

**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

BEVEZETÉS

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.

Az Annelida (gyűrűsférges) 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 bőrizomtömlőből származó autológ transzplantátumokat befogadták, szemben az allogén és xenogén szövetekkel. 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.

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.

Az Oligochaetak coelomasejtjeinek morfológiáját öt-hat faj elemzése alapján (Lumbricidae, Enchytracheidae) állapították meg. A Lumbricidae coelomasejtet több, különböző csoportra osztották. Végül két nagyobb csoportra: (hialin, granuláris) amöbocitákra és eleocitákra tipizálták a sejteket.

A coelomasejtek 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.

A földigilisztá amöboid sejtjei vesznek részt elsősorban a sejtes védekezési folyamatokban (fagocitózis, enkapszuláció). 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.

A coelomafolyadékban található fagociták, humorális faktorokkal együtt akadályozzák meg a testüregbe került baktériumok invázióját.

A coelomafolyadék antimikrobiális és citotoxikus molekulákat tartalmaz, melyek immunbiológiai folyamatokban vesznek részt. Szerepet játszanak többek között az opszonizációban, agglutinációban, fagocitózisban, gyulladáskeltésben, lízisben, *in vivo* az allogén és xenogén transzplantátumok eliminálásában, *in vitro* különféle célsejtek elpusztításában. A humorális komponensek: fetidinek, lizenin, hemolizinek, lizozim, a profenoloxidáz rendszer.

CÉLKITŰZÉSEK

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 építőjének meghatározására.
4. Vizsgáltuk a coelomasejtek **lizoszomális enzim** (savi foszfatáz, AcP) **aktivitásának jellemzőit** (sejtcsoportok közötti savi foszfatáz enzimaktivitás, enzimtartalom különbségeket) és **aktiválhatóságát**. Nyomon követtük a mikrobiális hatásra történő lizoszomális enzim változásokat.
5. Tisztázni kívántuk a **giliszta 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.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtizolálás

A coelomasejteket 5% etanol tartalmú pufferoldattal izoláltuk, melynek hatására a giliszták védekezési reakcióként dorzális pórusukon keresztül kipréselik magukból a sejteket. LBSS (Lumbricus Balanced Salt Solution) pufferben felvéve megmostuk a coelomasejteket.

Immunizálás, sejtfüzió, hibridóma előállítás

Izolált coelomasejteket (10^6 /ml) LBSS-s mosás után adtuk be intraperitoneálisan nyolc hetes Balb/c egerekbe. Az újraimmunizálás három hét elteltével történt, a második immunizálást követően próbavért vettünk, a szérum titerét megteszteltük. Két nappal az utolsó immunizálás után végeztük el a sejtfüziót (Köhler és Milstein 1975).

Giliszták preparálása, szövetek előkészítése

Az előkészített állatokat narkotizáltuk (alkoholban, szódavízben), majd a túlaltatás után kivágtuk a clittelum közeli szövetrégiót. A blokkokat TissueTech-be ágyaztuk be, lefagyasztottuk majd $10\mu\text{m}$ vastag metszeteket készítettünk kriosztáttal.

Immuncitokémia, immunfluoreszcencia

A lemezeket acetonnal fixáltuk, az endogén peroxidáz aktivitást fenil-hidrazin-hidrokloriddal (1mg/ml PBS-ben) gátoltuk, az auto-fluoreszcenciát 0,05 M NH_4Cl oldattal csökkentettük. A nem specifikus kötőhelyek blokkolását 5%-os BSA-val végeztük 20 percig. 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 antitest esetében az előhíváshoz AEC-t használtunk. A festett sejteket, szöveteket a Bio-Rad MRC-1024 konfokális rendszerű Nikon Eclipse TE-300 és Olympus BX61 mikroszkóppal vizsgáltuk.

Sejthomogenizálás

1. A sejteket 0,5% Triton X-100 lizálópufferben (pH: 7,6) proteázgátlók (1 μg /ml aprotinin, 1 μg /ml leupeptin, 1mM PMSF) jelenlétében homogenizáltuk (4 °C, 45 perc).

