

ZÁRÓJELENTÉS

Makrofág adenozin receptorok szepszisben

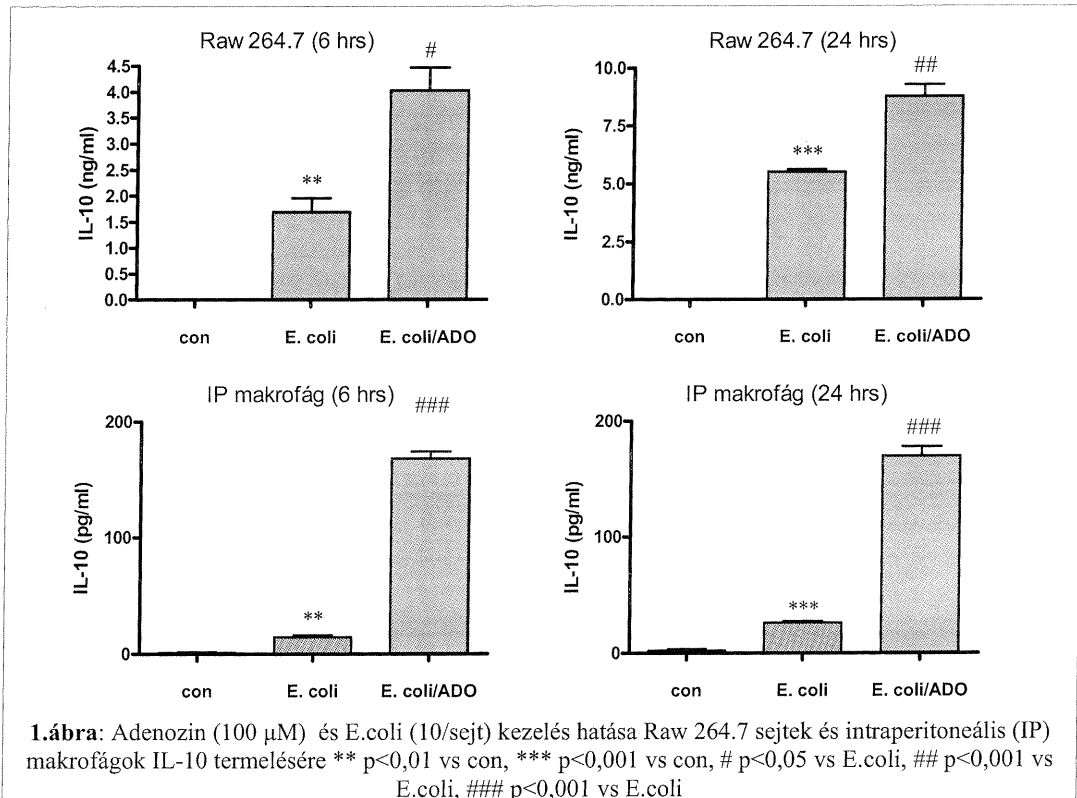
Nyilvántartási szám: OTKA K 73110

Projekt időtartama: 2008.04.01-2010.02.02.

