanyag egy sokkal ritkább sejtpopulációt jellemez. Intracellulárisan festődnek a sejtek, feltűnő a perifériális elhelyezkedésű sejtmag (**17.G** és **H** ábra). Kis méretű sejtek, a morfológiai jellegek alapján ezek a granuláris amöbociták lehetnek.



17. ábra. Coelomasejt alpopulációk immuncitokémiai és immunfluoreszcens festése monoklonális ellenanyagokkal (a-EFCC klónokkal). Az anti-EFCC1 ellenanyag (A, B) a membránokat jelöli (nyíl), az a-EFCC2 mAt (C, D) intracellulárisan festi a chlorogogén sejtek granulumait (nyíl), a sejtekhez hozzátapadva negatív sejt is látható (csillag, C). Az a-EFCC3 mAt (E, F) nagy aggregáló sejtet festenek (nyílhegy), melyek pseudopodiumokat is növesztenek (nyíl), körülöttük számos negatív sejt is látható (csillag). Az a-EFCC4 (G, H) kevés sejtet (nyilak) fest a coelomasejt citopreparátumokon.

Magfestés: hematoxilin, propidium jodid, DRAQ5. Méretarányok: 20 μm (A-D), 50 μm (E, F), 200 μm (G), 20 μm (H).

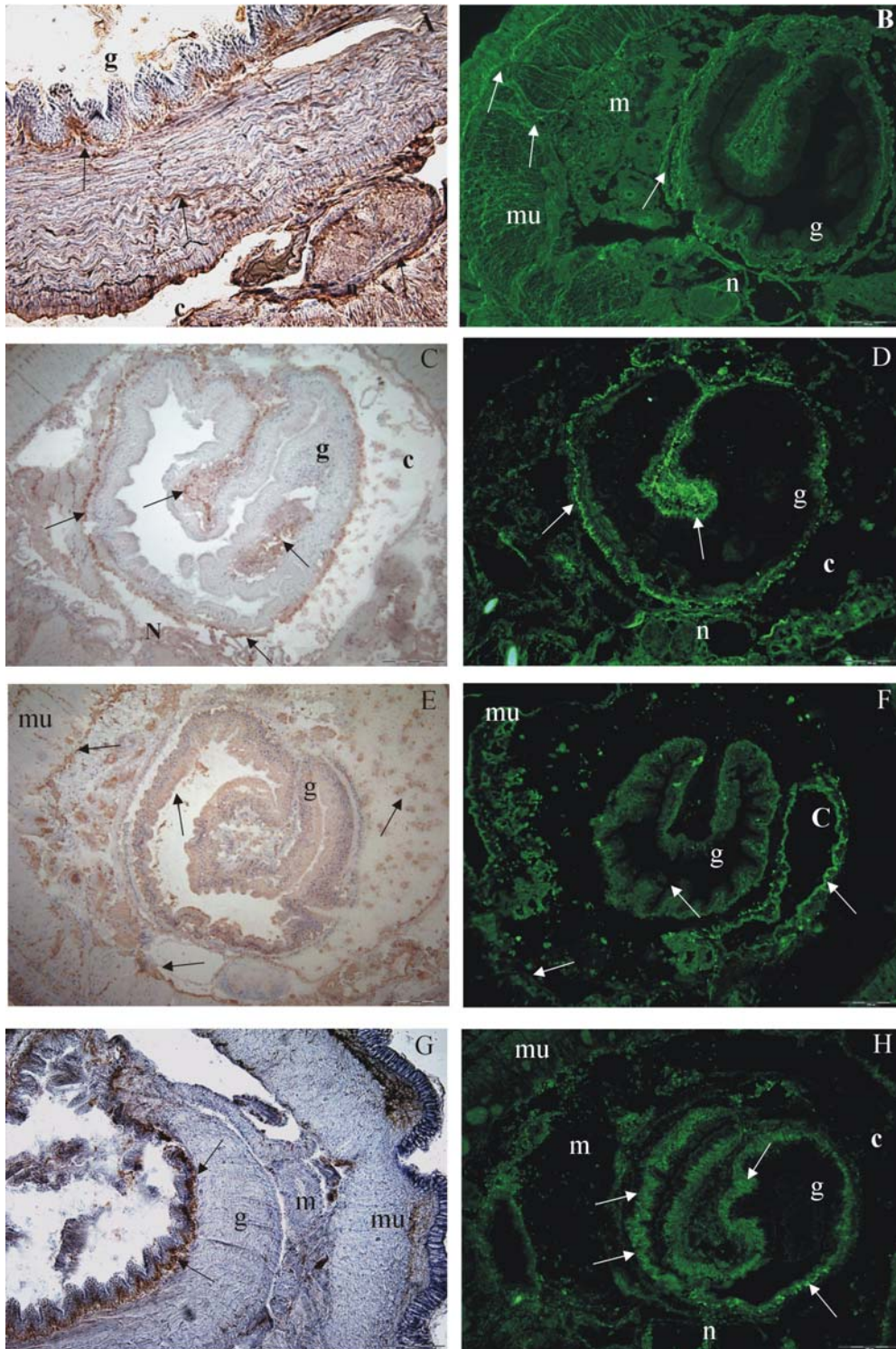
7. 8. Monoklonális ellenanyagok reakciója giliszta metszeteken

Kriosztátos metszeteket készítettünk gilisztaszövetekből a középbéli régióban, hogy tisztázzuk az ellenanyagok specificitását nem csak izolált sejteken, hanem teljes gilisztaszöveteken is. Először az a-EFCC1 klónt használtuk a festésekhez *Eisenia* szöveteken. Az ellenanyag reakciót adott a legkülönbözőbb szövetek (béltraktus, izomszövet, hasdúclánc) felszínén (**18.A** és **B** ábra).

Az EFCC2 antigén a festések során a bél coelomaüreg felőli falán mutatott festődést, ez a régió felel meg a letapadt/rögzített chlorogén sejtek helyének (**18.C** ábra). Az ellenanyag nem csak a bél külső felszínén, hanem a typhlosolisban is mutatott gyenge reakciót. A fluoreszcens festésnél nem kaptunk egyértelmű granuláris festődést ellentétben a citopreparátumokon tapasztaltakkal (**18.D** ábra).

A-EFCC3 klónt használva a festésekre, szelektív jelölődést tapasztaltunk, melyet a **18.E** ábra mutat be. Reakciót a bél és a coeloma-epithél felszínén tapasztaltunk. Érdekes megfigyelni a coelomaüregben meglévő sejtek pozitivitását. Immunfluoreszcenciával (**18.F** ábra) diszkrét festődést tapasztaltunk a bél felszínén, a coeloma felszínén és a metanephridiumban.

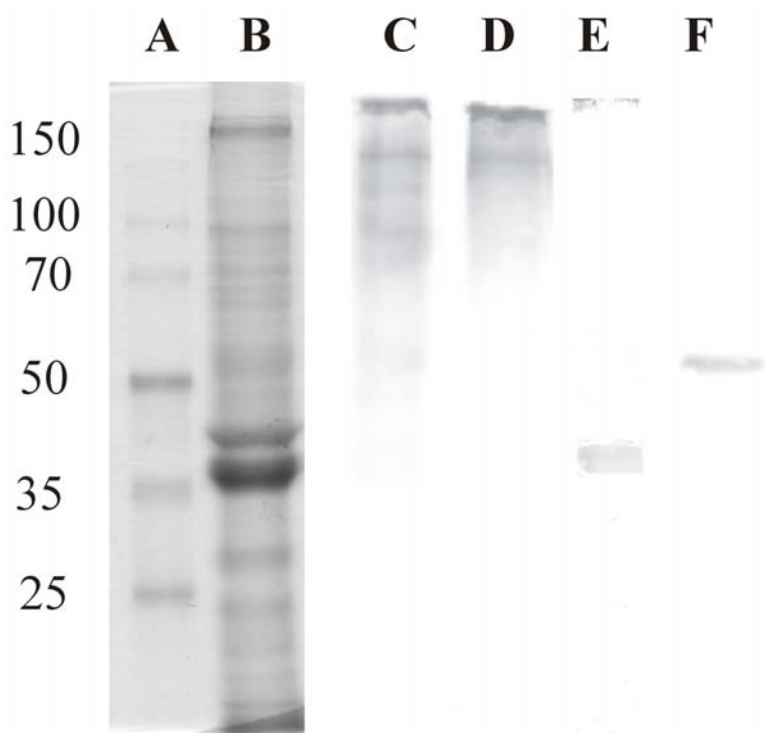
Az a-EFCC4 klónt vizsgálva giliszta szöveten, a reakció a bél belső falában, a szubepithéliális régióban jelentkezett (**18.G** és **H** ábra). Nem kaptunk festődést izomszövetben, idegrendszerben.



18. ábra. Gilishta keresztmetszetek immunhisztokémiai és immunfluoreszcens festése specifikus monoklonális ellenanyagokkal. Anti-EFCC1 mAb (A, B) megfesti az összes szöveti struktúrát (bél, izomrétegek, metanephridium, idegszövet), míg az EFCC2 marker (C, D) csak a bél felszínén lévő chloragogén populációban van jelen. Az a-EFCC3 antitest középső csiralemez eredetű szöveteket fest (E, F): bél, metanephridium. Jellemző, hogy a coelomaüregben jól látszanak a jelölődő coelomasejtek (E). Az EFCC4 marker bél falában jelen lévő sejtekben expresszálódik (nyilak, G, H). Méretarány: 200 μ m. Jelmagyarázat: g-bél, c-coeloma, m-metanephridium, mu-izomrétegek, n- hasdúclánc, t-typhlosole.

7. 9. Coelomasejtek lizátumának immunprecipitációja monoklonális ellenanyagokkal

Protein G immunprecipitációs kit segítségével karakterizáltuk az antitestek által felismert coelomasejt/gilisza molekulák jellegzetességeit. A precipitáció egy jellegzetes monoklonálisok által felismert antigén képet eredményezett. Az anti-EFCC1 monoklonális antitest (19.C ábra) 200 kDa, 149kDa, 100kDa körüli molekulákat ismer fel, ennek a molekulának egyelőre nem ismerjük a glikoziláltsági fokát. A chloragogén sejteket festő anti-EFCC2 egy 200 kDa körüli polipeptidet ismer fel (19.D ábra). Az effektor coelomasejtekkel reagáló klónok: az anti-EFCC3 40 kDa, az EFCC4 mintegy 55 kDa molekulásúlyú peptidekkel mutatnak reakciót a coelomasejt lizátumokban (19.E, F ábra).



19. ábra. Coelomasejt lizátumok fehérjeprofil vizsgálata specifikus ellenanyagokkal.

Teljes coelomasejt lizátum látható a molekulásúly marker fehérjék mellett SDS-PAGE-n elválasztva (A, B). Az immunprecipitációt követően a mintákat immuno-blot-tal vizsgáltuk. A különböző monoklonálisok változatos festési mintázatot mutattak (C-F). Anti-EFCC1 ellenanyag három peptidet ismert fel, amelyek 200 kDa, 149 kDa és 100 kDa körüliek (C). Anti-EFCC2 csak egy 200 kDa körüli band-et ismert fel (D). Anti-EFCC3 mAt, mely a hialin amöbocitákat festi, egy 40 kDa-os peptidet jelöl a sejt-lizátumokban (E), míg az anti-EFCC4 55 kDa-os molekulát ismer fel (F).

7. 10. a-EFCC1 ellenanyag epitópjának meghatározása random peptid könyvtár segítségével

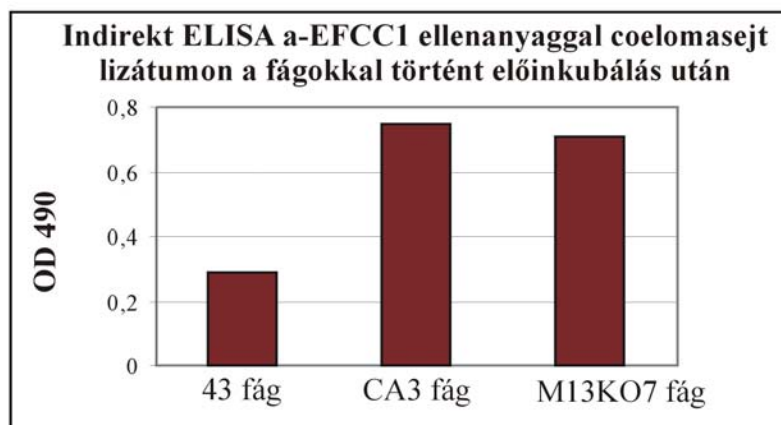
Coelomasejtek molekuláris markerekkel való jellemzéséhez szükséges, hogy az ellenanyagok pontos fehérjespecifitását is megismerjük. Elsőnek az a-EFCC1 ellenanyagot választottuk ki, mely a legáltalánosabb festést mutatott gilisztaszöveteken, így feltételeztük, hogy nagy mennyiségben van jelen ez az antigén az állat szervezetében.

