

Kolo: celoštátne

Kategória: A

Teoreticko-praktická časť – Praktická úloha č. 2

Téma: Imunológia – nešpecifická imunita

Mechanizmy, ktoré zabraňujú infekcii patogénmi nájdeme prakticky u všetkých živých organizmov. Počas evolúcie vzniklo široké spektrum takýchto obranných nástrojov, ako napríklad enzymatické systémy, produkcia obranných molekúl, či schopnosť pohltiť potenciálne nebezpečné bunky. Špecialitou mnohobunkových živočíchov je však existencia viac, či menej vyvinutých imunitných systémov, kde sa na rozoznávaní a neutralizácii nebezpečenstva podieľajú rozpustné molekuly (tzv. humorálna imunita) a aj špecializované bunky (bunková imunita).

Keďže celóm dážďoviek (*lumbricidae*) je v neustálom kontakte s okolitou pôdou (prostredníctvom metanefridií a dorzálnych pórov), ktorá obsahuje veľké množstvo potenciálnych patogénov, sú tieto organizmy mimoriadne zaujímavými modelmi pre štúdium imunitných procesov. V celómvej tekutine dážďoviek môžeme nájsť niekoľko typov špecializovaných imunitných buniek, ktoré sa nazývajú celómocyty. V tejto laboratórnej úlohe sa budete venovať pozorovaniu celómocytov dážďovky a analýze imunitných procesov živočíchov.

Izolácia a pozorovanie celómocytov dážďovky *Eisenia hortensis*

Pomôcky a materiál

- skontrolujte, či máte k dispozícii všetky pomôcky, ak nie, kontaktujte vedúceho úlohy

nádoba so substrátom a dážďovkou, 2 väčšie a jedna menšia Petriho miska, nádoba s pitnou vodou, nádoba s destilovanou vodou na prepláchnutie pipety, odpadová nádoba, roztok LBSS (na ľade) roztok EM (na ľade), plastová Pasteurova pipeta, prázdna mikroskúmavka a mikroskúmavka s farebnou tekutinou na vyváženie centrifúgy, podložné a krycie sklíčka, mikroskop, rukavice, papierové utierky.

Postup

- pri manipulácii s dážďovkou buďte opatrní a pracujte v rukaviciach
- s izolovanými bunkami pracujte rýchlo a pokúste sa ich držať na ľade
- po každom pipetovaní si prepláchnite Pasteurovu pipetu destilovanou vodou

1. Pripravte si Petriho misky, do jednej z väčších misiek nalejte pitnú vodu, do druhej roztok LBSS, do menšej misky nalejte 3 ml roztoku EM
2. Dážďovku opláchnite najskôr vo vode, aby ste ju zbavili substrátu, a potom v roztoku LBSS
3. Osušte dážďovku papierovou utierkou
4. Dážďovku vložte na 30 – 60 sekúnd do roztoku EM (do tohto roztoku vylúči dorzálnymi pórm

tekutinu s obsahom celómocytov).

5. Dážďovku opäť premyte v LBSS a vráťte do nádoby so substrátom.

6. Pasteurovou pipetou preneste 1 ml suspenzie celómocytov do mikroskúmvky

7. Centrifugujte 1 minútu pri 6000 rpm

8. Vylejte alebo odsajte supernatant (dávajte pozor, aby vám v skúmvke zostal sediment) a sediment rozsuspendujte v 1ml roztoku LBSS

9. Centrifugujte 1 minútu pri 6000 rpm

10. Rozsuspendujte sediment v 1 ml roztoku LBSS

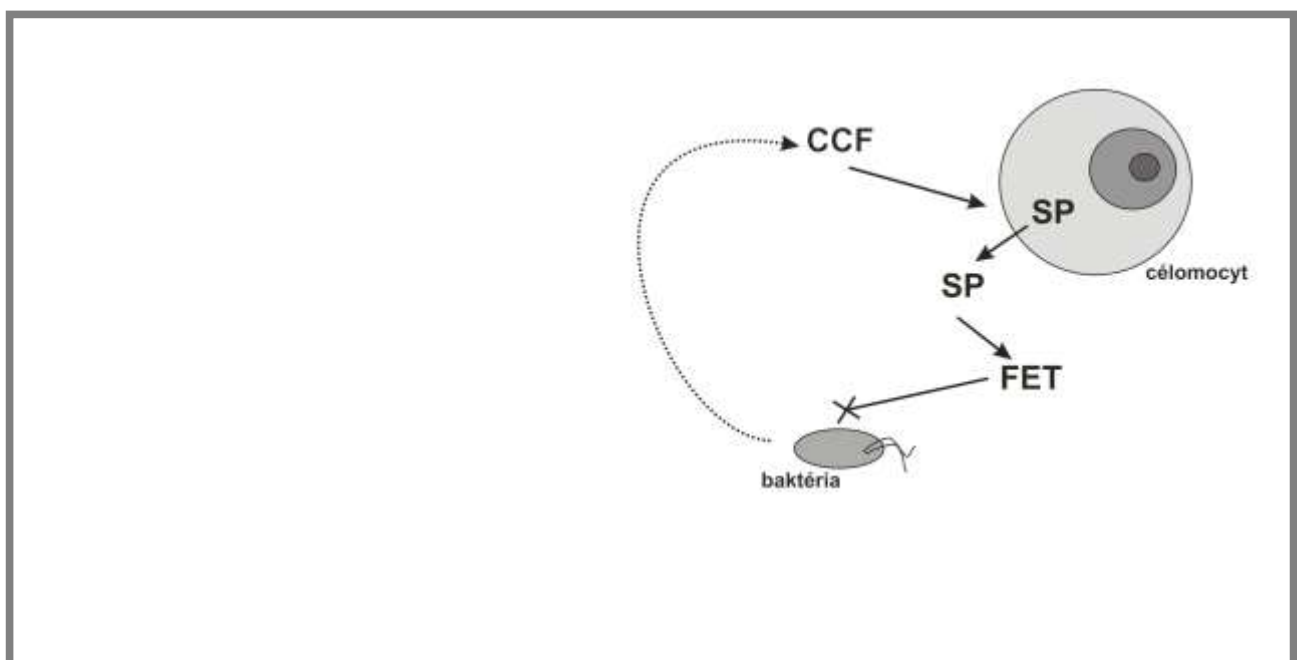
11. Kvapnite kvapku takto pripravenej suspenzie na podložné sklíčko, prikryte krycím sklíčkom a pozorujte najskôr pri menšom zväčšení (objektív 10x). Jednotlivé bunky však lepšie rozlíšite pri použití objektívu so zväčšením 40x.

Nákres

Vašou úlohou je **identifikovať amébocyt a granulocyt** na základe nasledujúceho popisu. Pozor, bunky sú pomerne ľahko prehliadnuteľné a majú tendenciu vytvárať zhluky. V prípade, že vo svojom preparáte nájdete dané bunky, privolajte vedúceho úlohy, ktorý vám preparát skontroluje. Následne zakreslite jeden amébocyt a jeden granulocyt. Popíšte pozorovateľné štruktúry.

U dážďoviek boli identifikované tri druhy celómocytov: amébocyty, granulocyty a eleocyty.

Amébocyty sú bunky nepravidelného tvaru, ktoré vytvárajú množstvo výbežkov, ktoré môžu byť lalokovité (tzv. lamelipódie) a/alebo tenšie a predĺžené (tzv. filopódie a lobopódie). **Granulocyty** sú prevažne okrúhleho tvaru s centrálnym jadrom a obsahujú v cytoplazme malé granuly. Niektoré z nich môžu mať na svojom povrchu bublinovité vyliačiny. **Eleocyty** sú okrúhle bunky s malým excentricky uloženým jadrom, obsahujú množstvo väčších nepravidelných granúl. Tiež obsahujú farbivá, preto môžu byť v mikroskope viditeľné ako žlté resp. hnedasté bunky. Eleocyty takmer vôbec nevytvárajú výbežky a sú pomerne krehké, takže pri príprave preparátu môže dôjsť k ich fragmentácii.



Úlohy

1. Ako už bolo spomenuté, jedným z hlavných imunitných mechanizmov je fagocytóza. Všetky tri druhy celómocytov sú schopné fagocytózy, avšak jeden z nich je výrazne aktívnejší ako ostatné. Na základe popisu buniek v úvode úlohy rozhodnite, ktorý typ imunitných buniek dáždovky má najvyššiu fagocytickú aktivitu a vysvetlite svoju odpoveď.

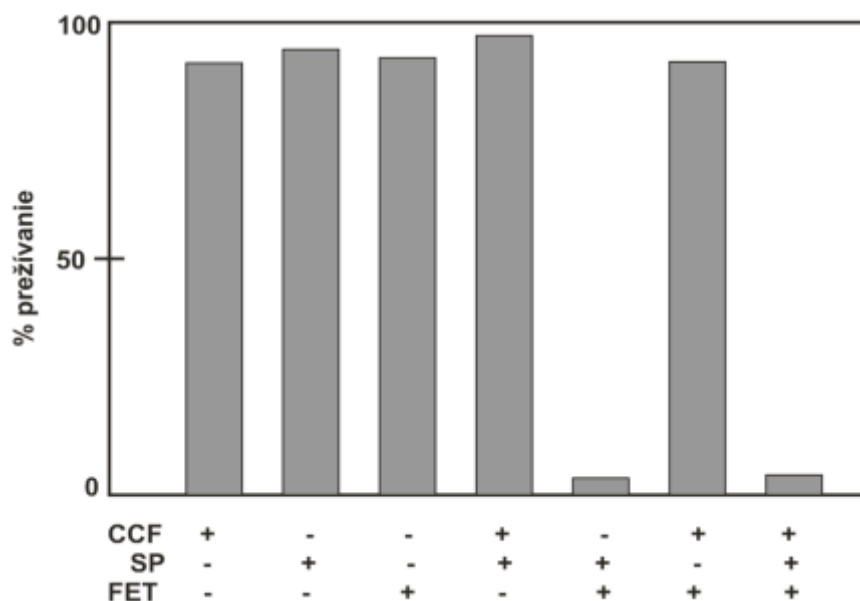
2. Nešpecifická imunita je pravdepodobne najlepšie preštudovaná u dáždovky *Eisenia fetida*, ktorá žije v rozkladajúcej sa organickej hmote. Dokonca sa zdá, že tento druh má širší repertoár imunitných mechanizmov ako príbuzné dáždovky, ktoré žijú zahrabané v pôde. Vysvetlite, ako môže životný štýl *E. fetida* súvisieť s týmto pozorovaním.

3. Dôležitú úlohu pri obrane proti patogénom zohrávajú aj látky rozpustené v celómovej tekutine. Predstavte si, že sa vám podarilo indentifikovať tri proteíny (nazvime ich CCF, SP a FET) v celómovej tekutine *E. fetida*, o ktorých viete, že sú spoločne potrebné pre zabíjanie baktérií. Na základe vašich predchádzajúcich výsledkov ste zostavili hypotézu (obrázok), podľa ktorej slúži proteín CCF na rozoznávanie látok charakteristických pre baktérie (čiarkovaná šípka). Ak sa na CCF naviaže takáto látka (napr. lipopoly-sacharidy – LPS), CCF spustí vylúčenie proteínu SP z celómocytov. SP potom aktivuje proteín FET, ktorý je toxický pre baktérie (čiara s krížikom).

Aby ste otestovali svoju hypotézu, urobili ste niekoľko experimentov, v prvom z nich ste použili celómovú tekutinu získanú z dáždoviek odberom pomocou injekčnej striekačky. Túto celómovú tekutinu ste rôzne ošetrili (napr. odstránením buniek, či prídavkom LPS). Konkrétne varianty experimentu sú popísané v tabuľke. Následne ste vo vzorkách sledovali prítomnosť proteínov CCF, SP a FET. Označte v tabuľke, či v daných vzorkách očakávate (+) prítomnosť spomenutých proteínov, alebo nie (–), ak platí uvedená hypotéza.

	CCF	SP	FET
Celómová tekutina, z ktorej boli odstránené bunky, bez prídavku LPS.			
Celómová tekutina s bunkami, s prídavkom látky, ktorá spôsobuje rozpad buniek. Bez prídavku LPS.			
Celómová tekutina, z ktorej boli odstránené bunky, s prídavkom LPS.			
Celómová tekutina s bunkami a prídavkom LPS. Bunky boli odstránené 30 minút po pridaní LPS			

4. V druhom experimente ste sa rozhodli purifikovať proteíny CCF, SP a FET. Preto ste gény, ktoré ich kódujú, exprimovali v kultúre hmyzích buniek a z nich izolovali jednotlivé proteíny. Následne ste testovali, ktoré z nich sú samostatne, alebo v kombinácii toxické pre baktérie *Escherichia coli*. Jednotlivé proteíny alebo ich kombinácie ste najskôr inkubovali 30 minút pri 18 °C v pufri so zložením zodpovedajúcim celómovej tekutine a následne ste k nim pridali suspenziu baktérií. Po ďalšej inkubácii (2 hodiny) ste baktérie centrifugovali, premyli vodou a vysiali na Petriho misky so živným médiom. Nasledujúci deň ste vyhodnotili prežívanie na základe počtu vzniknutých kolónií (pozri graf).



Označte pre každé z nasledujúcich tvrdení, či ho získané dáta podporujú (+) alebo nie (-).

Proteín CCF slúži na rozoznávanie patogénov.	
Žiadny zo študovaných proteínov nie je samostatne toxický pre <i>E. coli</i> .	
Na zabitie buniek <i>E. coli</i> postačuje kombinácia proteínov SP a FET.	
SP aktivuje FET tak, že s ním vytvára komplex.	
SP aktivuje FET tak, že ho štípe a mení z neaktívneho proenzýmu na aktívny enzým.	
Ak k zmesi proteínov SP a FET pridáme proteín CCF, zvýši sa toxicita tejto zmesi pre baktérie.	
Samotný proteín FET nie je pre <i>E. coli</i> toxický preto, že táto baktéria bežne neinfikuje dáždovky.	
Výsledky experimentu nie sú v rozpore s hypotézou uvedenou v úlohe 3.	

5. Imunitné odpovede na infekciu sú v prípade nešpecifickej (vrodenej) aj špecifickej (adaptívnej) imunity iniciované rozoznaním molekúl charakteristických pre patogény, pričom na rozoznávanie týchto molekúl slúžia špecializované receptory. Tieto receptory sú v prípade adaptívnej imunity veľmi variabilné a generované náhodne, takže sa medzi nimi nájdu aj také, ktoré špecificky rozoznávajú konkrétne látky typické pre konkrétny patogén. Na druhej strane, receptory nešpecifickej imunity, tzv. PRR (*pattern recognition receptor*) sú rovnaké u všetkých jedincov a rozoznávajú látky charakteristické pre širšie spektrum patogénov, tzv. PAMP (*pathogen*

associated molecular pattern). PRR sú teda veľmi dôležité pre rozlíšenie potenciálneho nebezpečenstva a iniciáciu imunitnej odpovede (napr. fagocytóza, produkcia obranných a signálnych molekúl atď.). To znamená, že ako PAMP mohli byť v evolúcii využité iba niektoré látky produkované patogénom. Označte (+) tie vlastnosti, ktoré by podľa vás mali mať molekuly použiteľné ako PAMP. Vlastnosti, ktoré nie sú vhodné pre PAMP označte (-).

sú esenciálne pre prežitie patogénu	
sú evolučne konzervované a vyskytujú sa u širšej skupiny patogénov	
sú vysoko variabilné a charakteristické pre konkrétne patogény	
sú produkované patogénom a aj jeho hostiteľom	
sú produkované v neskorom štádiu infekcie patogénom	
sú produkované výlučne hostiteľom vtedy, keď nie je infikovaný	

6. Okrem imunitných buniek a molekúl sú organizmy chránené voči infekcii aj prirodzenými bariérami, ktoré poskytujú tzv. pasívnu ochranu nezávisle na prítomnosti infekcie. U človeka medzi takéto bariéry patria koža a sliznice. Napíšte aspoň tri mechanizmy, ktorými tieto bariéry bránia infekcii.

7. Vo svojom preparáte ste si iste všimli aj zhluky celómocytov. Napíšte, ako môže byť schopnosť týchto buniek vytvárať zhluky využitá pri obrane proti mnohobunkovým parazitom (napríklad hlístovcom).

Autor: Bc. Jaroslav Ferenc
 Recenzia: Mgr. Tomáš Augustín

Redakčná úprava: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD.
 Slovenská komisia Biologickej olympiády
 Vydal: IUVENTA Slovenský inštitút mládeže, Bratislava 2016