2. LBSS-ben vettük fel a sejteket, a sejtlyálást 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).

ELISA

Coelomasejt lizátumokat (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 hígítatlanul], 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% Tweent tartalmazó PBS-sel végeztük. A lemezeket Dynatech MR7000 fotométerrel mértük le.

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.

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.

SDS-poliakrilamid gél elektroforézis és Western blot

Az immunprecipitátumok fehérjét 10%-os gélen választottuk el Laemmli alapján (1970) Mini-Protean 3 apparátussal (Bio-Rad). Az elválasztott fehérjét nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell) blottoltuk 4°C-on egy éjszakán át. A blottolás hatékonyságát Ponceau festéssel ellenőriztük a membránokon. A nitrocellulózt 2%-os sovány tejporral (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. Festett molekulásúly proteinek (Sigma) használtunk standardként. A blottokat ScionImage szoftverrel (Windows) analizáltuk. Kontroll ellenanyagként biotinált a-FITC monoklonális antitestet használtunk.

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 szokásos flow citometriás jelölési protokoll után egy Becton Dickinson FACSCalibur citométerrel mértük és FCS Express szoftverrel analizáltuk.

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 dúsitását a korábban leírtak szerint (Felici és mtsai 1995) végeztük. 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% tejpórral) 2 órán át inkubáltuk a-EFCC1 ellenanyaggal (1 μ g/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 a kapott szekvencia 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.

„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) tárgylemezre ülepítettük a sejteket, majd immuncitokémiával karakterizáltuk a különböző sejtcsoportokat.

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

„In vitro” enkapszulációs assay

Coelomasejteket (4×10^5) helyeztünk ki 96 lyukú sejttenyésztő lemezre 100 μ l DMEM+10% FCS médiumban. Enkapszulációs „célsejtként” 150-200 Sephadex G25 gyöngyöt tettünk a lyukakba. A lemezt szobahőn 130 rpm-mel forgattuk 24 órán keresztül. A mintákat tárgylemezre centrifugáltuk (előtte LBSS-ben mosva hagytuk leülepedni a gyöngyöket fél percig és az ülepletményt használtuk fel) és immuncitokémiával vizsgáltuk.

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. 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.

Lizoszomális aktivitás nyomon követése

Az izolált coelomasejteket enzimműködésével, immuncitokémiával karakterizáltuk. Az immuncitokémiánál a-humán AcP (1:50 nyúl, Sigma) ellenanyaggal történt az inkubáció. A fixálást 4% PFA-val végeztük 20 percig, permeabilizáltuk a sejteket 0,5% Triton X-100-zal, majd az immuncitokémiai protokoll következett. 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 előlt baktériumokkal (leírt módon) majd lizátumot készítettünk a sejtekből, melyet Western blottal vizsgáltunk.

Ellenanyagok, reagensek Western blot-hoz: 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 fehérje-meghatározást (Bradford 1976) a Western-blot vizsgálat és az ELISA vizsgálatnál végeztünk, a mintákból egyenlő mennyiségű fehérjét használtunk fel a vizsgálatokhoz.

Citotoxicitási tesztek

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

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 megkezeltük (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.

EREDMÉNYEK

A coelomasejtek fizikai paraméterek alapján történő elkülönítése

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

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.

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 mAt szintén jelölte a coelomasejtek membránját. Mindhárom ellenanyag esetében az R1 és R2 populáció bizonyult pozitívnak, az R3 sejtekkel nem reagáltak az ellenanyagok.

Intracelluláris festődés coelomasejteken α -TNF- α , α -TSH- α , - β -dimer, α -Cu/Zn SOD monoklonális ellenanyagokkal. α -TNF- α reaktivitás mezoderális szöveteken.