Kísérleti rendszerünkben egy random 9 aminosavas peptidkönyvtárt használtunk fel az ellenanyag epitóptérképezéséhez. Ez a könyvtár egy filamentózus fág felszínén került megjelenítésre, nagy mennyiségben a fág VIII-as köpenyfehérjéjén. Az ellenanyaggal történt dúsítási lépések után a fágokat tartalmazó baktérium telepeket nitrocellulózra emeltük és immunoblot technikával teszteltük az ellenanyaggal, így 60 klónt választottunk ki, amelyeket indirekt ELISA rendszerben teszteltünk tovább, ebből 11 klónt találtunk a legerősebbnek. Ezek megszekvenálása után a következő szekvenciát tudtuk azonosítani: SLSDSC.

Ezt az aminosav összetételt a 11-es és 43-as klónokból kaptuk meg maradéktalanul, a többi klónban csak részben találtuk meg ezt a szekvenciát:

11 klón	LRYTT SLSDSCG
43 klón	CRYTP SLSDSC

Az EFCC1 specifikus ellenanyagot reagáltatva a fágokkal, majd ELISA rendszerben tesztelve tapasztaltuk, hogy a 43 fágklón legátolta az ellenanyag kötődését a sejtlizátumhoz, míg az irreleváns epitópot hordozó (CA3) és a vad típusú fág (M13KO7) nem gátolta számottevően az ellenanyag-antigén reakciót. Az eredmény alapján bizonyítottnak tekintjük, hogy a 43 fág az EFCC1 epitópot hordozza (20. ábra).



20. ábra. EFCC1 epitópot hordozó fág gátolja az anti-EFCC1 ellenanyag kötődését giliszta sejtlizátumhoz. Random peptideket hordozó és vad típusú filamentózus fágokat használtunk fel az indirekt ELISA-ban az epitóp térképezés eredményének ellenőrzésére. A reakción látható, hogy csak a 43 fág (EFCC1 epitóp) gátolja az ellenanyag kötődését a lizátumhoz.

7. 11. *Giliszta coelomasejt specifikus ellenanyagok reakciója más fajokon*

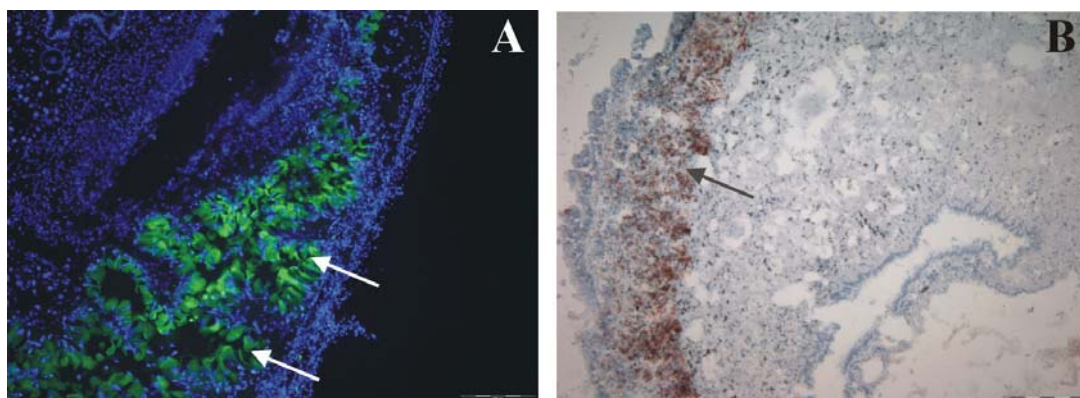
Az ellenanyagok további térképezése végett más fajokon is megnéztük az antitestek reaktivitását, melynek eredményeit táblázatban foglaltuk össze. Más gilisztafajokban (*L. rubellus*, *L. terrestris*, *Tubifex tubifex*) is kaptunk reakciót, a festési mintázat hasonló az *Eisenia fetida* sejteken, szöveteken tapasztaltakéhoz, viszont az intenzitás jóval gyengébb volt. Az alpopuláció szelektivitás megfelelt a korábbiakban tárgyaltakkal. A *Planorbarius corneus* csigafajnál csak az a-EFCC1 ellenanyag mutatott pozitívítást, míg *Drosophila* esetében nem tapasztaltunk festődést (5. táblázat).

Fajok	Reakció mintázat	
Gerinctelen állatfajok	Hemociták	Teljes szövet
<i>Planorbarius corneus</i>	+	+++
<i>Drosophila melanogaster</i>	-	NM
Emlősök	Limfoid	Nem-limfoid szövetek
egér, patkány,	-	-
humán	-	NM

5. táblázat. Az a-EFCC 1/1 ellenanyag keresztreakciós mintázata más fajokon. Egyedül a csiga fajon adott reakciót ez az ellenanyag, a többi antitest negatívnak bizonyult. NM: nincs meghatározva.

Gerinces (emlős) sejteken és szöveteken is megnéztük az a-EFCC antitestek reaktivitását, de egyik esetben sem tapasztaltunk pozitív reakciót.

A csigafajon tanulmányozva a különböző ellenanyag klónokat, egy esetben (a-EFCC1) kaptunk festődést. Az izolált hemocitákon enyhébb, illetve a csiga kriosztátos metszetén ez az ellenanyag markáns reakciót adott. A metszeteken szembetűnő az, hogy a szövet szélén a láb izomrétegében található lakunákban látható a reakció (21.A és B ábra). Más struktúrákban nem kaptunk reakciót, ezekben a lakunákban hemolimfa áramlik.



21. ábra. *Planorbarius corneus* csiga metszet immunfluoreszcens és immunhisztokémiai festése az a-EFCC1 ellenanyaggal. Az ellenanyag a talp alatti sinusoidokban (nyilak, A és B) mutat festődést. Magfestés: DAPI (A) és hematoxilin (B). Méretarány: 100 μ m.

7. 12. Coelomasejt alpopulációk fagocitózisa

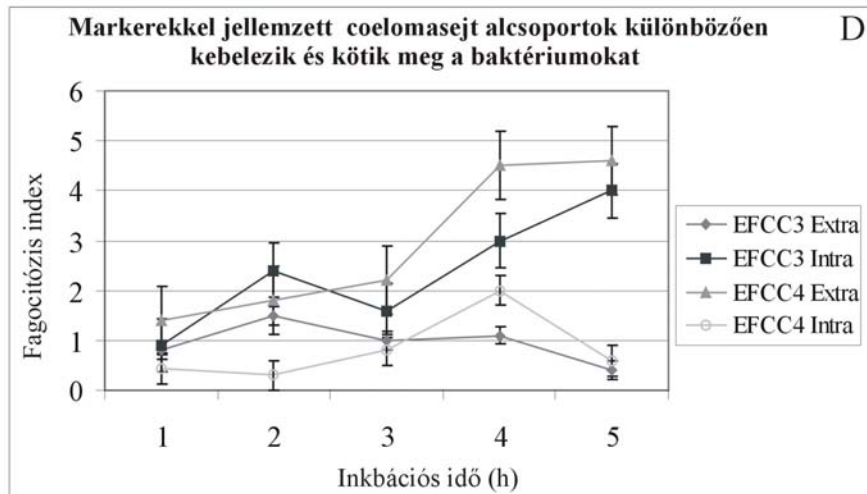
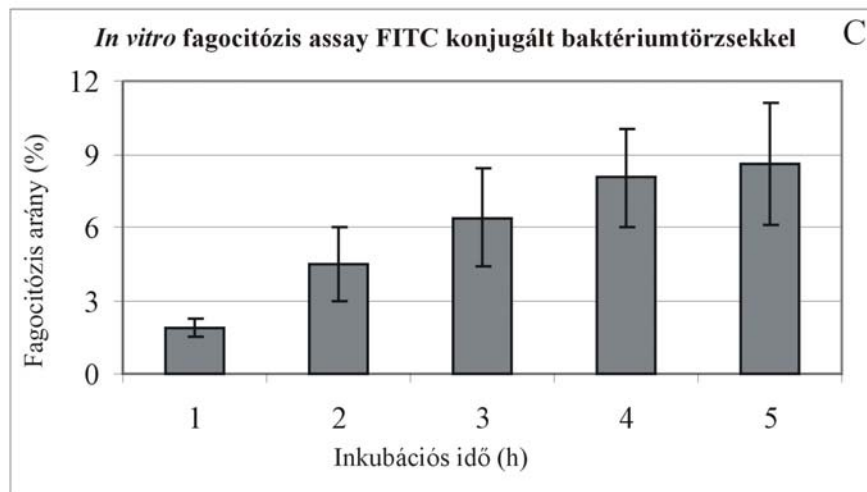
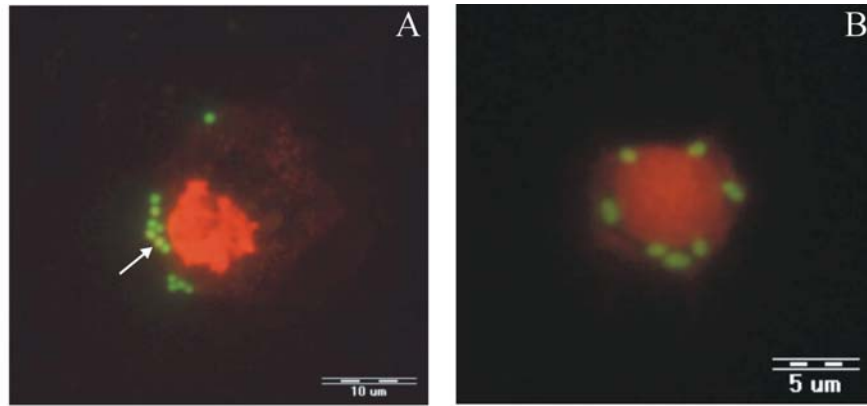
Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a különböző csoportba tartozó coelomasejtek eltérő módon vesznek részt a fagocitózisban. FITC konjugált baktériumokat (*S. aureus* és *E. coli* fajokat) használtunk *in vitro* kísérleteinkhez. A fagocitózis diagramon jól látható, hogy 3-4 óra eltelte után jelentékeny mennyiségű baktérium található a sejtekben. A fluoreszcens képeken láthatóak a fagocitáló sejtek. Magfestéket használva jól elkülöníthetőek a sejtre tapadt baktériumok a bekebelezettektől. A *S. aureus*-t fagocitáló sejt a bekebelezett baktériumon kívül még három baktériumot kötött meg a felszínén (22.A ábra). *E. coli*-t is fagocitálnak a coelomasejtek, bár kisebb mértékben, mint a Gram-pozitív baktériumokat (22.B ábra). A fagocitózis idődiagramja a 22.C ábrán.

A coelomasejtek funkcionális karakterizálása céljából a fagocitáló sejteket immuncitokémiára festettük az a-EFCC3 és az a-EFCC4 ellenanyaggal. Fluoreszcens mikroszkópiával megállapítottuk a fagocitált és a sejtekhez tapadt partikulumok számát, a két ellenanyaggal jelzett sejtekre lebontva. Ennek az eredményét ábrázolja a **22.D** ábra. Szembetűnő, hogy az EFCC4 antigént hordozó sejtek inkább megkötik a baktériumokat, kevésbé fagocitálnak, mely az inkubációs idő előrehaladtával beállt egy állandó szintre, ezzel szemben az a-EFCC3 ellenanyaggal festett sejtek aktívan fagocitálnak, három óra elteltével jelentősen megnő a bekebelezett partikulumok száma. Az EFCC2-vel jelzett sejtek (chloragógenek) inaktívak voltak a tesztek során, bár a baktériumok egy részét megkötötték.