Témavezető: Dr. Haskó György

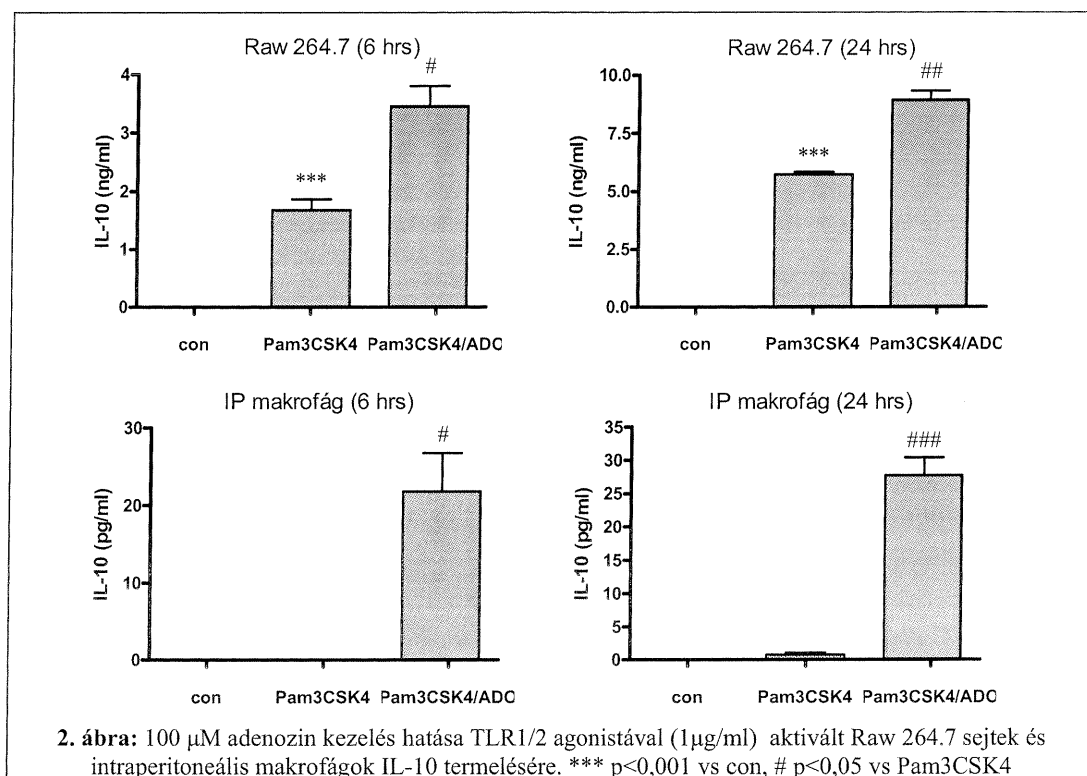
Kutatási eredmények:

A projekt során először a különböző mintázat felismerő receptorok (Pattern Recognition Receptor - PRR) szerepét vizsgáltuk makrofágok interleukin (IL)-10 termelésének szabályozásában. Az *Escherichia coli* kezelés IL-10 termelést indukál makrofágokban, az adenozin kezelés pedig tovább növeli az IL-10 felszabadulást (1. ábra).