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

Immuncitokémiai festésekkel a citokin, hormon és enzim specifikus ellenanyagok jelölődése jól követhető volt a coelomasejtekből készült citoprepeken. Az intracelluláris festődés jellemző a coelomasejtek citoplazmájában anti-TNF- α monoklonális ellenanyaggal történt festés után. Kriosztátos giliszta keresztmetszeteken alkalmazva ezt az ellenanyagot a bél belső sejtrétege mutatott specifikus jelölődést. Kontroll reakcióban (normál eger szérumot használva) nem kaptunk festődést az említett szöveti struktúrákban.

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 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. Anti-humán savi foszfatáz poliklonális ellenanyaggal festettük a sejteket áramlási citometriás analízisre. A citokémiai festések és az áramlási citometriai mérések során a granuláris (R1) és hialin (R2) sejtekben találtuk a magasabb savi foszfatáz enzimtartalmat, reaktivitást. A chlorogogén sejtekben nem tapasztaltunk számottevő reakciót.

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

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. Ezzel szemben különböző sejtársaságokat 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 auto-fluoreszcenciája.

A két másik ellenanyag csoport (**C és D csoport**) az effektor coelomasejtekkel (hialin és granuláris amöbociták) reagál. Az immunhisztokémiában aggregálódó, összetapadó sejteket festő EFCC3 ellenanyag markánsan festette áramlási citometriában az R2 populáció sejtjeit. Az a-EFCC4 kis jelölődést mutatott áramlási citometriában, főleg az R1 csoport sejtjeit festette meg.

Monoklonális ellenanyagok festési mintázata izolált coelomasejteken

Az a-EFCC1 ellenanyag a coelomasejtek membránján mutat reakciót. 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) monoklonális ellenanyag intracelluláris granulumokat fest egy coelomasejt alpopulációban, erre a sejt típusra jellemző, hogy citoplazmájuk nagyon granulált és sejt magjuk viszonylag kicsi. Ezek a sejtalkotók kitöltik a citoplazmát és méretük 1-6 μm közé tehető. E jellemzők alapján a chlorogogén sejt populációval tudjuk fedésbe hozni ezeket a sejteket.

Az a-EFCC3 monoklonális ellenanyag intracellulárisan olyan coelomasejteket fest, melyek hajlamosak egymáshoz tapadni. Ezek a hialin amöbociták, melyek adherenciát mutatnak üvegfelületekhez. Az a-EFCC3 ellenanyaggal szemben az a-EFCC4 ellenanyag egy sokkal ritkább sejt populációt jellemez. Intracellulárisan festődnek a sejtek, feltűnő a perifériális elhelyezkedésű sejt mag. Kis méretű sejtek, a morfológiai jellegek alapján ezek a granuláris amöbociták lehetnek.

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.

Az EFCC2 antigén a festések során a bél coelomaüreg felőli falán mutatott festődést, ez a régió felel meg a letapadt/rögzített chloragogén sejtek helyének. 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.

A-EFCC3 klónt használva a festésekre, szelektív jelölődést tapasztaltunk. Az ellenanyag a bél és a coeloma-epithél felszínén mutatott reakciót. Immunfluoreszcenciával diszkrét festődést kaptunk 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. Nem kaptunk festődést izomszövetben, idegrendszerben.

Coelomasejtek lizátumának immunprecipitációja monoklonális ellenanyagokkal

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

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 <u>SLSDSCG</u>
43 klón	CRYPT <u>SLSDSC</u>

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.

Giliszta coelomasejt specifikus ellenanyagok reakciója más fajokon

Az ellenanyagok további térképezése végett más fajokon is megnéztük az antitestek reaktivitását. 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.

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. Más struktúrákban nem kaptunk reakciót, ezekben a lakunákban hemolimfa áramlik.

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 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. 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 (chloragogének) inaktívak voltak a tesztek során, bár a baktériumok egy részét megkötötték.