7. 13. Enkapszulációs folyamatok vizsgálata

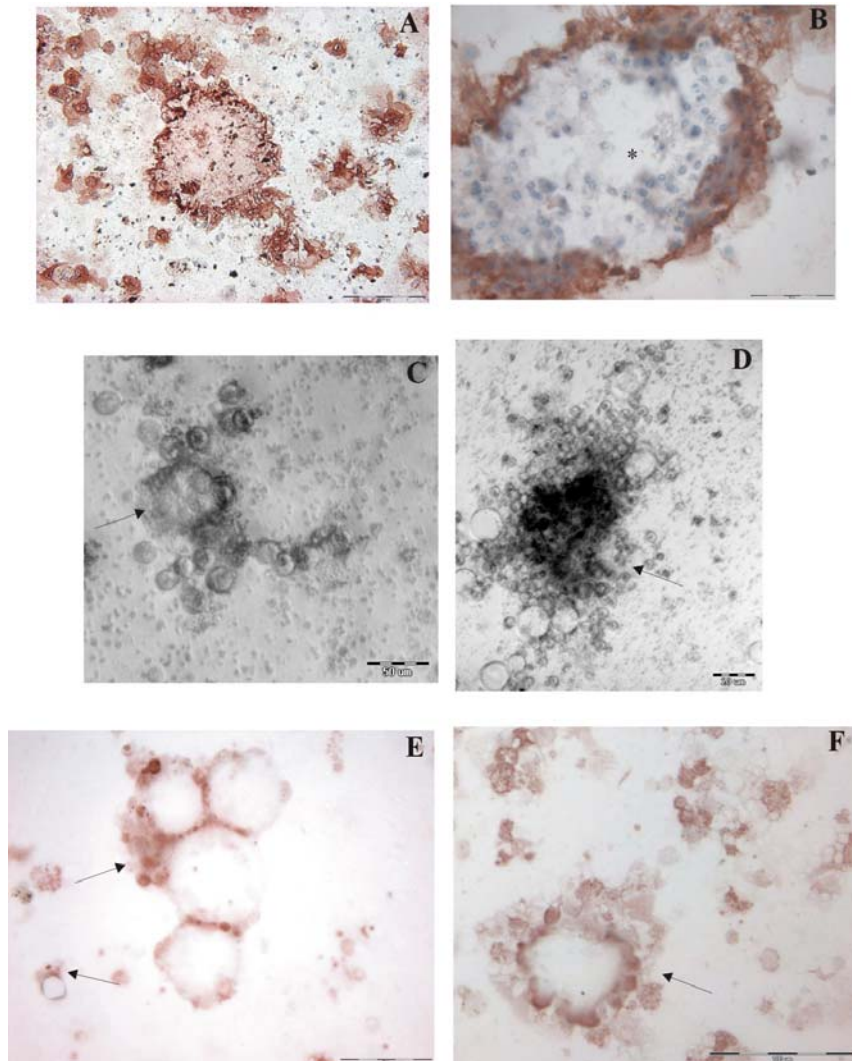
A bejutott kórokozó mennyiségétől ill. méretétől függően az immunsejtek a fagocitózis mellett más védekezési mechanizmusokra (tokképződés, enkapszuláció) is képesek.

Kísérleteinkben *in vitro* hoztuk össze a coelomasejteket Sephadex G25 gyöngyökkel. Előzetesen az ellenanyagok tesztelésénél már feltűnt az, hogy az egyik klón által jellemzett sejtek (EFCC3) határozott struktúrákat alkotnak, mely elhatárol egy ellenanyaggal nem festődő sejttömeget (**23A** és **B** ábra).



22. ábra. A coelomasejtek fagocita aktivitása, a sejtcsoportok funkcionális különbségének azonosítása mAt-ek segítségével. A coelomasejtek Gram+ (*S. aureus*, A) és Gram- (*E. coli*, B) baktériumot is bekebeleznek. A fluoreszcens magfestés „quencher” (zöld-sárga) a sejtmembránhoz kötődött baktériumok fluoreszcenciáját (extracelluláris) (nyíl, A). A coelomasejtek mintegy 10-12%-a vesz részt a fagocitózisban 5 órás inkubáció után (C). A mAt-k által jelölt coelomasejtek funkcionálisan különböző populációknak bizonyultak. Az anti-EFCC3 immunpozitív sejteknek (hialin amöbociták) van a legnagyobb fagocita aktivitása. Granuláris amöbociták anti-EFCC4 antitesttel festve gyengébb fagocita aktivitást mutatnak; bár ezek a sejtek jól hozzákötődnek a baktériumokhoz (D). Méretarány: 10 μm (A), 5 μm (B).

Inverz mikroszkópiával jól látható, amint a sejtek rátapadnak a gyöngyökre 12-16 óra elteltével, egy óriási sejtömeg jön létre (23.C és D ábra). Gyöngyöket adva a sejtekhez, megfigyeltük, hogy az a-EFCC3 ellenanyag által jelzett sejtek körülhatárolják, teljesen izolálják a környezetből a gyöngyöket (23.F ábra), ezzel szemben az a-EFCC4 jelű ellenanyagunk által felismert sejtek (granuláris sejtek) felismerik az idegen objektumot és bizonyos helyeken kapcsolódnak hozzá (23.E ábra).

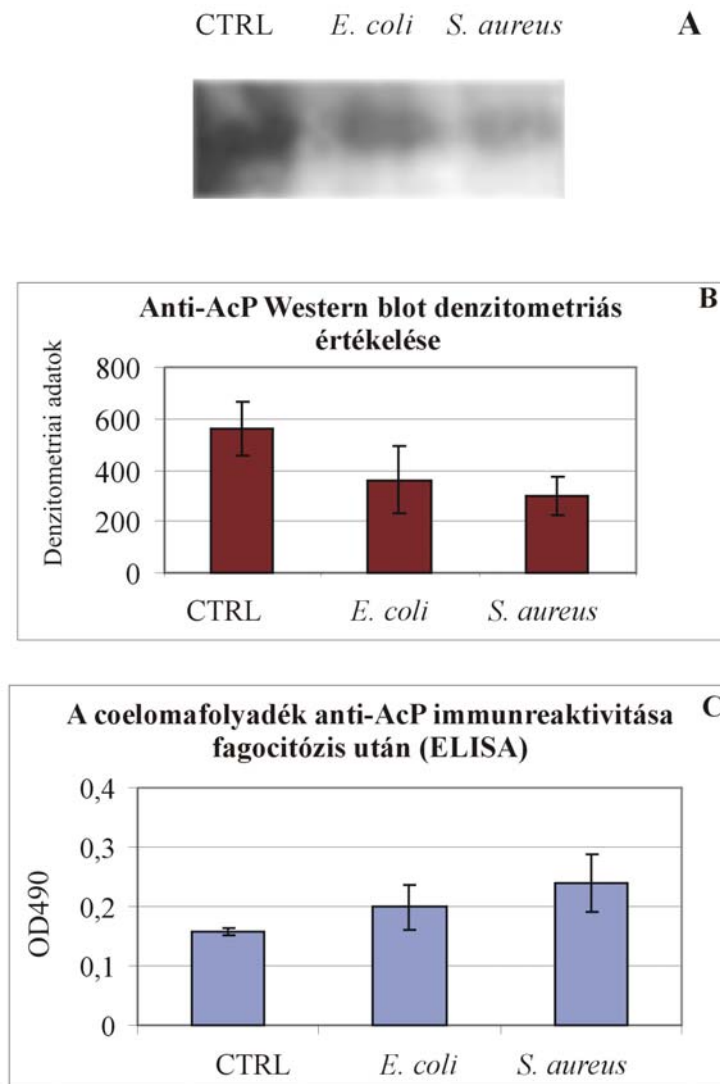


23. ábra. Coelomasejtek enkapszulációs folyamata. Az izolált coelomasejtek között gyakran láthatóak nagyobb sejtsoportosulások, melyekben (a-EFCC3 antitesttel festve) láthatóan elkülönülnek a jelöletlen struktúrák (A, B). Anti-EFCC3 pozitív sejtek enkapszulációs reakcióval izolálják a többi sejtet (csillag, B) a környezetükből. In vitro enkapszulációs assay-ben Sephadex G-25 gyöngyöket használtunk célobjektumként. A coelomasejtek a gyöngyök felszínére tapadnak (nyíl, C) majd egy nagyméretű sejtömeg jön létre, ahogy az invert mikroszkópiás képeken is látszik (D). Mintegy 20 óra után, az antitestek segítségével demonstrálható, hogy a hialin és granuláris populációk részt vesznek az enkapszulációs folyamatban. Anti-EFCC4 antitest jelzett coelomasejtek hozzákapcsolódnak a gyöngyökhöz (nyilak, E). Anti-EFCC3 mAt-tel festett hialin coelomasejtek izolálják a Sephadex gyöngyöket együttműködésben a többi coelomocitával (nyíl, F). Méretarány: 200 μ m (A), 50 μ m (B), 50 μ m (C), 20 μ m (D), 100 μ m (E), 100 μ m (F).

7. 14. Savi foszfatáz enzim változások coelomasejtekben fagocitózis után

Baktériumokat fagocitáltattunk coelomasejtekkel, majd lizátumokat készítve egy 39 kDa körüli fehérjefrakciót azonosítottunk Western blotban anti-AcP ellenanyaggal (24.A ábra). A kezelt és kontroll minták között különbség mutatkozott az enzimmennyiségben. A fagocitáltatott mintákban jelentősen lecsökkent az enzimmennyiség a kontrollhoz képest (24.A és B ábra).

Megvizsgálva a fagocitáltatott minták felülúszóját ELISA-ban megfigyeltük azt, hogy az enzim immunreaktivitás megnőtt a kontrollhoz képest a kezelt mintákban (24.C).



24. ábra. Coelomasejtek AcP tartalom változása fagocitózis hatására. Egy 39 kDa körüli AcP immunoreaktív fehérje expressziója intracellulárisan lecsökken (A és B), extracellulárisan pedig megemelkedik a fagocitózis során (C). Azonos összkoncentrációjú fehérjeoldatot használtunk a mintákból a kísérletek során.

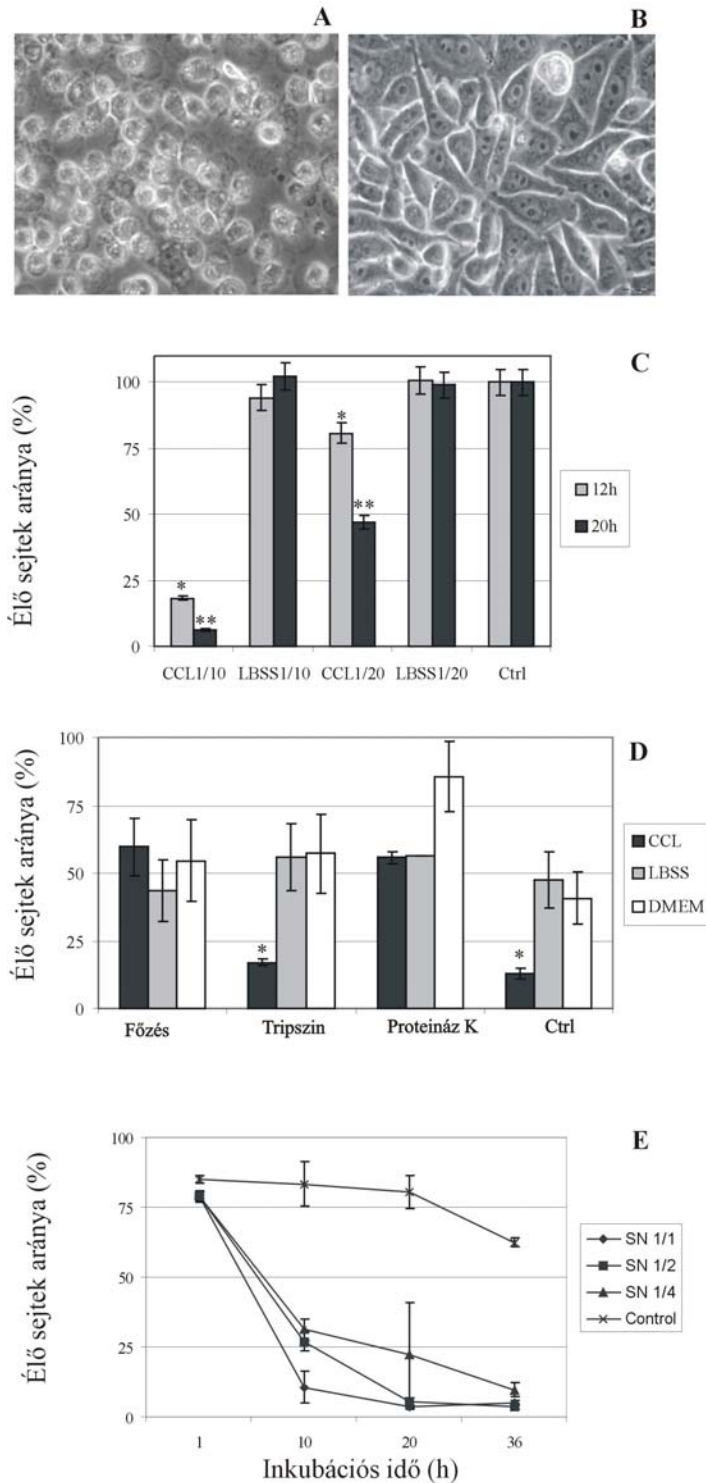
7. 15. Coelomasejtek citotoxicitása

Különböző emlős sejtvonalakon (HeLa, HEp-2, HepG2, PC-12, PA317, MDCK) végeztünk citotoxicitási kísérleteket. Vizsgálatainkban coelomafolyadékot, coelomasejtek lizátumát, *in vitro* tenyésztett coelomasejtek felülúszóját használtuk. Mindhárom esetben azt tapasztaltuk, hogy a target sejtek (más-más időtartam alatt) elpusztultak. Inverz mikroszkóppal vizsgálva a targetsejtek (HEp-2) morfológiai változásait a coelomafolyadék, sejtlizátum hozzáadása után hasonló jelenségeket tapasztaltunk. A kitapadó sejtek 5-10 perccel a minta adása után felszakadoztak a Petri csésze aljáról, elvesztették adheráló képességüket (**25.A** ábra), a sejtek összezsugorodnak, a sejtmagok megduzzadnak. A sejtlizátum esetében néhány óra alatt a sejtek elpusztulnak, a lizátum hatása dóziszfüggő (**25.C** ábra). A kontroll mintákban (médium, LBSS) nem látszik semmiféle változás, a sejtek tökéletesen életképesek (**25.B, C** ábra), kitapadnak a szilárd felszínre.