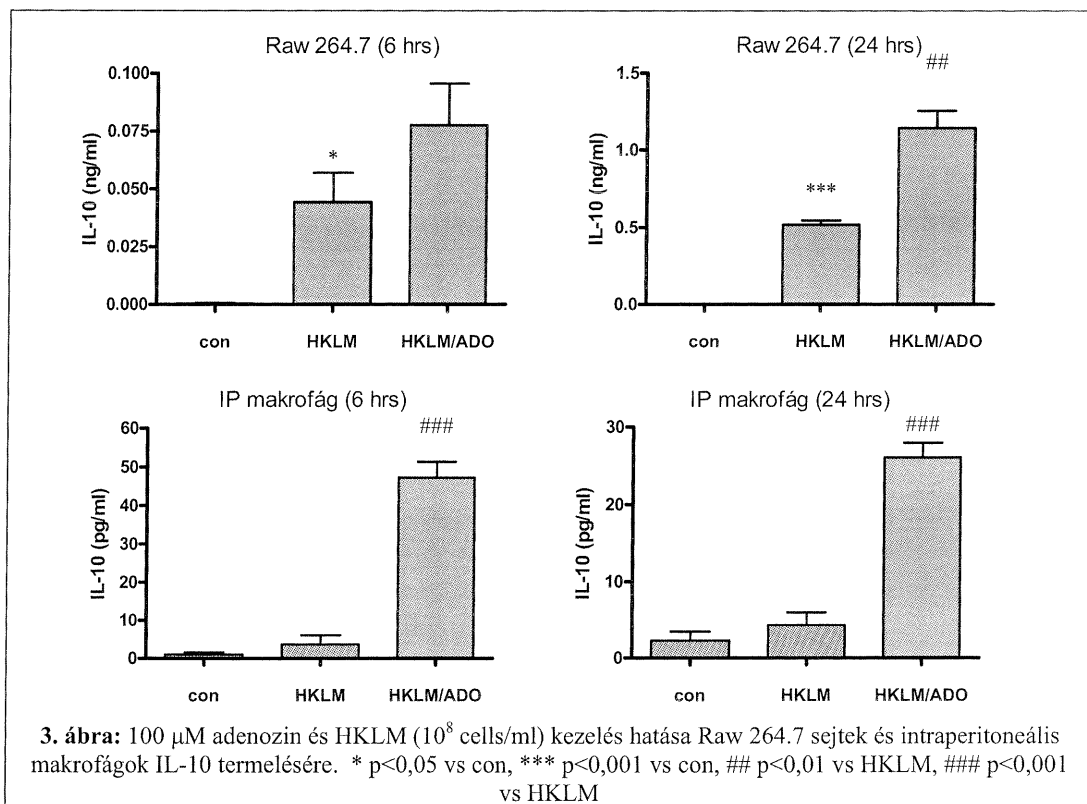


A folyamatban szerepet játszó Toll-szerű receptor (TLR) azonosításához a kísérleteink során intraperitoneális makrofágokat, illetve a Raw 264.7 makrofág sejtvonalat kezeltünk adenozin jelenlétében illetve hiányában különböző TLR agonistákkal 6 illetve 24 óráig majd a felülírókból meghatároztuk az IL-10 koncentrációkat ELISA segítségével. A felhasznált TLR agonisták a következők voltak: TLR1/2 ligandum szintetikus lipopeptid Pam3CSK4, a TLR2-höz kötődő hővel előlt *Listeria monocytogenes* (HKLM), a szintetikus kétszálú RNS analóg PolyI:C (TLR3), TLR4 által felismert lipopoliszacharid (LPS), a TLR5 agonista flagellin, a szintetikus lipoprotein FSL1 (TLR6/2), egyszálú RNS (ssRNS) (TLR7), és a szintetikus oligonukleotid ODN1826 (TLR9).

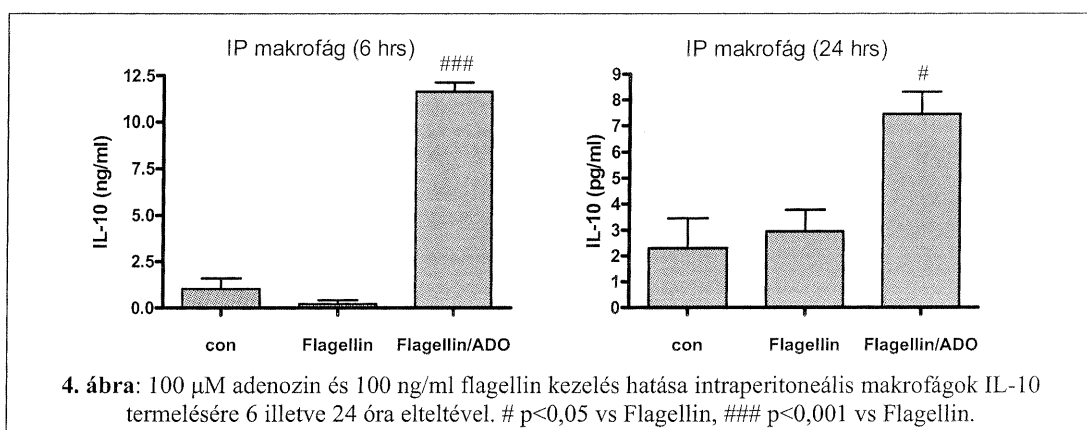
Eredményeink szerint a Pam3CSK4 kezelés IL-10 termelést indukált a Raw264.7 sejtekben már hat órás inkubáció után. Az adozin kezelés pedig növelte az IL-10 termelést. Primer makrofágokban azonban a TLR1/2 aktiváció csak adozin jelenlétében indukált IL-10 termelést (2. ábra).