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 sejtömeget. Gyöngyöket adva a sejtekhez, megfigyeltük, hogy az a-EFCC3 ellenanyag által jelzett sejtek körülhatárolják, teljesen izolálják a környezetből a gyöngyöket, ezzel szemben az a-EFCC4 jelű ellenanyagunk által felismert sejtek (granuláris sejtek) felismerik az idegen objektumot és bizonyos helyeken kapcsolódnak hozzá.

Savi foszfatáz enzim változások coelomasejtekben fagocitózis után

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

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

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, sejtlyizátum hozzáadása után hasonló jelenségeket tapasztaltunk. A kitapadó sejtek 5-10 perccel a minta adása után felszakadoztak a Petri csésze aljáról, elvesztették adheráló képességüket, a sejtek összezsugorodnak, a sejtmagok megduzzadnak. A sejtlyizátum esetében néhány óra alatt a sejtek elpusztulnak, a lizátum

hatása dózisfüggő. A kontroll mintákban (médiüm, LBSS) nem látszik semmiféle változás, a sejtek tökéletesen életképesek, kitapadnak a szilárd felszínre.

Az ultrahanggal készített sejt-lizátumokat 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 sejt-lizátum citotoxikus aktivitását. Érdekes módon a tripszines emésztés nem gátolta meg a hatást. A targetsejtek elpusztultak, az eredmény korrelált a pozitív kontrollnál (natív coelomasejt lizátum) tapasztalattal.

Izolált coelomasejteket tenyésztettünk egy éjszakán át emlős médiümaban, majd a sejteket lecentrifugálva a felülúszót a targetsejtekhez adtuk. A sejtpusztulás időtartama a sejt-lizátumokhoz hasonlítva elnyújtottabb, hosszabb volt.

A felülúszós vizsgálatoknál tíz órás inkubációs időtartam alatt lecsökkent az élősejt szám (HeLa), 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 sejt-lizátumok (J774, H2kvJUN1, Jurkat) nem okoztak sejtpusztulást.

EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE, ÖSSZEFOGLALÁSA

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. gyulladáscitokinek 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 fehérjespecificitással 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**

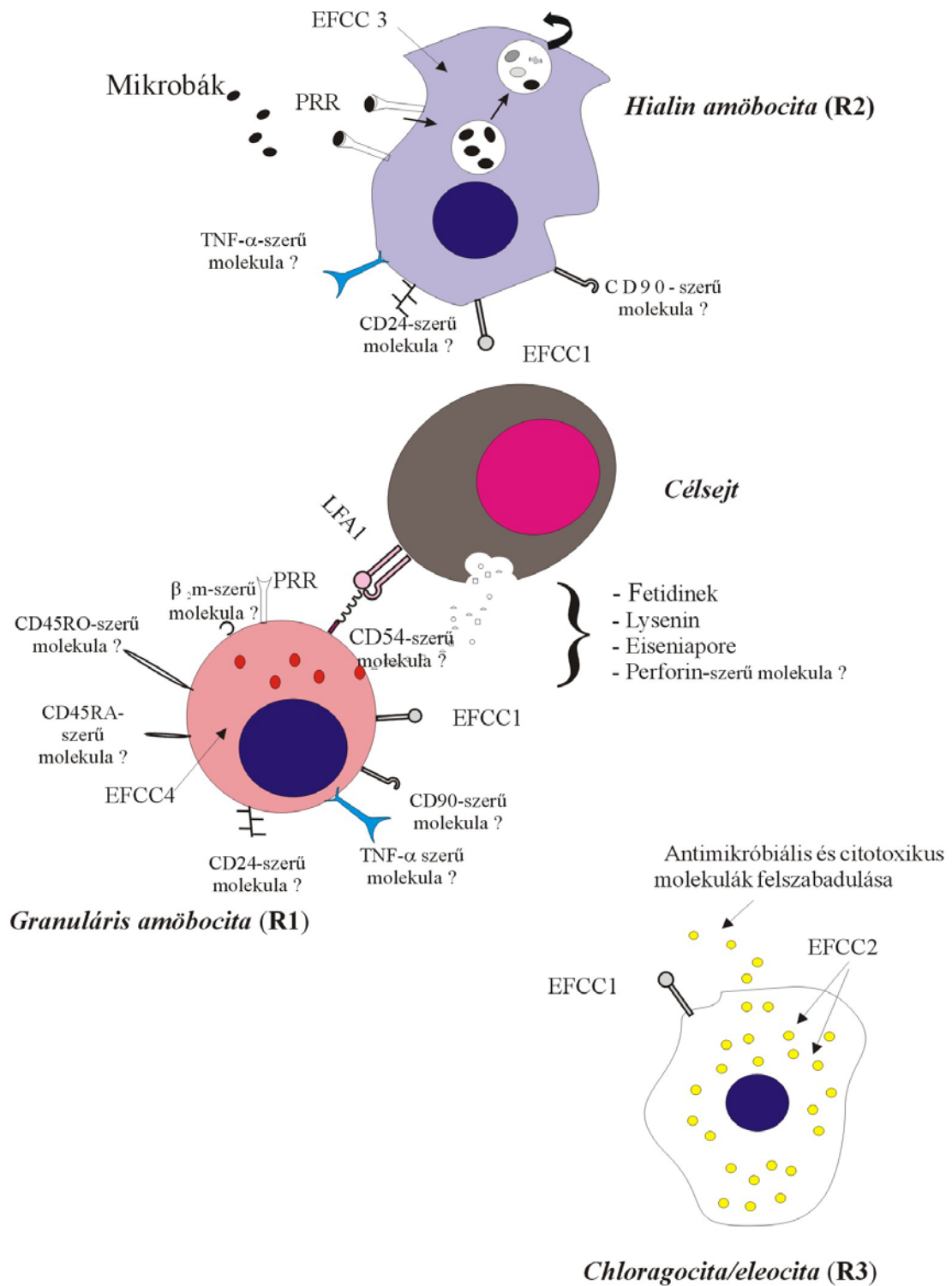
ellenanyagunk epitópját. Ez egy hat aminosavas peptidszakasznak bizonyult, aminek fejlődésbiológiai elemzését – bioinformatikai technikákkal - megkezdjük. A vizsgálatok továbbfolytatására egy coelomasejtes cDNS könyvtár kialakítását kezdtük el.

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.

Összegzésül elmondható az, hogy a giliszta celluláris védekezésében résztvevő coelomasejtek antigenitásban és funkcionálisan is különböző csoportokat alkotnak. Sejt felszínén és intracellulárisan is hordoznak olyan molekulákat melyek konzervált, gerincesek molekuláira hasonlító antigéndeterminánsokat hordoznak. Ezen molekulák funkciója gilisztákban egyelőre ismeretlen. Ismeretesek 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 földigiliszta coelomasejtek védekező funkcióiról.



A coelomasejtek védekezési reakciókban betöltött szerepének hipotetikus sémája. Hialin és granuláris amöbociták, chloragogéensejtek és szerepük az immunválaszban. A különböző sejtcsoportok karakterizálása monoklonális ellenanyagok segítségével - sejtfelszíni és intracelluláris markerek - történt. A citotoxikus válaszban feltételezett a különböző toxikus molekulák sejtekből való felszabadulása (fetidin, lysenin, Eiseniapore, H₁, H₂, H₃ lizinek).

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.

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Publikációk

1. **Engelmann P.**, Pálincás L., Cooper E.L., Németh P. (2004) Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Developmental and Comparative Immunology* (közlésre elfogadva) (IF: 2,39)
2. **Engelmann P.**, Cooper E.L., Németh P. (2004) Anticipating innate immunity without a Toll. *Molecular Immunology* (közlésre elfogadva) (IF: 2,827)
3. **Engelmann P.**, Molnár L., Pálincás L., Cooper E.L., Németh P. (2004) Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell and Tissue Research* 316 (3): 391-401. (IF: 2,991)
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. (IF: 1,611)
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. (IF: 0,446)
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.