Az ultrahanggal készített sejtlizátumokat párhuzamosan különbözően kezeltük, hogy a citotoxikus anyag kémiai természetéhez közelebb kerüljünk. A lizátumokat denaturáltuk 100 C°-on, tripszinnel és proteináz K-val emésztettük. A kezelések után a targetsejteket a mintákkal inkubáltuk a megfelelő kontrollok kiegészítésével. A hődenaturálás és a proteináz K emésztés hatékonyan meggátolta a sejtlizátum citotoxikus aktivitását. Érdekes módon a tripszines emésztés nem gátolta meg a hatást. A targetsejtek elpusztultak, az eredmény korrelált a pozitív kontrollnál (natív coelomasejt lizátum) tapasztalttal (**25.D** ábra).

Izolált coelomasejteket tenyésztettünk egy éjszakán át emlős médiumban, majd a sejteket lecentrifugálva a felülúszót a targetsejtekhez adtuk. A sejtpusztulás időtartama a sejtlizátumokhoz hasonlítva elnyújtottabb, hosszabb volt.

A felülúszós vizsgálatoknál tíz órás inkubációs időtartam alatt lecsökkent az élősejt szám (HeLa) (**25.E** ábra), hasonló tendenciát mutatott a Hep-2 sejtvonalon történt vizsgálat, bár kisebb mértékű volt a sejtpusztulás. Az MDCK sejtvonalon nem tapasztaltunk hasonló citotoxikus hatást. A kontroll sejtlizátumok (J774, H2kvJUN1, Jurkat) nem okoztak sejtpusztulást.



25. ábra. Coelomasejtek citotoxikus aktivitása. Targetsejtekhez coelomasejtlizátumot (CCL) adva, mintegy 5-10 percen belül a sejtek elvesztik kitapadási képességüket, leválnak a szilárd felszínről (A), a kontrollsejtek növekedése normális (B). Fotometriásan mérve jól követhető, hogy a töményebb sejtlizátummal (CCL 1/10) kezelt sejtek 75%-a 10-12 óra alatt elpusztul, míg a pufferrel kezelt sejtek életképesek (LBSS) a médiumos kontrollhoz (CTRL) viszonyítva (C). A sejtlizátumokat megkezelve (a proteináz K emésztés, hődenaturálás hatására) a minta elveszti a toxikus képességét, míg tripszines emésztésnél a pozitív kontrollnak (Ctrl) megfelelő a toxikus hatás (D). A coelomasejtek felülúszóját (SN) használva mintaként, szintén tapasztaltunk dóziszfüggően sejtpusztulást HeLa targetsejtekkel használva (E). (n: 3, *P<0,05, **P<0,005). Méretarány: 20µm.

8. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A gerinctelenekben lezajló immunológiai folyamatokban alapvető szerepet töltenek be az immunsejtek (hemociták, coelomasejtek) különböző funkciójú csoportjai. A védekezési folyamatokban játszott szerepük és a hematopoesisban résztvevő faktorok hasonlósága alapján párhuzamot lehet vonni a gerinctelen immunsejtek és a gerinces fehérvérsejtek között (Lavine és Strand 2002; Mandal és mtsai 2004).

A legtöbb mai irodalomban gerinctelen modellállatként az ecetmuslicát (Meister és mtsai 1997; Elrod-Erickson és mtsai 2000), illetve legújabban a *C. elegans*-t (Millet és Ewbank 2004) használják a természetes immunitás vizsgálatára. Mindkettő genetikailag jól feltérképezett modellállat, ennél jóval kevésbé ismertek a puhatestű, rák és gyűrűsféreg fajok. Az előző két csoportot elsősorban a humán táplálkozásban betöltött fontos szerepük miatt vizsgálják (Cerenius és mtsai 2003; Bacheré és mtsai 1995), míg a gyűrűsféreg immunitása a környezeti toxikológiai vizsgálatok során került előtérbe (Cooper és Roch 2003).

A gyűrűsféreg fajok közül a giliszták immunitása a legismertebb, a transzplantációs vizsgálatok (bőrizomtömlő átültetése) során világossá vált, hogy az állatok képesek elkülöníteni, felismerni a „saját” struktúrákat. A folyamatban szerepet játszanak a testüregben áramló coelomasejtek (Cooper 1968; Cooper 1969; Cooper 1975). A giliszta immunsejtek karakterizálása először morfológiai és citokémiai kritériumok alapján történt meg (Stein és Cooper 1977; 1978). A csoportosítás módosult emlős antigénekre előállított ellenanyagokkal mutatott keresztreakciók alapján (Roch és mtsai 1983; Roch és Cooper 1983), kiegészítve funkcionális különbségekkel is (Cossarizza és mtsai 1996, Cooper mtsai 1999).

A legutóbbi csoportosítás szerint két sejttípust különítettek el, melyek funkcionalitás és sejtfelszíni topológia alapján is különböznek: a kisebb sejtpopuláció membránfehérjéi festődést mutatnak: β_2 -microglobulin, CD45RA, CD45RO, CD54, CD11a, CDw49b, CD54, Thy-1 (CD90) specifikus ellenanyagokkal (Cossarizza és mtsai, 1996; Cooper és mtsai, 1999). Ezek a sejtek részt vesznek a sejtes citotoxicitásban. A nagyobb sejtek csak fagocitálnak, nem mutatnak festődést a felsorolt ellenanyagokkal.

Saját áramlási citometriás méréseinkben három populációt azonosítottunk (R1, R2, R3), melyek közül kettő (R1, R2) mutatott reakciót sejtfelszíni és intracelluláris emlős

antigénekre specifikus ellenanyagokkal. A populációk közül az R1 és R2 populáció festődött, az R3 negatív volt (**6. táblázat**).

Az egyik legérdekesebb a monoklonális ellenanyagokkal kapott reakciók közül a TNF- α kimutatása, számos adat mutatja azt, hogy citokin-szerű molekulák (gyulladásos citokinek) már a gerinctelen szervezetekben is megfigyelhetők (Ottaviani és Franceschi 1991).

Antitestek	R1	R2	R3
a-Thy-1, a-CD24, a-TNF- α , a-Cu/ZnSOD	+	+	-
a-TSH- α , a-TSH- β , a-TSH-dimer	+	+	-
a-CD3, a-CD4, a-CD8, a-CD13	-	-	-
a-CD45, a-CD45RA, a-CD69	-	-	-

6. táblázat. Áramlási citometriai méréseink során használt ellenanyagok táblázata, feltüntetve az ellenanyagok reakcióit a különböző sejtcsoportokkal.

A TNF- α esetében a molekuláris azonosság még nem ismert, bár egyre több adat bizonyítja azt, hogy az immunsejtek kommunikációjában szerepet játszó szöveti peptidek igen konzerváltak (Hughes és mtsai 1990). A gerinctelen állatokban előforduló citokinekről szóló adatok elsősorban immunológiai és funkcionális vizsgálatok eredményeire szorítkoznak (Beck 1998; Beschin és mtsai 1999, Beschin és mtsai 2001; Ottaviani és mtsai 1995; Ottaviani és Franceschi 1997, Tettamanti és mtsai 2003).

A sejtfelszíni molekulákra specifikus antitestek közül festődést mutatott az a-CD90 (Thy-1). Ez az adat korrelál egy másik munkacsoport eredményeivel (Cossarizza és mtsai 1996), bár más közös sejtfelszíni marker festődést nem tapasztaltunk. A Thy-1 immunreaktivitást már más gerinctelen fajok immunsejtjeiről is leírták (Mansour és Cooper 1984, Mansour és mtsai 1985).

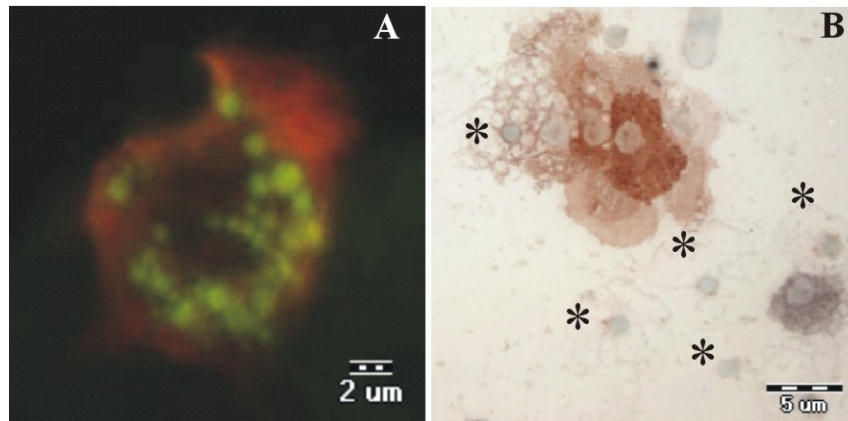
A gerinctelen immunsejtek vizsgálata feltételezi (hasonlóan a gerinces fehérvérsejtékéhez) a precíz sejt-specifikus molekulák azonosítását. Ez elképzelhetetlen specifikus monoklonális ellenanyagok használata nélkül. Jelenleg csak néhány modellállatra, fajra korlátozódik a létrehozott monoklonális ellenanyagok „tára”.

Leggyakoribb a különböző rovarfajok hemocitáira előállított monoklonális ellenanyag készlet (Chain és mtsai 1992; Gardiner és Strand 1999; Kurucz és mtsai 2003; Pech és Strand 1996; Strand és Johnson 1996; Willott és mtsai 1994), bár az első gerinctelen immunsejtekre specifikus ellenanyag termelő hibridómákat puhatestű immunsejtekre állították elő (Reinisch és mtsai 1981, Yoshino és Granath 1983).

A coelomasejtek pontos karakterizálására állítottunk elő specifikus monoklonális ellenanyagokat (a-EFCC klónok) hibridóma technikával. Citokémiai és hisztokémiai festődések alapján négy csoportra osztottuk az ellenanyag-családot. Az EFCC1 antigén egy közös molekulának bizonyult, amely nemcsak a coelomasejtekben, de más eredetű szövetekben (idegszövet, izom, metanephridium) is jelen van. Az EFCC1/1 jelű antigén a coelomasejtek membránjában expresszálódik, míg a többi EFCC1 antigén elsősorban intracellulárisan fordul elő. Immunprecipitáció utáni Western blotban három bandet (200, 149, 100 kDa) adott az a-EFCC1 ellenanyag.

A másik három ellenanyag csoport más-más sejtcsoportot jellemez. A chlorogogénsejtekre (R3) jellemző az EFCC2 antigén, mely citoplazmatikus expressziójú. Az a-EFCC2 ellenanyag szövettanban is egyértelműen a középbéli szakaszon, a bél felszínén jelen lévő chlorogogén szövetet festi meg. A másik két ellenanyag az effektor funkciókban szerepet játszó sejtcsoportokat (hialin [R2] és granuláris [R1] amöbocita) jelöli meg.

A szövettani festések során egyértelművé vált, hogy az ellenanyagok (a-EFCC2, 3, 4 ellenanyaggal) elsősorban mezodermális eredetű antigéneket ismernek fel. Korábbi vizsgálatokban (transzplantációs kísérletek, mitogének bejuttatása) már feltételezték, hogy a coelomasejtek a mezodermából eredeztethetőek. A saját eredményeinkkel megerősítve, azt feltételezzük, hogy a gilisztákban lévő immunsejtek hasonlóan más gerinctelen immunsejtekhez (Mori 1979; Tepass és mtsai 1994; Mandal és mtsai 2004), középső csíralemez eredetűek.