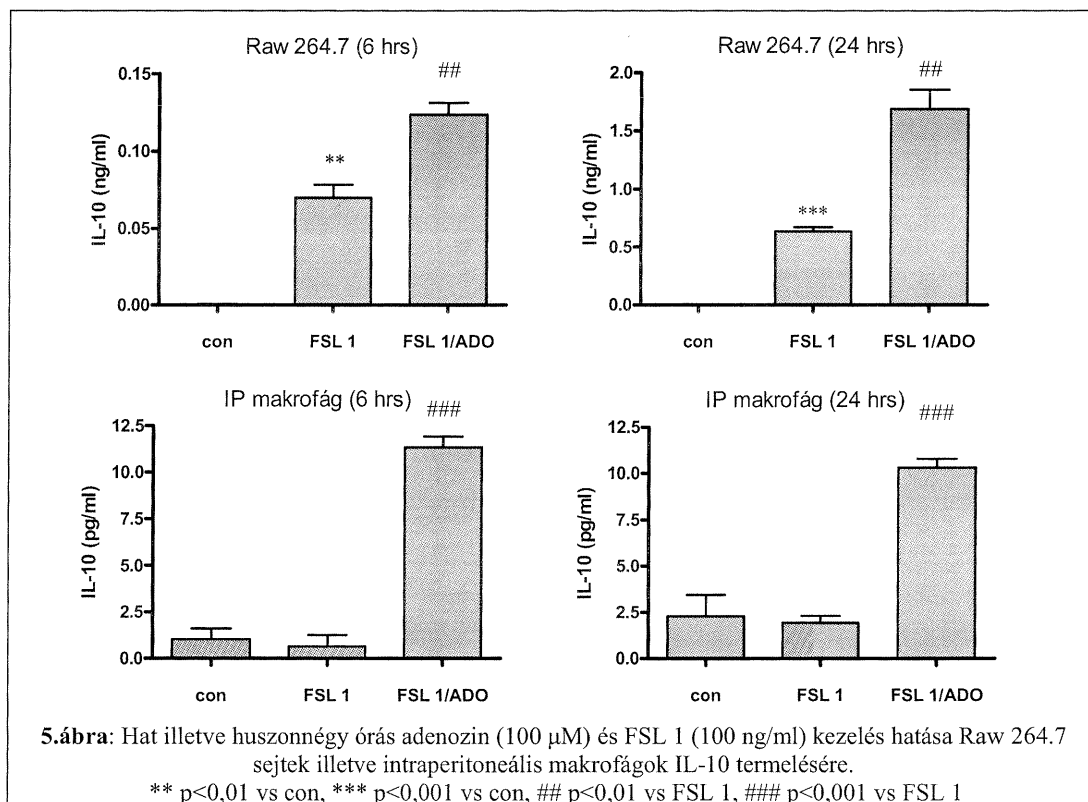
A hat illetve huszonnégy órás HKLM illetve LPS kezelés Raw 264.7 sejtekben IL-10 szekréciót váltott ki, amelyet az adozin receptor aktiváció tovább növelt, a primer makrofágokban ezzel szemben csak adozin jelenlétében indukáltak IL-10 szekréciót az említett TLR ligandumok (3. ábra).



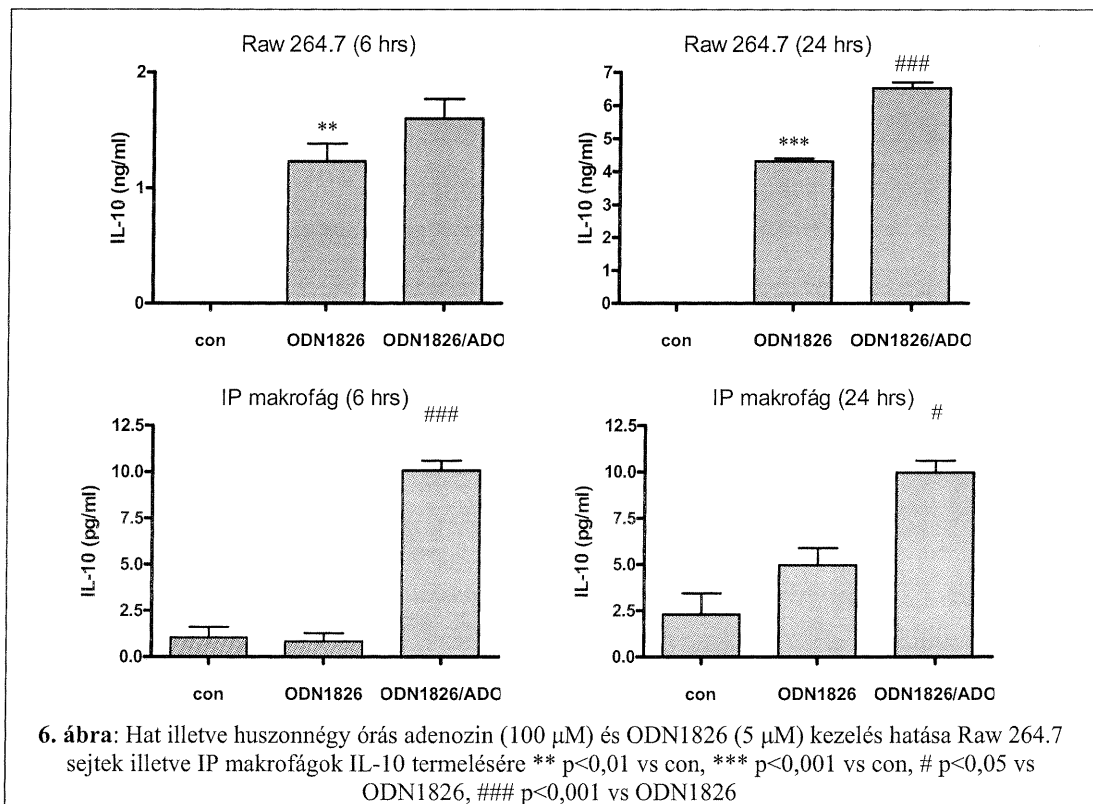
A 24 órás polyI:C kezelés csak Raw 264.7 sejtekben indukálta az általunk vizsgált citokin termelését, az adozin kezelésnek azonban nem volt szignifikáns hatása. A flagellin ezzel szemben csak primer sejtekben idézett elő IL-10 termelést adozin jelenlétében (4.ábra).



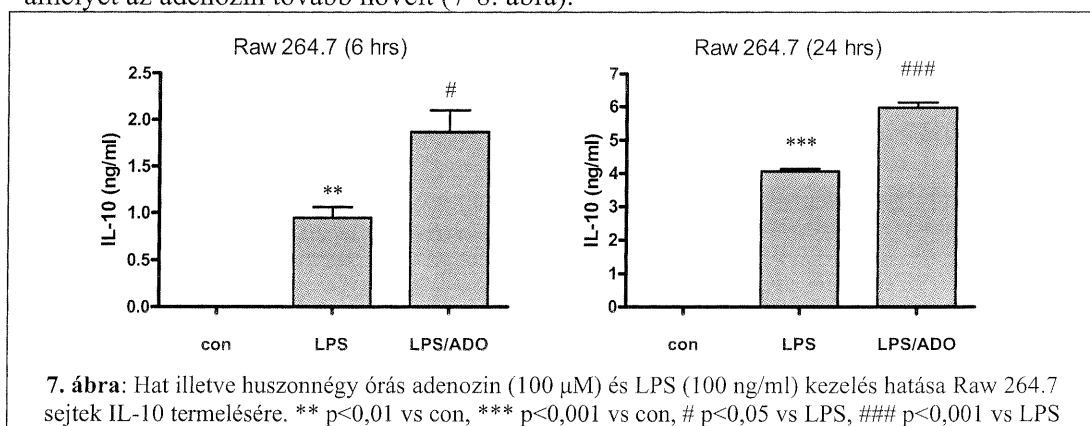
Ehhez hasonlóan viselkedtek az IP makrofágok FSL1 kezelés hatására is, a Raw 264.7 sejteknél azonban hasonló kezelés adenzin hiányában is indukált IL-10 szekréciót (5.ábra).

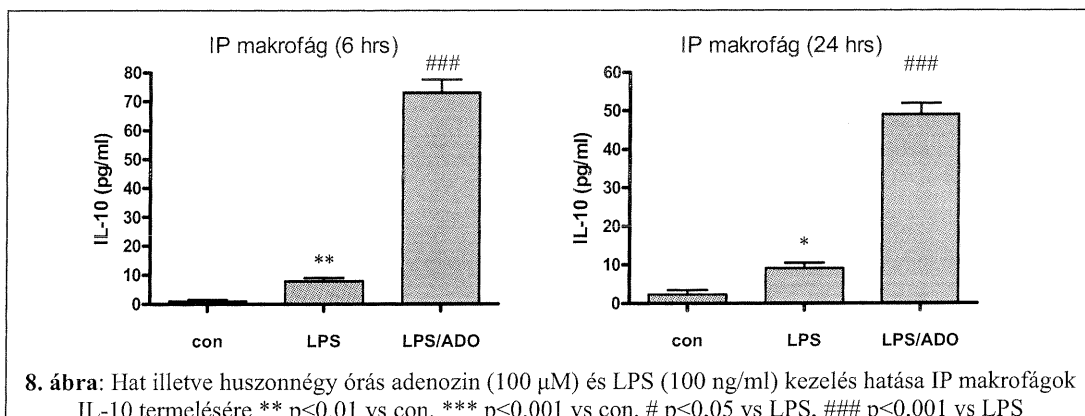


Az ssRNS egyik sejt típusnál sem váltott ki IL-10 termelést, az ODN1826 kezelés azonban Raw 264.7 sejtek esetében mind adenzin jelenlétében, mind hiányában indukálta a gyulladáscsökkentő citokin felszabadulását (6.ábra), IP makrofágoknál azonban csak adenzin jelenlétében volt detektálható IL-10 termelés a TLR9 aktivációt követően.



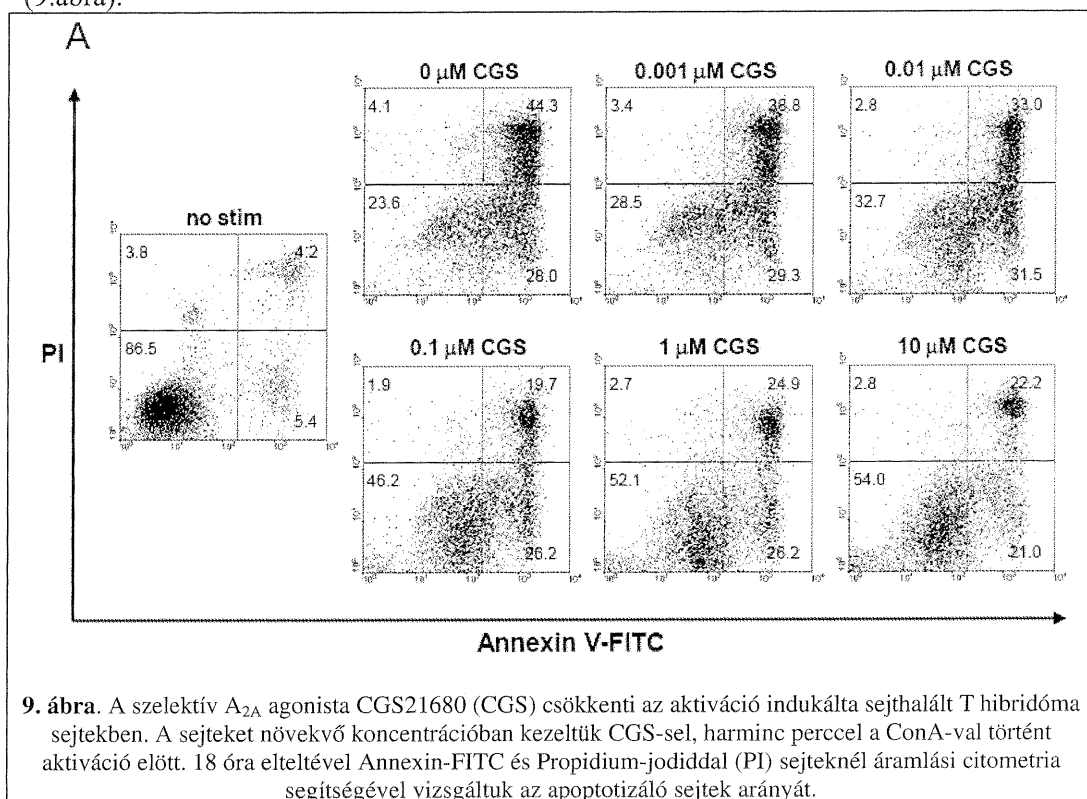
Az LPS kezelés minden vizsgált sejttypusnál és időpontban IL-10 termelést indukált, amelyet az adenzin tovább növelt (7-8. ábra).





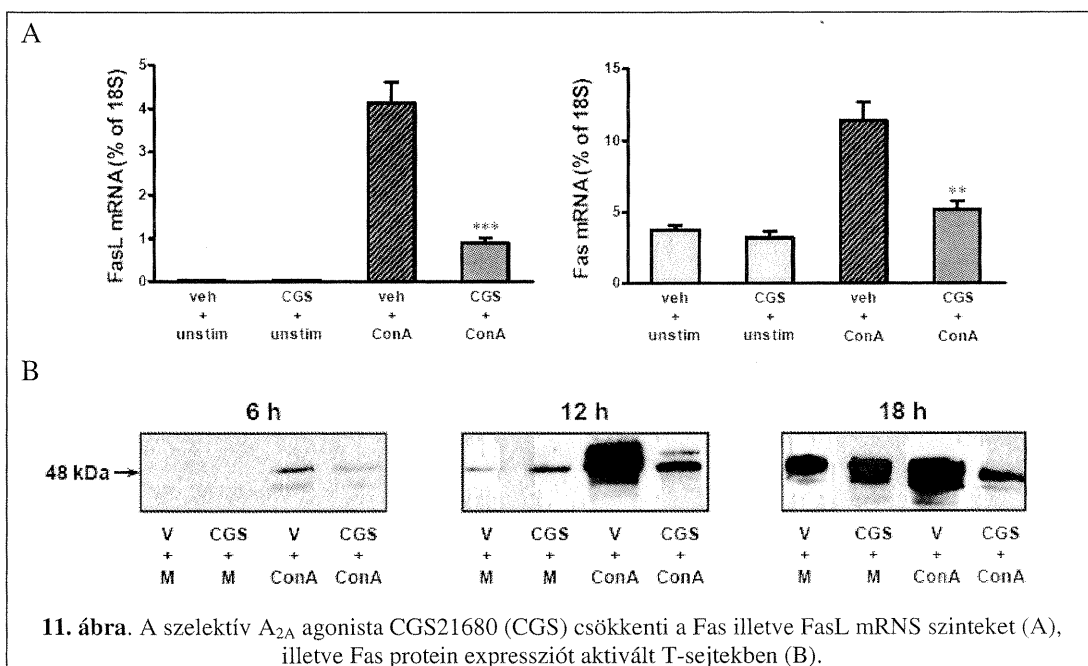
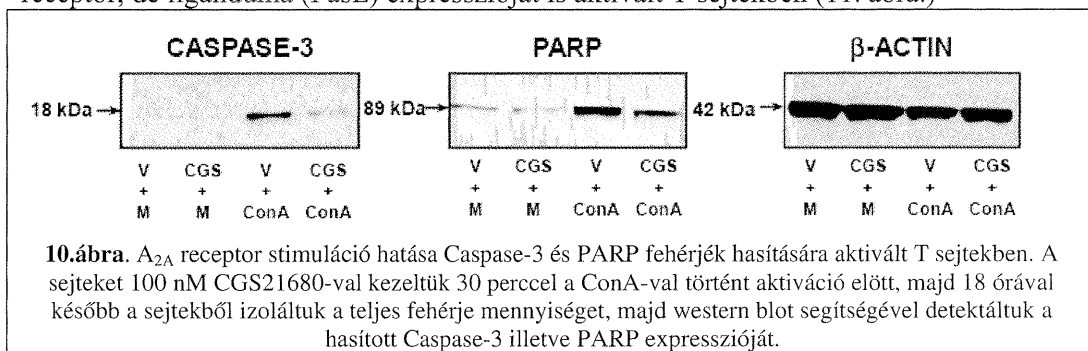
Az IP makrofágoknál a HKLM illetve az LPS, míg a Raw 264.7 sejteknél a PAM3CSK4, az LPS, illetve az ODN1826 kezelés esetében detektáltuk a legnagyobb mennyiségű IL-10 felszabadulást.

Az adozin a makrofág funkciók szabályozása mellett a T sejtek működésének szabályozásában is fontos szerepet tölt be. A következő kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy az adozin receptor aktiváció miként befolyásolja az aktiváció indukálta sejthalált (Activation Induced Cell Death-AICD). Áramlási citometriás méréseink során azt tapasztaltuk, hogy az A_{2A} receptor stimuláció csökkentette az Annexin V pozitív sejtek arányát Concanavalin A (ConA) kezeléssel aktivált egér T hibridóma sejteknél. (9.ábra).



Western blot kísérleteink során kapott eredményeink azt mutatták, hogy az adozin A_{2A} agonistával történő kezelés gátolja az AICD-ben fontos szerepet játszó caspase-3, illetve PARP fehérjék hasítását aktivált T sejtekben (10. ábra).

A Fas receptor szintén kulcs fontosságú az AICD során, kifejeződése jelentős mértékben nő T sejtekben aktiváció hatására, mind RNS mind protein szinten. Az adozin A_{2A} receptor stimuláció viszont szignifikánsan csökkentette nem csak a Fas receptor, de liganduma (FasL) expresszióját is aktivált T sejtekben (11. ábra).



Összefoglalva a projekt során szerzett adataink azt mutatják, hogy a szepszis során kulcsfontosságú gyulladáscsökkentő citokin, IL-10 makrofágokból történő felszabadulásában elsősorban a TLR2, illetve a TLR4 játszik szerepet. Az immortalizált sejtvonalon végzett kísérleteink azt mutatták, hogy a TLR1/2 heterodimer receptoroknak illetve a TLR9 receptornak is lehet szerepe a folyamatban. Eredményeink szerint az adenzin receptor stimuláció gátolja az aktiváció indukálta sejthalált egér T hibridóma sejtekben, csökkentve a hasított caspase-3 és PARP fehérjék mennyiségét illetve a Fas receptor és Fas ligand kifejeződését.