26. ábra. A coelomasejtek kettős immunfluoreszcenciái és immuncitokémiai festése. A kis chloragógénsejt egyértelműen festődik az EFCC1 sejt felszíni antigént jelölő ellenanyaggal (vörös), az a-EFCC2 intracelluláris granulomokat (zöld) fest (A). A kettős immunhisztokémiai képen összetapadó sejteket fest az a-EFCC3 ellenanyag (vörös), míg az EFCC4 kisebb granuláris sejtekben van jelen (kék) (B). Körülöttük négy negatív sejt is látható (csillag). A magfestés metilzölddel történt. Méretarány: 2 μ m (A), 5 μ m (B).

A coelomasejtek nem csak fenotípusban, funkcionálisan is különböznek egymástól. A celluláris védekezés vizsgálatára, FITC konjugált Gram+ (*S. aureus*) és Gram- (*E. coli*) baktériumokat fagocitáltattunk a giliszta immunsejtekkel.

Mind G+, mind G- baktériumokat fagocitálnak a sejtek, vizsgálatainkban lehetővé vált az ellenanyagok segítségével a sejtcsoportok különbségeinek nyomon követése a fagocitózis során. A bazofil (hialin) amöbociták tűntek a leghatékonyabb fagocita sejteknek. A patogéneket felismerő pontos mechanizmus egyelőre nem ismert, de feltehetőleg ebben a gerinctelenekből már leírt mintázatfelismerő receptorok játszanak szerepet, melyek beindítják a patogéneket eltakarító pro-fenoloxidáz kaszkádot. Az elmúlt években izoláltak *Eisenia fetida*-ból egy citolitikus faktort (CCF), amely képes a lipopoliszacharidok és peptidoglikánok megkötésére is, ebből következően mind Gram- mind Gram+ baktériumok, sőt gombák felismerésére is alkalmas. Ez lehet az a faktor, amely elindítja a gilisztákban a fenol oxidáz metabolitok aktiválódását (Beschlin és mtsai 1998).

A fluoreszcens és konfokális mikroszkópos vizsgálatok eredményeként elmondhatjuk, hogy a hialin sejtek (R2) fagocitózisra képesek, a granuláris sejtek (R1) inkább megkötik a baktériumot, kevésbé fagocitálnak, míg az eleociták (R3) mindvégig inaktívak maradtak.

Adataink alátámasztják azt a megfigyelést, hogy a bazofil, hialin sejtek a legaktívabb fagociták, míg a többi sejtcsoport - más funkciók mellett - megköti a baktériumokat, kivonja a coelomafolyadék keringéséből.

Nagyobb objektumokat (protozoonok, férgek) az immunsejtek nem képesek fagocitózissal eltakarítani, ezeket enkapszulációval semlegesítik. A mi kísérleti rendszerünkben Sephadex gyöngyöket (30-90 μm) használtunk targetként, a coelomasejtek rátapadnak a gyöngyökre. Hosszabb inkubáció után (24 óra) nagyobb sejttömeg jön létre a gyöngyök körül. Immunfestésekkel jól látható, hogy az effektor immunsejtek (hialin és granuláris sejtek) aktívan részt vesznek a folyamatban. Tapasztalatunk az volt, hogy a EFCC4 antigénnel fémjelzett sejtek (granuláris sejtek) kevésbé izolálják a targeteket, inkább csak rátapadnak bizonyos helyeken a gyöngyökre. Az eleociták a patogének elleni védekezésben feltehetőleg különböző antimikrobiális molekulák termelésével vesznek részt, ennek bizonyítására a sejtekből készített lizátum hatását kísértük figyelemmel prokarióta és eukarióta sejteken. Nem tudjuk egyelőre azt, hogy melyik sejttípus képes az idegen felismerésére, feltételezzük azt, hogy mindhárom sejttípus képes erre. Feltehető, hogy a sejtek a target felismerése után, granulumaik kiürítésével odavonzzák a többi sejtet, melyek teljesen izolálják, elzárják a környezetből az esetleges parazitát, patogént. Polychaeta fajokon (*Nereis viriens*, *N. diversicolor*) végzett kísérletek azt mutatták, hogy az egyik granulocita típus indítja be az enkapszulációs folyamatot a többi sejttípus, pedig egymással kooperálva képes a behatoló parazitát megsemmisíteni. Hasonló mechanizmust írtak le *Pseudplusia includens* lepke fajból is (Porchet-Henneré 1990, Pech és Strand 1996). Ez ellentétes azokkal a korábbi elképzelésekkel, mely szerint gerinctelenekben nincs szerepmegoszlás, kommunikáció az egyes effektor sejtcsoportok között, ez csak a gerinces fehérvérsejtekre jellemző.

Kifejlesztett ellenanyagainkra jellemző az, hogy elsősorban intracelluláris antigéneket ismernek fel, ez igaz más fajokra előállított monoklonális ellenanyagokra is (Yoshino és Granath 1983, Dyrinda és Mtsai 1997, Gardiner és Strand 1999).

Az EFCC1 antigént (közös szöveti molekula) felismerő ellenanyag epitópját egy 9 aminosavnyi random peptid szakaszt hordozó filamentózus fág (fág-display rendszer) segítségével határoztuk meg. A szekvenálás során kapott 6 aminosavnyi szakasz (Ser-Leu-Ser-Asp-Ser-Cys) adatbázisokban több érdekes találatot adott (patkány membrán

kofaktor protein, patkány szaglőreceptor, humán arginin aminopeptidáz), de a pontos a fehérje meghatározásra további vizsgálatok szükségesek. További érdekesség, hogy a létrehozott *Eisenia fetida* giliszta specifikus ellenanyagokat tesztelve más gerinctelen (*D. melanogaster*, *P. corneus*) ill. gerinces fajokon csak az a-EFCC1 klón mutatott reakciót. Kizárólag egy *P. corneus* csigafaj sejtjeit festette meg az ellenanyag. Ez az eredmény egy közelebbi fejlődéstani rokonságot is feltételezhet. Az összajúak állatok két csoportba oszthatóak: Lophotrochozoa és Ecdysozoa csoportra. Az Ecdysozoa csoportba sorolhatók a rovarok és hengeresférgek, míg a Lophotrochozoa csoportba a hasonló testtervvel rendelkező gyűrűsférgek, puhatestűek tartoznak. Monoklonális ellenanyagok keresztreakciós mintázatát már más gerinctelen fajok sejtjein, szövetein is kimutattak (Willott és mtsai 1995, Van der Braak és mtsai 2001) ezzel alátámasztva a feltételezett antigenitásbeli rokonságot.

A sejtek lizoszomális enzim különbségeire is kíváncsiak voltunk a sejtcsoportokon belül. A hialinsejtekben találtuk a legmagasabb savi foszfatáz enzimaktivitást ill. enzimtartalmat. Savi foszfatáz specifikus ellenanyaggal Western-blotban egy 39kDa körüli molekulát azonosítottunk, hasonló nagyságú savi foszfatázt már egy másik gilisztafajban is találtak (Stubberud és mtsai 2000). Az anti-humán savi foszfatáz ellenanyag segítségével tudtuk detektálni, hogy a fagocitózis után lecsökkent az enzimtartalom a sejtekben míg megnőtt extracellulárisan. Irodalmi adatokkal karöltve ez arra enged következtetni, hogy az enzim részt vesz extracellulárisan az idegen struktúrák, szövetek, patogének, paraziták, lebontásában, eltakarításában (Cheng és Butler 1979; Cheng és Mohandas 1985; Cheng és Dougherty 1989; Marks és mtsai 1981).

E vizsgálatok aktualitását az is biztosítja, hogy emlős modellrendszerekben is sikerült bizonyítani a professzionális antigénprezentáló sejtek (APC) lizoszomális savi foszfatáz jelentőségét immunológia folyamatokban (Bune és mtsai 2001; Raisanen és mtsai 2001).

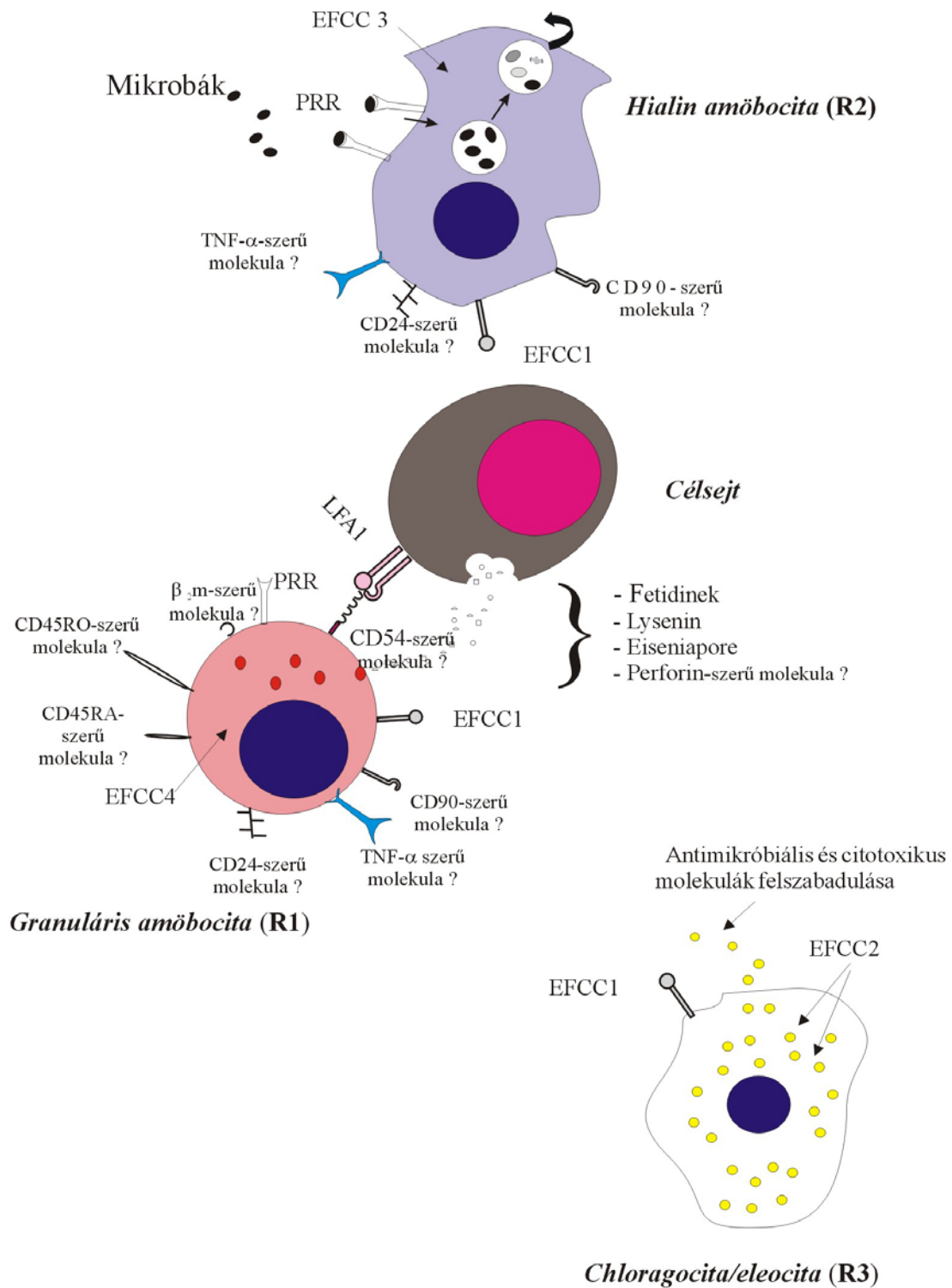
Sok adat ismert arról, hogy a giliszták coelomafolyadék különböző antimikrobiális és citotoxikus anyagokat tartalmaz, azonban a pontos sejtes eredet kevésbé ismert. A coelomasejtek szerepe a bioaktív anyagok termelésében részleteiben még nem tisztázott. Antimikrobiális és citotoxicitási assay-eket alkalmaztunk ennek árnyalására. A toxicitási tesztekben emlős sejtvonalakat (HEp-2, HeLa, HepG2) használtunk targetként, melyeket

coelomafolyadékkal, coelomasejt lizátummal, rövid távú coelomasejt tenyészetek felülúszójával kezeltünk. Mindegyik esetben különböző mértékű sejtpusztulást tapasztaltunk.

A coelomafolyadékban található lisenin *in vitro*, *in vivo* kísérletekben is bizonyítottan toxikus volt gerincesekre (Kobayashi és mtsai 2001). A molekula a sejtmembránban található szfingomielinen keresztül fejt ki hatását. A lisenin chloragogénsejtekben termelődik (Ohta és mtsai 2000), vizsgálatainkban arra a következtetésre jutottunk, hogy a coelomasejtekből citotoxikus molekulák szabadulnak fel. Az anyag fehérjetermészetű: denaturálható volt, a tripszines emésztés nem gátolta a citotoxikus aktivitást. A citotoxikus aktivitás elsősorban a chloragogén sejtek tulajdonsága. Újabb vizsgálatokban sikerült tisztázni a citotoxikus molekulák (lisenin, fetidin, eiseniapore, H1, H2, H3 hemolizinek) főbb tulajdonságait, kapcsolódási pontokat (Cooper és mtsai 2002, Koenig és mtsai 2003), de még árnyaltabbá válik a kép: perforin szerű molekulákat is kimutattak coelomasejtekből (Kauschke és mtsai 2001, Komiyama és mtsai 2002).

Összegzésül elmondható az, hogy a giliszta celluláris védekezésében résztvevő coelomasejtek antigenitásban és funkcionálisan is különböző csoportokat alkotnak. Sejtfelszínen és intracellulárisan is hordoznak olyan molekulákat melyek konzervált, gerincesek molekuláira hasonlító antigéndeterminánsokat hordoznak. Ezen molekulák funkciója gilisztákban egyelőre ismeretlen. Ismeretese molekulák (pl. defenzin), melyek az egész élővilágban megtalálhatóak és hasonló funkcióval bírnak. A giliszta immunitásának kutatását folytatva remélhetőleg új ismeretek birtokába jutunk, melyek gazdagítják a természetes immunitás evolúciójáról eddig felhalmozott tudásunkat.

Az irodalmi adatokat és saját eredményeinket felhasználva az alábbi, hipotetikus sémát állíthatjuk fel a földgiliszta coelomasejtek védekező funkcióiról.



27. ábra. A coelomasejtek védekezési reakciókban betöltött szerepének hipotetikus sémája. Hialin és granuláris amöbociták, chloragogéncsejtek és szerepük az immunválaszban. A különböző sejtcsoportok karakterizálása monoklonális ellenanyagok segítségével - sejt felszíni és intracelluláris markerek - történt. A citotoxikus válaszban feltételeztek a különböző toxikus molekulák sejtéből való felszabadulását (fetidin, lysenin, Eiseniapore, H₁, H₂, H₃ lizinek).

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Németh Péternek a kutatói, oktatói előrehaladásomban nyújtott folyamatos fáradhatatlan támogatását. Témavezetőmként útmutatásai, hasznos ötletei, biztatása segített tanulmányaim, munkám során.

Prof. Dr. Edwin L. Cooper-nek (David Geffen School of Medicine at UCLA, USA) – kooperációs partnerünknek - a kísérleti eredmények értelmezése és a publikációk elkészítése során adott hasznos tanácsaiért jár köszönet.

Dr. Berki Tímeának, Dr. Balogh Péternek, Dr. Kvell Krisztiánnak a kéziratok kritikus átolvasásáért. A technikai segítségért Pápa Lászlónénak. Dr. Pálinkás László az áramlási citometriában, Dr. Czömpöly Tamás a molekuláris biológiai munkákban nyújtott nagy segítséget. Valamint az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden dolgozójának: Schön Jánosnénak, Dr. Melczer Attilánénak, Boda Sándornénak, Nemes Évának, Várda Bogátának köszönöm a segítségét.

Köszönetet mondok Rácz Boglárka, Kiss Judit, Csöngői Veronika tudományos diákköröseimnek, akik a kísérleti munkákban segítettek.

Dr. Molnár László (Általános Állattani és Neurobiológiai Tanszék, TTK) a lizoszomális enzim vizsgálatokban, a kísérleti állatok egy részének biztosításában és Dr. Kocsis Béla (Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet, ÁOK) a citotoxicitási munkák során nyújtott segítséget és adott hasznos ötleteket.

Dr. Rékási Zoltán és Prof. Dr. Csernus Valér (Humán Anatómiai Intézet, ÁOK) szintén a publikációk során nyújtott segítséget. A random peptid könyvárat hordozó filamentózus fág Dr. Allesandra Luzzago (IRBM, Roma) nagylelkű ajándéka.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- ALONSO-BEDATE M., SEQUEROS E. (1983) Neurosecretory phenomena in the cerebral ganglia of clitellated *Allolobophora molleri* (Annelida: Oligochaeta). Acta Embryol. Morphol. Exp. 4: 93-103.
- BACHERÉ E., MIHALEH E., NOËL D., BOULO V., MORVAN A., RODRIGUEZ J. (1995) Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. Aquacult. 132: 17-32.
- BAILEY S., MILLER B.J., COOPER E.L. (1971) Transplantation immunity in annelids-II: Adoptive transfer of the xenograft reaction. Immunology 21: 81-86.
- BECK G., CARDINATE S., WANG L., REINER M., SUGUMARAN M. (1996) Characterization of a defense complex consisting of interleukin 1 and phenol oxidase from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Biol. Chem. 271: 11035-11038.
- BECK G. (1998) Macrokinins: invertebrate cytokine-like molecules? Frontiers in Bioscience 3: 559-569.
- BESCHIN A., BILEJ M., HANSENS F., RAYMAKERS J., VAN DYCK E., DREVETS H., BRYLS L., GOMEZ J., DE BAETSELIER P., TIMMERMANS M. (1998) Identification and cloning of a glucan- and LPS-binding protein from *Eisenia fetida* earthworms involved in the activation of prophenoloxidase cascade. J. Biol. Chem. 273: 24948-24954.
- BESCHIN A., BILEJ M., BRYLS L., TORREELE E., LUCAS R., MAGEZ S., DE BAETSELIER P. (1999) Convergent evolution of cytokines. Nature 400: 627-628.
- BESCHIN A., BILEJ M., TORREELE E., DE BAETSELIER P. (2001) On the existence of cytokines in invertebrates Cell. Mol. Life Sci. 58: 801-814.
- BILEJ M., TUČKOVÁ L., REJNEK J., VĚTVIČKA V. (1990) In vitro antigen binding properties of coelomocytes of *Eisenia foetida* (Annelida). Immunol. Lett. 26: 183-188.
- BILEJ M., ŠIMA P., SLÍPKA J. (1992) Repeated antigenic challenge induces earthworm coelomocyte proliferation. Immunol. Lett. 32: 181-184.
- BILEJ M., TUČKOVÁ L., REJNEK J. (1993) The fate of protein antigen in earthworms: study in vitro. Immunol. Lett. 35: 1-6.
- BILEJ M., BRYLS 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., ROSSMANN P., ŠINKORA M., HANUŠOVÁ R., BESCHIN A., RAES G., DE BAETSELIER P. (1998) Cellular expression of the cytolytic factor in earthworms *Eisenia fetida*. *Immunol. Lett.* 60: 23-29.
- BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- BULET P., HETRU C., DIMARCQ J-L., HOFFMANN J.A. (1999) Antimicrobial peptides in insects: Structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 329-344.
- BUNE A.J., HAYMAN A.R., EVANS MJ, COX T.M. (2001) Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disordered macrophage inflammatory responses and reduced clearance of the pathogen *Staphylococcus aureus*. *Immunol.* 102: 103-113.
- BURKE J.M. (1974a) Wound healing in *Eisenia fetida* (Oligochaeta). I. Histology and ³H-thymidine radioautography of the epidermis. *J. Exp. Zool.* 188: 49-63.
- BURKE J.M. (1974b) Wound healing in *Eisenia fetida* (Oligochaeta). II. A fine structural study of the role of the epidermis. *Cell Tissue Res.* 154: 61-82.
- BURKE J.M. (1974c) Wound healing in *Eisenia fetida* (Oligochaeta). III. A fine structural study of the role of the non-epidermal tissues. *Cell Tissue Res.* 154: 83-112.
- CAMERON G.R. (1932) Inflammation in earthworms. *J. Pathol.* 35: 933-972.
- CERENIUS L., BANGYEKHUN E., KEYSER P., SÖDERHÄLL I., SÖDERHÄLL K. (2003) Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cell. Microbiol.* 5: 353-7.
- CHAIN B.M., LEYSHON-SØRLAND K., SIVA-JOTHY M.T. (1992) Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analysed using monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* 103: 1261-1267.
- CHAPRON C. (1970a) Etude histologique, infrastructurale et experimentale de la regeneration cephalique chez le lombriciens *Eisenia fetida*. *Ann. Embr. Morphol.* 3: 235-239.
- CHAPRON C. (1970b) Régénération céphalique chez le lombricien *Eisenia fetida unicolor*: structure, origine et role du bouchon cicatriciel. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 111: 217-227.
- CHENG T.C., BUTLER M.S. (1979) Experimentally induced elevations in acid phosphatase activity in hemolymph of *Biomphalaria glabrata*. *J. Invertebr. Pathol.* 34: 119-124.
- CHENG T.C., DOUGHERTY W.J. (1989) Ultrastructurally evidence for the destruction of *Schistosoma mansoni* sporocysts associated with elevated lysosomal enzyme level in *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 75: 928-941.

- CHENG T.C., MOHANDAS A. (1985) Effect of high dosages of bacterial challenge on acid phosphatase release from *Biomphalaria glabrata* haemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 45: 236-241.
- CHO H.J., PARK C.B., YOON Y.G., KIM C.S. (1998) Lumbricin I, a novel proline-rich antibacterial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochem. Biophys. Acta* 1408: 67-76.
- COOPER E.L. (1968) Transplantation immunity in annelids-I. rejection of xenografts exchanged between *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida*. *Transplantation* 6: 322-337.
- COOPER E.L. (1969) Chronic allograft rejection in *Lumbricus terrestris*. *J. Exp. Zool.* 171: 69-73.
- COOPER E.L., RUBILOTTA L.M. (1969) Allograft rejection in *Eisenia fetida*. *Transplantation* 8: 220-223.
- COOPER E.L. (1975) Characteristics of cell-mediated immunity and memory in Annelids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 64: 127-136.
- COOPER E.L., STEIN E.A. (1981) Oligochaetas In: Ratcliffe N.A., Rowley A.F. (eds): *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press. San Diego. pp. 75-140.
- COOPER E.L., ROCH P. (1984) Earthworm leukocyte interactions during early stages of graft rejection. *J. Exp. Zool.* 232: 67-72.
- COOPER E.L., ROCH P. (1994) Immunological profile of annelids: transplantation immunity, in V. Větvicka, P. Šima, E. L. Cooper, M. Bilej, P. Roch (ed.): *Immunology of Annelids*. CRC Press, Boca Raton. pp. 201-243.
- COOPER E.L. (1996) Earthworm immunity. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 16: 10-45.
- COOPER E.L., COSSARIZZA A., KAUSCHKE E., FRANCESCHI C. (1999) Cell adhesion and the immune system: a case study using earthworms. *Microsc. Res. Tech.* 44: 237-53.
- COOPER E.L. (2001) Immune response: evolution. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. pp.1-8.
- COOPER E. L., KAUSCHKE E., COSSARIZZA A. (2002) Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *BioEssays* 24: 319-333.
- COOPER EL, ROCH P. (2003) Earthworm immunity: a model of immune competence. *Pedobiologia* 47: 676-688.
- COSSARIZZA A., COOPER E.L., SUZUKI M.M., SALVIOLI S., CAPRI M., GRI G., QUAGLIANO D., FRANCESCHI F. (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.

- COUILLAULT C., PUJOL N., REBOUL J., SABATIER L., GUICHOU J.F., KOHARA Y. EWBANK J.J. (2004) TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat. Immunol.* 5: 488-494.
- ÇOTUK A., DALES R.P. (1984) Lysozyme activity in the coelomic fluid and coelomocytes of the earthworm *Eisenia foetida* Sav., in relation to bacterial infection. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A: 469-474.
- CZÖMPÖLY T., LÁBADI Á., BALÁZS M., NÉMETH P., BALOGH P. (2003) Use of cyclic peptide phage display library for the identification of a CD45RC epitope expressed on murine B cells and their precursors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 791-6.
- DALES R.P., KALAÇ Y. (1992) Phagocytic defense by the earthworm against certain pathogenic bacteria. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A: 487-490.
- DAVOLI C., MARCONI E., SERAFINO A., IANNONI C., MARCHEGGIANO E., RAVAGNAN G. (2002) Expression of nerve growth factor-like polypeptides and immunoreactivity related to the two types of neurotrophin receptors in earthworm tissues. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 527-539.
- DE EGUILEOR M., GRIMALDI A., TETTAMANTI G., VALVASSORI R., COOPER E.L., LANZAVECCHIA G. (2000) Lipopolysaccharide-dependent induction of leech leukocytes that cross-react with vertebrate cellular differentiation markers. *Tissue Cell* 32: 437-445.
- DE EGUILEOR M., GRIMALDI A., TETTAMANTI G., VALVASSORI R., COOPER E.L., LANZAVECCHIA G. 2000b. Different types of response to foreign antigens by leech leukocytes. *Tissue Cell* 32: 40-48.
- DIOPENÉ J., DUFOUR M., POIRIER G.G., NADEAU D. (1997) Extrusion of earthworm coelomocytes: comparison of the cell populations recovered from the species *Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida* and *Octolasion tyrtaeum*. *Lab. Animals* 31: 326-336.
- DREVETS D.A., CAMPBELL P.A. (1991) Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *J. Immunol. Methods* 142: 31-38.
- DYRYNDA E.A., PIPE R.K., RATCLIFFE N.A. (1997) Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res.* 289: 527-536.
- ELROD-ERICKSON M., MISHRA S., SCHNEIDER D. (2000) Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr. Biology* 10: 781-784.

- EUE I., KAUSCHKE E., MOHRIG W., COOPER E.L (1998) Isolation and characterization of earthworm haemolysins and agglutinins. *Dev. Comp. Immunol.* 22: 13-25.
- FELICI F., LUZZAGO A., MONACI P., NICOSIA A., SOLLAZZO M., TRABONI C. (1995) Peptide and protein display on the surface of filamentous bacteriophage. *Annu. Rev. Biotechnol.* 1: 149-183.
- FISCHER E. (1978) DOPA peroxidase activity in the chloragogen cells of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Acta Histochem.* 63: 210-223.
- FRANCESCHI C., COSSARIZZA A., MONTI D., OTTAVIANI E. (1991) Cytotoxicity and immunocytes markers in cells from the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda pulmonata): implications for the evolution of natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 21: 489-493.
- GARDINER E.M., STRAND M.R. (1999) Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. *J. Insect Physiol.* 45: 113-126.
- HERLAN-MEEWIS H.(1965) Regeneration in annelids, pp. 155-215 in M. Abercrombie, J. Brachet (ed.): *Advances in Morphogenesis*. Vol. 4. Academic Press, New York 1965
- HIRIGOYENBERRY F., LASSALLE F., LASSÈGUES M. (1990) Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: transcription and translation regulation of lysozyme and proteins evidenced after bacterial infestation. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 71-75.
- HIRIGOYENBERRY F., LASSÈGUES M., ROCH P. (1992) Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: immunological study of the two major antibacterial proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 69-74.
- HORNG T., MEDZHITOV R. (2001) Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 12654-12658.
- HOSTETTER R.K., COOPER E.L. (1973) Cellular anamnesis in earthworms. *Cell. Immunol.* 9: 384-392.
- HUBL H. (1956) Über die Beziehungen der Neurosekretion zum Regenerations geschehen bei Lumbriciden nebst Beschreibung eines neuartigen neurosekretorischen Zelltypen in Unterschlundganglion. *Arch. Entwicklunsmech. Organism.* 149: 73-87.
- HUGHES T.K., SMITH E., CHIN R., CADET P., SINISTERRA J., LEUNG M.K., SHIPP M.A., SCHARRE B., STEFANO G.B. (1990) Interaction of immunoreactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 4426-4429.
- JAMIESON B.G.M. (1981a) Coelomocytes. In: Jamieson BGM (ed) *The ultrastructure of the oligochaete*. Academic Press, New York pp.62-95.

- JAMIESON B.G.M. (1981b) Chloragocytes. In: Jamieson BGM (ed) The ultrastructure of the oligochaete. Academic Press, New York pp. 96-118.
- JAROSZ J., GLINSKI Z. (1997) Earthworm immune responses. *Fol. Biol. (Krakow)* 45: 1-9.
- JOHANSSON M.W., SÖDERHÄLL K. (1996) The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates. *Progr. Mol. Subcell. Biol.* 15: 46-66.
- KAUSCHKE E., MOHRIG W. (1987a) Comparative analysis of haemolytic and hemagglutinating activities in the coelomic fluid of *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* (Annelida, Lumbricidae). *Dev. Comp. Immunol.* 11: 331-341.
- KAUSCHKE E., MOHRIG W. (1987b) Cytotoxic activity in the coelomic fluid of the annelid *Eisenia foetida* Sav. *J. Comp. Physiol.* 157: 77-83.
- KAUSCHKE E., KOMIYAMA K., MORO I., EUE I., KÖNIG S., COOPER E.L. (2001) Evidence for perforin-like activity associated with earthworm leukocytes. *Zoology* 32: 13-24.
- KEILIN N. D. (1925) Paracitic autotomy of the host as a mode of liberation of coelomic parasites from the body of the earthworm. *Parasitology* 17: 170-172.
- KOBAYASHI H., OHTOMI M., SEKIZAWA Y., OHTA, N. (2001) Toxicity of coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* to vertebrates but not invertebrates: probable role of sphingomyelin. *Comp. Biochem. Physiol.* 128C: 401-411.
- KOENIG S., WAGNER F., KAUSCHKE E., PETER-KATALINIC J., COOPER E.L., EUE I. (2003) Mass spectrometric analyses of CL₃₉, CL₄₁ and H₁, H₂, H₃ confirm identity with fetidin and lysenin produced by earthworm leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 513-520.
- KOMIYAMA K., KAUSCHKE E., COOPER E.L. (2002) Evidence for a perforin-like cell-mediated cytotoxicity by earthworm coelomocytes. In E.L. Cooper, M. Bilej, A. Beschin (Eds), A new model for analyzing antimicrobial peptides with biomedical applications, IOS Press, Amsterdam pp. 177-182.
- KÖHLER G., MILSTEIN C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- KURTZ J., FRANZ K. (2003) Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425: 37-38.
- KURUCZ E., ZETTERVALL C.J., SINKA R., VILMOS P., PIVARCSI A., EKENGREN S., HEGEDUS Z., ANDO I., HULTMARK D. (2003) Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2622-2627.

- KYRIAKIDES T.R., MCKILLIP J.L., SPENCE K.D. (1995) Biochemical characterization, developmental expression, and induction of the immune protein scolexin from *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 29: 269-280.
- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- LANGE S., NÜSSLER F., KAUSCHKE E., LUTSCH G., COOPER E.L., HERRMANN A. (1997) Interaction of earthworm haemolysin with lipid membranes requires sphingolipids. J. Biol. Chem. 272: 20884-20892.
- LANGE S., KAUSCHKE E., MOHRIG W., COOPER E.L. (1999) Biochemical characteristics of eiseniapore, a pore-forming protein in the coelomic fluid of earthworms. Eur. J. Biochem. 262: 547-556.
- LASSÈGUES M., MILOCHAU A., DOIGNON F., DU PASQUIER L., VALEMBOSIS 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.
- LAULAN A., LESTAGE J., BOUC A. M., CHATEAUREYNAUD-DUPRAT P. (1988) The phagocytotic activity of *Lumbricus terrestris* leukocytes is enhanced by the vertebrate opsonins: IgG and complement C3b fragment. Dev. Comp. Immunol. 12: 269-277.
- LAVINE M.D., STRAND M.R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32: 1295-1309.
- LIEBMANN E. (1926) Untersuchungen über das Chloragogen der Lumbriciden. Zool. Anz. 69: 65.
- LIEBMANN E. (1942) The role of chloragogue in regeneration of *Eisenia foetida* (Sav.). J. Morphol. 71: 221-249.
- LINDNER E. (1965) Ferritin und Hämoglobin im Chloragog von Lumbriciden (Oligochaeta). Z. Zellforsch. 66: 891-913.
- LINTHICUM D.S., MARKS D.H., STEIN E.A., COOPER E.L. (1977) Graft rejection in earthworms: an electron microscopic study. Eur. J. Immunol. 7: 871-876.
- MACMICKING J., XIE Q., NATHAN C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. Ann. Rev. Immunol. 15: 323-350.
- MANDAL L., BANERJEE U., HARTENSTEIN V. (2004) Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. Nature Genetics 36: 1019-1023.
- MANSOUR M.H., COOPER E.L. (1984) Serological and partial molecular characterization of a Thy-1 homolog in tunicates. Eur. J. Immunol. 14: 1031-1039.

- MANSOUR M.H., DELANGE R., COOPER E.L. (1985) Isolation, purification, and amino acid composition of the tunicate hemocyte Thy-1 homolog. *J. Biol. Chem.* 260: 2681-2686.
- 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.
- MEISTER M., LEMATRIE B., HOFFMANN J.A. (1997) Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *BioEssays* 19: 1019-1026.
- MILL P.J. (1978) *Physiology of Annelids*. Academic Press, London.
- MILLET A.C.M., EWBANK J.J. (2004) Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 4-9.
- MILOCHAU A., LASSÈGUES M., VALEMBOIS P. (1997) Purification, characterization and activities of two haemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1337: 123-132.
- MINNICK M. F., RUPP R. A., SPENCE K. D. (1986) A bacterial-induced lectin which triggers hemocyte coagulation in *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 729-735.
- MOHRIG W., LANGE S., KAUSCHKE E., PREUSSE K., COOPER E.L. (1997) Inhibitor controlled haemolytic activity in the coelomic fluid of the earthworms. *Dev. Comp. Immunol.* 21: 116.
- MORI H. (1979) Embryonic haemocytes: origin and development. In: Gupta A.P. Editor. *Insect haemocytes*. University Press. Cambridge. pp. 4-27.
- MUTA T., IWANAGA S. (2003) The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr Opin. Immunol.* 41-47.
- MÜLLER W.E.G., BLUMBACH B., MÜLLER I.M. (1999) Evolution Of The Innate And Adaptive Immune Systems. *Transplantation* 68: 1215-1227.
- NAPPI A.J., OTTAVIANI E. (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22: 469-480.
- OCHIAI M., ASHIDA M. (1999) A pattern recognition protein for peptidoglycan. Cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 274: 11854-8.
- OHTA N., SHIODA S., SEKIZAWA Y., NAKAI Y., KOBAYASHI H. (2000) Sites of expression of mRNA for lysenin, a protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Cell Tissue Res.* 302: 263-70.
- OLIVARES FONTT E., BESCHIN A., VAN DIJCK E., VERCRUYSSSE V., BILEJ M., LUCAS R., DE BAETSELIER P., VRAY B. (2002) *Trypanosoma cruzi* is lysed by coelomic cytolytic factor-

- 1, an invertebrate analogue of tumor necrosis factor, and induces phenoloxidase activity in the coelomic fluid of *Eisenia foetida foetida*. Dev. Comp. Immunol. 26:27-34.
- OTTAVIANI E., FRANCHINI A., CASSANELLI S., GENEDANI S. (1995) Cytokines and invertebrate immune responses. Biol. Cell. 85: 87-91.
- OTTAVIANI E. (1992) Immunorecognition in the gastropod mollusks with particular reference to the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). Boll. Zool. 59: 129-134.
- OTTAVIANI E., FRANCESCHI C. (1997) The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. Immunol. Today 18: 169-174.
- PECH L.L., STRAND M.R. (1996) Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. J. Cell Sci. 109: 2053-2060.
- POINAR G.O., HESS R.T. (1977) Immune responses in the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Annelida) against *Rhabditis pellio* (Nematoda). Comp. Pathobiol. 3: 69-84.
- PORCHET-HENNERÉ E. (1990) Cooperation between different coelomocyte populations during the encapsulation response of *Nereis diversicolor*, demonstrated using monoclonal antibodies. J. Invertebr. Pathol. 56: 353-361.
- QUAGLIANO D., COOPER E.L., SALVIOLI S., CAPRI M., SUZUKI M.M., RONCHETTI P.I., FRANCESCHI C., COSSARIZZA A. (1996): Earthworm coelomocytes in vitro: cellular features and "granuloma" formation during cytotoxic activity against mammalian tumor cell target K562. Eur. J. Cell Biol. 70: 270-288.
- RAHEMTULLA F., LØVTRUP S. (1974) The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides. II. Nematoda; Annelida. Comp. Biochem. Physiol. 49B: 639-646.
- RAHEMTULLA F., LØVTRUP S. (1975) The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides. III. Oligochaeta and Hirudinea. Comp. Biochem. Physiol. 50B: 627-629.
- RAISANEN S.R., HALEEN J., PARIKKA V., VAANENEN H.K. (2001) Tartrate resistant acid phosphatase facilitates hydroxyl radical formation and colocalizes with phagocytosed

- Staphylococcus aureus* in alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 142-150.
- RATCLIFFE N.A., ROWLEY A.F., FITZGERALD S.W., RHODES C.P. (1985) Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Internat. Rev. Cytol.* 97: 183-349.
- RATCLIFFE N. A., BROOKMAN J. L., ROWLEY A. F. (1991) Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 33-39.
- REINISCH C.L., CHARLES A.M., TROUTNER J. (1983) Unique antigens on neoplastic cells of the soft shell clam *Mya arenaria*. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 33-39.
- REJNEK J., TUČKOVÁ L. ŠÍMA P., KOSTKA J. (1986) The proteins in *Lumbricus terrestris* and *Eisenia fetida* coelomic fluids and on coelomocytes reacting with sheep and goat IgG molecules. *Dev. Comp. Immunol.* 10: 467-475.
- REJNEK J., TUČKOVÁ L. ŠÍMA P., BILEJ M. (1993) The fate of protein antigen in earthworms: study in vivo. *Immunol. Lett.* 36: 131-136.
- ROCH P., VALEMBOIS P., DU PASQUIER L. (1975) Response of earthworm leukocytes to concanavalin A and transplantation antigens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 64: 45-54.
- ROCH P. (1979) Protein analysis of earthworm coelomic fluid. 1. Polymorphic system of the natural haemolysins of *Eisenia fetida andrei*. *Dev. Comp. Immunol.* 3: 599-608.
- ROCH P., VALEMBOIS P., DAVANT N., LASSÈGUES M. (1981) Protein analysis of earthworm coelomic fluid. II. Isolation and biochemical characterization of the *Eisenia fetida andrei* factor (EFAF). *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 829-836.
- ROCH P., COOPER E.L., ESKINAZI D.P. (1983) Serological evidence for a membrane structure related to human β_2 -microglobulin expressed by certain earthworm leukocytes. *Eur. J. Immunol.* 13: 1037-1042.
- ROCH P., COOPER E.L. (1983) β_2 -microglobulin-like molecule on earthworm (*L. terrestris*) leukocyte membranes. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 633-636.
- ROCH P., DAVANT N., LASSÈGUES M. (1984) Isolation of agglutinins and lysins from earthworm coelomic fluid by gel filtration followed by chromatofocusing. *J. Chromatogr.* 290: 231-235.
- ROCH P., VALEMBOIS P., VAILLER J. (1986) Amino-acid composition and relationships of five earthworm defense proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 747-751.
- ROCH P., VALEMBOIS P., LASSÈGUES M. (1987) Genetic and biochemical polymorphism of earthworm humoral defenses. *Dev. Comp. Immunol.* 11: 91-102.

- ROCH P., CANICATTI C., VALEMBOIS P. (1989) Interactions between earthworm haemolysins and sheep red blood cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 983: 193-198.
- ROCH P., VALEMBOIS P., LASSÈGUES M. (1991) Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: III. Relationship within the polymorphic haemolysins. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 27-32.
- ROCH P. (1996) A definition of cytolytic response in invertebrates. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 23: 115-150.
- ROSETTO M., MANETTI A.G., GIODANO P.C., MARRI L., AMONS R., BALDARI C.T., MARCHINI D., DALLAI R. (1996) Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*. *Eur. J. Biochem.* 241: 330-337.
- SATO T., ENDO Y., MATSUSHITA M., FUJITA T. (1994) Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. *Internat. Immunol.* 6: 665-669.
- SEKIZAWA Y., HAGIWARA K., NAKAJIMA T., KOBAYASHI H. (1996) A novel protein, lysenin, that causes contraction of the isolated rat aorta: its purification from the coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia fetida*. *Biomed. Res.* 17: 197-203.
- SEKIZAWA Y., KUBO T., KOBAYASHI H., NAKAJIMA T., NATORI S. (1997) Molecular cloning of cDNA for lysenin, a novel protein in the earthworm *Eisenia fetida* that causes contraction of rat vascular smooth muscle. *Gene* 191: 97-102.
- SHALEV A., GREENBERG A.H., LÖGDBERG L., BJÖRCK L. (1981) β_2 -microglobulin-like in low vertebrates and invertebrates. *J. Immunol.* 127: 1186-1191.
- ŠINKORA M., BILEJ M., TUČKOVÁ L., ROMANOVSKY A. (1993) Haemolytic function of opsonizing proteins of the earthworm's coelomic fluid. *Cell. Biol. Internat.* 14: 832-837.
- SMITH V. J. (1996) The prophenoloxidase activating system: a common defense pathway for deuterostomes and protostomes? *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 23: 75-114.
- SÖDERHÄLL K., CERENIUS L. (1998) Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 23-28.
- STEIN E.A., AVTALION R.R., COPPER E.L. (1977) The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Morphology and phagocytic properties. *J. Morphol.* 153: 467-476.
- STEIN E.A., COOPER E.L. (1978) Cytochemical observation of coelomocytes from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Histochem. J.* 10: 657-678.
- STEIN E.A., COOPER E.L. (1981) The role of opsonins in phagocytosis by coelomocytes by the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 415-425.

- STEIN E.A., COOPER E.L. (1988) In vitro agglutinin production by earthworm leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 6: 613-624.
- STRAND M.R., JOHNSON J.A. (1996) Characterization of monoclonal antibodies to hemocytes of *Pseudophasia includens*. *J. Insect Physiol.* 42: 21-31.
- STUBBERUD H.E., HØNSI T.G., STENERSEN J. (2000) Purification and partial characterization of tentatively classified acid phosphatase from the earthworm *Eisenia veneta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B: 487-494.
- TAKAHASHI T., IWASE T., TAKENOUCI N., SAITO M., KOBAYASHI K., MOLDOVEANU Z., MESTECKY J., MORO I. (1996) The joining chain is present in invertebrates that do not express immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1886-1891.
- TEPASS U., FESSLER L. I., AZIZ A., HARTENSTEIN V. (1994) Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* 120: 1829-1837.
- TETTAMANTI G., GRIMALDI A., FERRARESE R., PALAZZI M., PERLETTI G., VALVASSORI R., COOPER E.L., LANZAVECCHIA G., DE EGUILÉOR M. (2003) Leech responses to tissue transplantation. *Tissue Cell* 35: 199-212.
- TETTAMANTI G., GRIMALDI A., VALVASSORI R., RINALDI L., DE EGUILÉOR M. (2003) Vascular endothelial growth factor is involved in neoangiogenesis in *Hirudo medicinalis* (Annelida, Hirudinea). *Cytokine* 22: 168-179.
- TOUPIN J., LAMOUREUX G. (1976) Coelomocytes of earthworms: the T cell-like rosette. *Cell. Immunol.* 26: 127-132.
- TRENCZEK T. (1998) Endogenous defense mechanism of insects. *Zoology* 101: 298-315.
- TUČKOVÁ L., BILEJ M. (1994) Antigen processing in earthworms. *Immunol. Lett.* 41: 273-277.
- TUČKOVÁ L., BILEJ M. (1996) Mechanisms of antigen processing in invertebrates: Are there receptors? *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 23: 41-72.
- VALEMBOIS P. (1971) Degenerescence et regeneration de l'épiderme a la suite d'une xenogreffe de paroi du corps entre lombriciens. *C. R. Acad. Sci. Paris* 96: 59-64.
- VALEMBOIS P., ROCH P., LASSÈGUES M., CASSAND P. (1982) Antibacterial activity of the haemolytic system from the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *J. Invert. Pathol.* 40: 21-27.
- VALEMBOIS P., ROCH P., LASSÈGUES M. (1986) Antibacterial molecules in annelids. In Brehèlin M. (ed.): *Immunity in Invertebrates*. Springer-Verlag, Heidelberg. pp 74-93.
- VALEMBOIS P., ROCH P., LASSÈGUES M. (1988) Evidence of plasma clotting system in earthworms. *J. Invertebr. Pathol.* 51: 221-228.

- VALEMBOIS P., LASSÉGUES M., ROCH P. (1992) Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia foetida andreii* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. *Dev. Comp. Immunol.* 16: 95-101.
- VAN DE BRAAK C.B., BOTTERBLOM M.H., TAVERNE N., VAN DER KNAAP W.P., ROMBOUT J.H. (2001) Monoclonal antibodies against haemocyte molecules of *Penaeus monodon* shrimp react with haemolymph components of other crustaceans and disparate taxa. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 279-283.
- VĚTVIČKA V., ŠIMA P., COOPER E.L., BILEJ M., ROCH P. (1994) *Immunology of Annelids*. CRC Press, Boca Raton.
- VILMOS P., NAGY I., KURUCZ E., HULTMARK D., GATEFF E., ANDO I. (2004) A rapid rosetting method for separation of hemocyte sub-populations of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Comp. Immunol.* 28: 555-563.
- WILLOTT E., TRENCZEK T., THROWER L.W., KANOST M.R. (1994) Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. *Eur. J. Cell Biol.* 65: 417-423.
- WILLOTT E., LOWENBERGER C., CHRISTENSEN B.M., KANOST M.R. (1995) Monoclonal antibodies against *Manduca sexta* hemocytes bind *Aedes aegypti* hemocytes: characterization of six monoclonal antibodies that bind hemocytes from both species. *Dev. Comp. Immunol.* 19: 451-461.
- YAMAJI A., SEKIZAWA Y., EMOTO K., SAKURABA H., INOUE K., KOBAYASHI H., UMEDA M. (1998) Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J. Biol. Chem.* 273: 5300-5306.
- YOSHINO T.P., GRANATH W.O. (1983) Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. *Cell Tissue Res.* 232: 553-564.

11. A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Publikációk

1. **Engelmann P.**, Pálinkás L., Cooper E.L., Németh P. (2004) Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Developmental and Comparative Immunology* (in press, online first 2004 december 8.)
2. **Engelmann P.**, Cooper E.L., Németh P. (2004) Anticipating innate immunity without a Toll. *Molecular Immunology* (in press, online first 2004 november 23.)
3. **Engelmann P.**, Molnár L., Pálinkás L., Cooper E.L. Németh P. (2004) Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell and Tissue Research* 316 (3): 391-401.
4. **Engelmann P.**, Kiss J., Csöngéi V., Cooper E.L., Németh P. (2004) Earthworm leukocytes kill HeLa, HEp-2, PC-12 and PA317 cells in vitro. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 61 (1-2): 215-227.
5. **Engelmann P.**, Pál J., Berki T., Cooper E.L., Németh P.(2002) Earthworm leukocytes reacted with different mammalian antigen specific monoclonal antibodies. *Zoology* 105 (3): 257-265.
6. **Engelmann P.**, Cooper E.L., Németh P. (2002) Comparative analysis of earthworm immune system by phylogenetical aspects of cell surface and intracellular markers. In: Cooper E.L., Beschin A., Bilej M. (ed.): *A new model for analyzing antimicrobial peptides with biomedical applications*. NATO Science series: Life and Behavioural Sciences Vol. 343. IOS Press, Amsterdam. pp: 53-57.

Hivatkozható absztraktok

1. **Engelmann P.**, Czömpöly T., Németh P. (2003) Earthworm coelomocytes examined by confocal microscopy and reverse transcription PCR. III. Hungarian Cell Analysis Conference, Budapest, *Cytometry* 56A: 128-129.
2. **Engelmann P.**, Kiss J., Kocsis B., Cooper E.L., Németh P. (2003) Earthworm coelomocytes possess antimicrobial and cytotoxic effects against certain

microorganisms and eukaryotic cells. 15th European Immunology Congress, Rhodes, Greece. Immunol. Lett. 87: 36.

3. **Engelmann P.**, Cooper E.L., Németh P. (2004) Identification of coelomocyte subpopulations by specific monoclonal antibodies in *Eisenia fetida*. XXII. Congress of the International Society for Analytical Cytology (ISAC), Montpellier, France. Cytometry 59A: 123-124.

Előadások

1. **Engelmann P.**, Pál J., Németh P. (2001) Földigiliszta (*Eisenia fetida*) coelomasejtek immunológiai jellemzése monoklonális ellenanyagokkal. Magyar Immunológiai Társaság XXXI. Kongresszusa, Eger.
2. **Engelmann P.** (2003) *Eisenia fetida* coelomasejtek fagocita aktivitása. Pécsi Akadémiai Bizottság Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpóziuma, Pécs.
3. **Engelmann P.**, Pálincás L., Czömpöly T., Németh P. (2004) *Eisenia fetida* coelomasejt alpopulációk morfológiai és funkcionális jellemzése immunológiai módszerekkel. XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs.

12. MELLÉKLETEK

(A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK)