

Debreceni Egyetem
Orvosi- és Egészségtudományi Centrum

Az ATP és a P2X7 receptor szerepének vizsgálata különböző módon differenciáltatott humán makrofágok IL-1 β termelésében

Pályamunka



Készítette:

Danis Judit

Molekuláris biológia MSc II. évf.
ISM specializációs modul

Témavezetők:

Dr. Benkő Szilvia
Egyetemi adjunktus

Budai Marietta Margit
PhD hallgató

Bírálatra való beküldéshez hozzájárulok:

Prof. Dr. Csernoch László
Intézetigazgató

Dr. Bíró Tamás
Intézeti TDK felelős

Absztrakt

Az interleukin-1 β (IL-1 β) gyulladáscitokin fontos szerepet játszik a természetes és adaptív immunválasz összehangolásában. Inaktív formáját az NLRP3 inflammaszóma fehérjekomplex kaspáz-1 komponense hasítja érett formává. A komplex alegységeinek expresszióját az LPS indukálhatja, míg az aktivációt többek között az extracelluláris ATP-t érzékelő P2X7 receptor által indukált ionkoncentráció-változások okozzák.

Irodalom szerint a mikrokörnyezeti hatásoktól függően eltérő funkcióval rendelkező makrofágok differenciálódhatnak. MCSF jelenlétében főként a szövetregenerációban, míg GMCSF jelenlétében a gyulladáscitokin-folyamatokban résztvevő makrofágok képződnek, melyek számos tulajdonságukban, így citokintermelésükben is eltérnek. Munkánk során humán vérből izolált monocitákat MCSF vagy GMCSF jelenlétében differenciáltunk makrofágokká. Eredményeink szerint ATP hatására LPS kezelést követően, bár más időkinetikával, de mindkét makrofág típus képes IL-1 β citokint szekretálni. Érdekes módon azonban a GMCSF makrofágok hozzáadott ATP nélkül is képesek IL-1 β -t felszabadítani. Feltételeztük, hogy a GMCSF makrofágok a monocitákhoz hasonlóan képesek ATP-t szekretálni, ami auto- és parakrin módon visszahatva a sejtekre serkenti az IL-1 β termelést. Munkánk során lumineszcens módszerrel vizsgálva a felülűzők ATP koncentrációját a GMCSF makrofágoknál magasabb ATP tartalmat mértünk, mint az MCSF makrofágok esetében. Ezt a GMCSF makrofágok fokozott ATP szekréciója, mellett az is befolyásolja, hogy eredményeink szerint az ATP-t AMP-vé bontó CD39 ekto-ATPáz mRNS expressziója az MCSF makrofágokban erősebb, mint a GMCSF makrofágokban. Ezen adataink arra utaltak, hogy a GMCSF makrofágokban a szekretált ATP-nek szerepe lehet az LPS indukált IL-1 β termelésben. Ugyanakkor specifikus inhibitorral gátolva a P2X7 receptort nem sikerült megakadályoznunk az IL-1 β szekréciót, valamint a szekretált ATP-t hidrolizáló kezelés hatására sem tapasztaltunk csökkent IL-1 β termelést.

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a GMCSF makrofágok LPS indukált IL-1 β szekréciójában a P2X7 receptornak csekély jelentősége van, így eredményeink felvetik egyéb purinoceptorok illetve más mechanizmusok szerepét a folyamatban.

Tartalomjegyzék

Absztrakt	2
Tartalomjegyzék	3
1. Bevezetés	4
1.1. A különböző makrofágok	4
1.2. Az interleukin-1 β	5
1.3. A NOD-like receptorok	6
1.4. Az inflammoszómák	8
1.5. Az NLRP3 inflammoszóma aktivációs mechanizmusai	9
2. Célkitűzés	13
3. Anyag és módszer	14
3.1. Monocita szeparálás, makrofág differenciáltatás és kezelések	14
3.2. Western blot	14
3.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	15
3.4. RNS izolálás és qPCR technika	16
3.5. Az ATP koncentráció mérése	17
3.6. Statisztikai analízis	17
4. Eredmények	18
4.1. Az LPS indukálja az inflammoszómatagok és a proIL-1 β expresszióját	18
4.2. Az ATP kezelés szerepe a makrofágok IL-1 β szekréciójában	20
4.3. A P2X7 receptor expressziója	21
4.4. A P2X7 receptor szerepe az inflammoszóma exogén ATP általi aktivációjában	22
4.5. A GMCSF makrofágok ATP kezelés nélkül is szekretálnak IL-1 β -t	24
4.6. A makrofágok ATP termelése	24
4.7. A GMCSF makrofágok LPS indukált IL-1 β termelésében a P2X7 receptornak elhanyagolható a szerepe	26
4.8. Az extracelluláris ATP lebontása nem csökkenti az IL-1 β szekréciót	28
5. Diskusszió	30
6. Rövidítések jegyzéke	33
7. Irodalom	35
8. Köszönetnyilvánítás	39
Függelék	40

1. Bevezetés

1.1. A különböző makrofágok

A monociták és a makrofágok a természetes immunrendszer fagocita sejtjei közé tartoznak. A monociták a keringésben találhatóak, míg a szövetekbe kilépve a környezeti faktoroktól függően makrofágokká illetve dendritikus sejtekké differenciálódnak. A makrofágok az elsődleges védelmi vonal részeként fontos szerepet játszanak a természetes immunitás gyors aktivációjában.

A makrofágok dinamikus és heterogén sejtek, tulajdonságaik a differenciáció és aktiváció helyétől és módjától függenek. Hagyományosan a makrofágokat az aktivációjuk szerint M1 és M2 makrofág csoportba sorolják, melyek főként receptor, citokin és kemokin expressziójukban, valamint az effektor funkcióikban térnek el. Az M1 makrofágok a gyulladásban játszanak szerepet, bakteriális termékekkel illetve IFN- γ -val aktiváltak. Az M2 makrofágoknak inkább immunmodulátor szerepet tulajdonítanak, ezek IL-4 vagy IL-13 (M2a), IL-1 és TLR ligandumok (M2b) vagy IL-10 és glükokortikoidok (M2c) hatására alakulnak ki (Benoit et al., 2008). Mivel ez a felosztás a makrofágok aktivációján, és nem a differenciációján alapul, ezért ebbe a rendszerbe nem lehet teljesen beleilleszteni a makrofág kolóniastimuláló faktorról (M-CSF) illetve granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktorra (GM-CSF) differenciáltatott sejteket. A GM-CSF jelenlétében differenciáltatott makrofágok gyulladásszerű, antibakteriális tulajdonságokkal rendelkeznek, az M-CSF jelenlétében differenciáltatott makrofágok főleg immunmodulátor citokineket (pl. IL-10) termelnek, ezáltal előbbiek M1-szerű, míg utóbbiak M2-szerű makrofágoknak tekinthetők (Fleetwood et al., 2007; Lacey et al., 2012).

Általában a szöveti makrofágok modellezésére az M-CSF-fel differenciáltatott makrofágokat használják, míg a GM-CSF-fel differenciáltatott makrofágokat a dendritikus sejtek megfelelőinek tartják, a génexpressziós és bioinformatikai analízisek azonban azt mutatják, hogy ezek a sejtek is inkább makrofágok, mint dendritikus sejtek (Lacey et al., 2012).

A gyulladásszerű és anti-inflammatorikus makrofágoknak nélkülözhetetlen szerepük van egyes fertőzések és krónikus betegségek patogenezisében, ezért tulajdonságaik és funkcióik megismerése nagyon fontos. Az akut gyulladásokban az M1-szerű makrofágoknak van szerepük, de elnyúló aktivációjuk letális lehet. A krónikus gyulladások kialakulásában inkább az M2-szerű makrofágoknak van szerepük, amelyek lehetővé teszik egyes patogének számára

a szövetekbe való perzisztálást és a betegség krónikussá alakulását (Benoit et al., 2008). A tumorokban a kétféle makrofág eltolt aránya figyelhető meg, a tumorok odavonzzák az M2-szerű makrofágokat, amik kevésbé immunogének és serkentik a tumorok növekedését (Cassetta et al., 2011).

A kétféle makrofág citokintermelése is eltérő. A GMCSF makrofágok, gyulladáshoz vezető aktivitásuknak megfelelően elsősorban különböző gyulladáshoz vezető citokineket (pl. IL-6-ot, IL-8-at, IL-1 β -t, TNF- α -t) szekretálnak nagyobb mennyiségben. Az M1CSF makrofágok ugyanakkor inkább immunmodulátor citokineket, elsősorban IL-10-et szekretálnak.

1.2. Az interleukin-1 β

Az interleukin-1 β egy gyulladáshoz vezető citokin, melynek termelését főként mikrobiális jelek indukálják, többek között makrofágokban, monocitákban, dendritikus sejtekben, valamint a hivatásosan nem immunsejtnek minősülő epitel sejtekben is. Pleiotróp hatásait nem csak lokálisan, hanem szisztémásan is kifejti. Számos szabályozó szereppel rendelkezik, mind a természetes, mind az adaptív immunrendszerben. Az IL-1 β serkenti a saját és egyéb gyulladáshoz vezető citokinek (IL-6, TNF- α) expresszióját, így fertőzés esetén elősegíti a megfelelő immunválasz kialakulását, az akut fázis fehérjék termelésén keresztül pedig szisztémásan is befolyásolja a testhőmérsékletet (láz), az immunsejtek aktivitását és a kórokozók elleni védekezési mechanizmus kialakulását. Az IL-1 β limfocita aktiváló hatással is rendelkezik, többek között serkenti a B-sejtek mitogén szignálok által indukált proliferációját, stimulálja a naiv T-sejtek T_h17 irányú polarizációját, valamint az antigén prezentáló sejtek által termelt IL-1 β elősegíti mind a naiv, mind a memória T-sejtek proliferációját (Sims, Smith, 2010). Irodalmi adatok szerint az IL-1 β -nak patológias folyamatokban is szerepe lehet, így többek között segíti a daganatok proliferációját, emellett számos krónikus gyulladáshoz vezető betegségben (pl. Crohn-betegség, Alzheimer-kór, köszvény) illetve autoimmun betegségben (pl. reumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus) az IL-1 β tartósan emelkedett szintjét mutatták ki. Ezen betegségek tünetei monoklonális anti-IL-1 β antitestek alkalmazásával csökkenthetők (Schroder, Tschopp, 2010; Shaw et al., 2011; Strowig et al., 2012).

Az IL-1 β prekursor, éretlen citokin formában szintetizálódik. Transzkripcióját a mintázatfelismerő receptorok (pl. Toll-like receptorok, TLR-ek) által beindított jelátviteli útvonalak indukálják, poszttranszlációs hasítását az úgynevezett inflammoszóma fehérje komplexek végzik. A citokin nem a klasszikus szekréciós útvonalon keresztül szekretálódik, mivel nem tartalmazza a szekrécióhoz szükséges szignálpeptid-szekvenciát. Számos elmélet létezik, melyek szerint multivezikuláris testek vagy szekréciós lizoszómák formájában

szekretálódik, illetve membrán transzportereken keresztül vagy a sejt lízise során szabadul fel. A vizsgálatok szerint mindegyik mechanizmus működhet, de a szekréció mechanizmusa végső soron a sejtípustól függ (Eder, 2009).

1.3. A NOD-like receptorok

Hagyományosan a természetes immunrendszert tartjuk az elsődleges védelmi vonalnak, amely gyors, de nem specifikus védelmi reakciót biztosít a károsító ágensek ellen. Ahhoz, hogy képes legyen ellátni feladatát, a természetes immunrendszernek meg kell tudnia különböztetni a külső és belső környezetből származó ártalmatlan jeleket (pl. a normál flórát) a veszélyt jelző jelektől (patogének, celluláris stressz). Az immunrendszer sejtjei a mintázatfelismerő receptorokkal (PRR) ismerik fel a konzervált, patogénekkal asszociáltak molekuláris mintázatokat (PAMP) vagy a saját szervezetből érkező veszélyt jelző molekulákat (DAMP) (Kersse et al., 2011). Utóbbiak közé tartoznak a metabolikus stresszt jelző magas glükóz-koncentráció, a koleszterin, a fibrilláris β -amiloid, a biglikán, az ATP és a húgysav (Gombault et al., 2012).

A mintázatfelismerő receptorokat jellemzően a makrofágok, monociták, dendritikus sejtek, neutrofil granulociták és epitél sejtek fejezik ki, de az adaptív immunrendszer sejtjein is megtalálhatók. A receptorok aktivációját követően a patogéntől és az érzékelő sejt típusától függő reakció figyelhető meg (Schroder, Tschopp, 2010).

A mintázatfelismerő receptorok lehetnek szolubilisek, ezek közé tartozik pl. a mannóz-kötő lektin. Elhelyezkedhetnek membránhoz kötötten is, amelyek közé tartoznak a Toll-like receptorok (TLR). Eddig 12 TLR-t írtak le, melyek más-más mikrobiális mintázatot ismernek fel, többek között ligandjuk lehet a Gram(-) baktériumok sejtfaalkotó komponense, a lipopoliszacharid (LPS), bakteriális lipoprotein (BLP), peptidoglikán (PGN), lipoteikolsav (LTA). A TLR-ek közös jellemzője a leucin gazdag ismétlődéseket tartalmazó régiójuk (LRR), ami a mikrobiális mintázat érzékeléséért felelős.

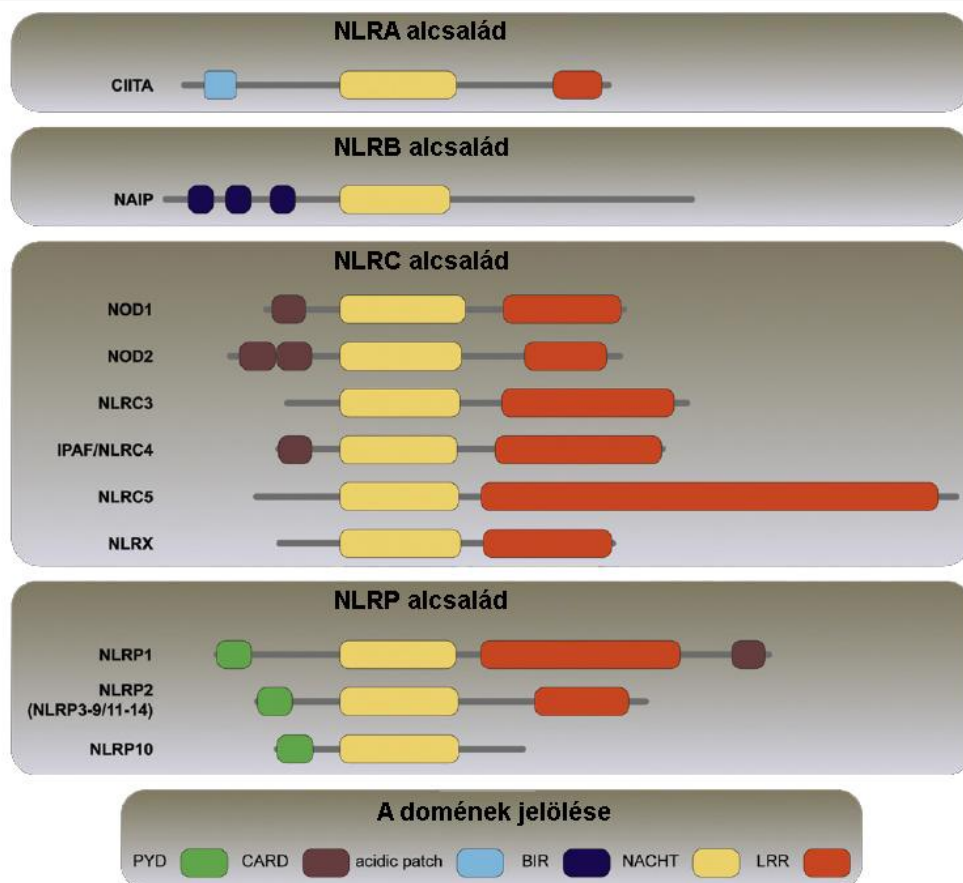
A mintázatfelismerő receptorok harmadik csoportját az intracellulárisan elhelyezkedő receptorok alkotják, melyek szintén rendelkeznek egy leucin gazdag ismétlődéseket tartalmazó doménnel, amely a TLR-ek LRR-jéhez hasonlóan a mintázatfelismerésben vesz részt. A intracelluláris mintázatfelismerő receptorok közé tartoznak NOD-like receptorok (NLR) is. Az NLR-ek a patogén- és veszélyasszociált mintázatok széles skáláját ismerik fel, beindítva egy jelátviteli kaszkádot, ami a természetes immunválasz kialakulását segíti elő. Az NLR család tagjai számos sejt folyamatban vesznek részt: a jelátviteli útvonalak szabályozásán keresztül befolyásolják a citokinek és kemokinek termelődését, szerepük van az autofágiában,

az I. típusú interferonok (IFN) jelátvitelében, valamint az inflammoszómák összeszerelésében és a kaszpáz-1 aktivációban, mely az IL-1 β termeléséhez, illetve piroptózishoz vezethet (Kersse et al., 2011).

Az NLR családnak emberben 22 tagja van, közös jellemzőjük, hogy tartalmazznak egy NACHT-domént, ami a nukleotidok kötéséért felel. Általában C-terminálisan leucin gazdag ismétlődések (LRR) találhatóak, az N-terminális régióban pedig egy effektor modul van. Az NLR-eket az effektor domén szerkezete alapján alcsaládokba csoportosítják (1. ábra). Az NLRA alcsaládba a savas transzaktivációs doménnal rendelkező CIITA tartozik. A NLRB alcsaládba a BIR (baculovirus inhibitor repeat) domént tartalmazó NLR-ek tartoznak. Az NLRC alcsalád tagjainak N-terminális doménje a CARD (caspase activation and recruitment domain), a PYD (pirin) domént tartalmazó NLR-ek az NLRP alcsaládba tartoznak (Kersse et al., 2011). Az NLR család természetes immunrendszerben betöltött jelentős szerepére utal a molekulák evolúciós konzerváltsága, ami megfigyelhető mind a gerincesek, mind a gerinctelenek körében, valamint a növényekben is. Az NLR-ek rokonai a növények rezisztencia-fehérjéi (R-fehérjéi), melyek hasonló doménszerkezettel rendelkeznek, és a fitopatogének elleni védelemben van szerepük (Benko et al., 2008).

Az NLR-ek jelentőségét bizonyítja, hogy szerepüket számos betegség kialakulásában leírták. Így pl. a CIITA funkcióvesztéses mutációja a bare lymphocyte syndrome (BLS – csupasz limfocita szindróma) kialakulásához vezet, a NOD2 mutációinak a Crohn-betegség illetve a Blau-szindróma kialakulásában van szerepe (Kersse et al., 2011), míg a NOD1 mutációja csökkenti a sejtek az apoptózis iránti érzékenységet, így tumorképződést indukálhat (Da Silva Correia et al., 2006), valamint számos túlérzékenységi reakcióban, így az allergiás asztma folyamatában is kimutatták hajlamosító tényezőként.

Az NLR család fehérjék nagy részének működése még a mai napig nem teljesen tisztázott. Ugyanakkor a család már karakterizált tagjainak minenyikéről kimutatták, hogy működésük során fehérjekomplexeket alkotnak valamilyen adaptor- vagy enzimfehérjével. Ezek a fehérjekomplexek pl. a szignallszómák és az inflammoszómák.



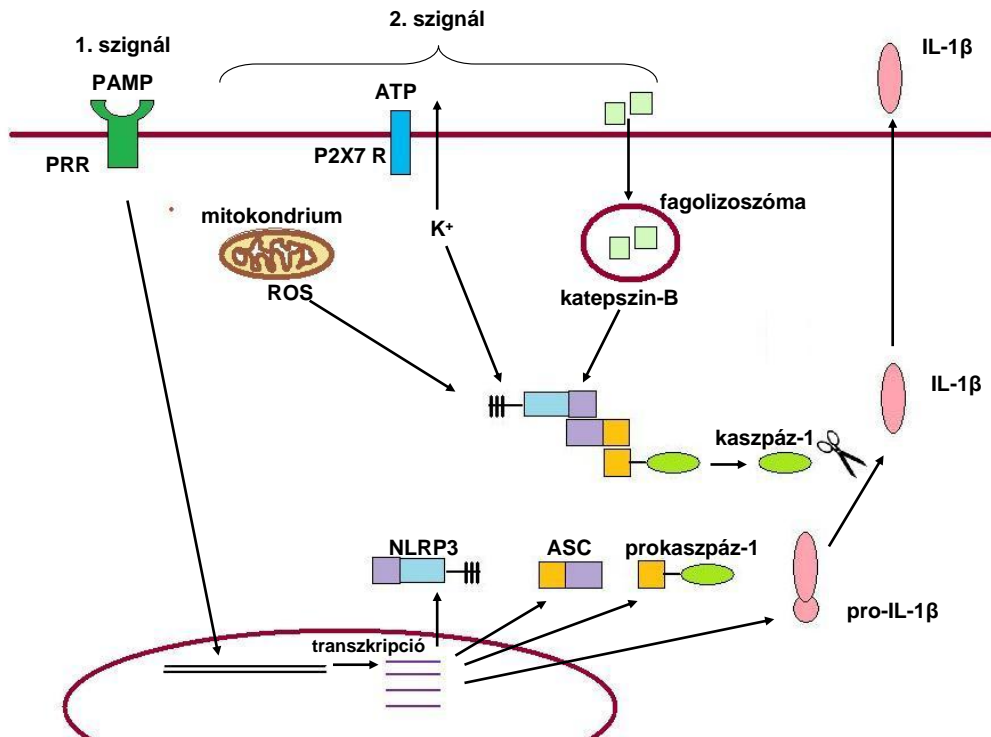
1. ábra. Az NLR-ek alcsaládjai az N-terminális doménjeik alapján. (Kersse et al., 2011). PYD – pirin domén, CARD – caspase activation and recruitment domain, acidic patch – savas transzaktivációs domén, BIR – baculovirus inhibitor repeat, NACHT – nucleotide-binding and oligomerization domain, LRR – leucine rich repeat.

1.4. Az inflammoszómák

Az inflammoszómák olyan multimolekuláris fehérjekomplexek, amelyek feladata az IL-1 β konvertáló enzim (ICE) vagy más néven a kaszpáz-1 molekula aktiválása, amely az inaktív proIL-1 β formát érett IL-1 β -vá hasítja. A kb. 700 kDa méretű inflammoszómák szenzor és adaptor molekulából állnak, amihez a prokaspáz-1 csatlakozik. Az inflammoszómák nevét a komplexben található szenzor határozza meg (2.ábra). Így megkülönböztetjük a kettős szálú DNS-t érzékelő AIM2 inflammoszómát, illetve az NLR családba tartozó fehérjéket tartalmazó inflammoszómákat, melyek közé tartozik az NLRP1 inflammoszóma, ami a *Bacillus anthracis* letális toxinját érzékeli, a flagellint érzékelő NLRC4, inflammoszóma, valamint a számos patogén és veszélyt jelző stimulust érzékelő NLRP3 inflammoszóma.

Az inflammoszómák tagjainak mutációit számos betegséggel összefüggésbe hozták. Ezek közé tartoznak olyan betegségek, mint a vitiligo illetve az Addison-kór, melyek kialakításában az NLRP1 bizonyos polimorfizmusai játszanak szerepet. Az NLRP6 funkcióvesztéses

Az NLRP3 inflammoszóma aktiválási mechanizmusáról az elmúlt évek kutatásai alapján három modellt írtak le: (1) a lizoszóma szétesésekor felszabaduló molekulák érzékelése, (2) a reaktív oxigéngyökök általi aktiváció, valamint (3) az ATP szenzitív P2X7 receptor aktivációját követő K^+ kiáramlás (3. ábra).



3. ábra. Az NLRP3 inflammoszóma aktivációja két szignált igényel. (Anand et al., 2011 alapján). A mintázatfelismerő receptorok (PRR) által beindított jelátviteli útvonalak (1. szignál) indukálják az inflammoszómatagok és a pro-IL-1 β expresszióját, majd a 2. szignál (P2X7 receptor aktivációja, ROS, katepszin-B) aktiválja az inflammoszómát.

Az egyik modell szerint a fagocitózist követően kialakuló lizoszóma szétesése elősegíti az NLRP3 inflammoszóma aktivációját. Sokféle mesterséges és természetes eredetű kristályos molekula, valamint a metabolikus stresszből származó molekulák képesek a második szignált, illetve adott esetben az első szignált is biztosítani az inflammoszóma aktivációhoz. Ilyen mesterséges kristályok pl. az azbeszt és szilícium kristályok, valamint az adjuvánsként alkalmazott alumínium sók, míg természetes kristályos és részecske természetű aktivátorok a húgysav kristályok és a fibrilláris amiloid- β . A patogének közül az intracelluláris patogén *Listeria monocytogenes* listeriolizin-O molekulája is elősegíti a fagoszóma felbomlását, és az NLRP3 inflammoszóma aktivációját (Anand et al., 2011). Az inflammoszóma aktivációban a lizoszóma és fagoszóma fúzionálásakor felszabaduló lizoszómális komponenseknek, főleg a katepszin-B-nek tulajdonítanak fontos szerepet. Egyes betegségekben felhalmozódnak részecske vagy kristályos természetű molekulák, pl. köszvény esetén a húgysav kristályok,

Alzheimer-kórban a fibrilláris β -amiloid, érelmeszesedés során a koleszterin, melyek szintén az inflammoszóma aktivációján keresztül gyulladást okoznak a szervezetben, hozzájárulva a kórképek patogenitásához (Kersse et al., 2011; Lamkanfi et al., 2011; Shaw et al., 2011).

Egy másik modell szerint a reaktív oxigéngyököknek (ROS) is fontos szerepük van az inflammoszóma aktivációban. A ROS felszabadítása a nem specifikus immunreakció evolúciósan konzervált része. Az eddigi vizsgálatok azt mutatják, hogy az NLRP3 aktivációs mechanizmusai egyben ROS-felszabaduláshoz is vezethetnek, ami felveti a ROS lehetséges reguláló szerepét az NLRP3 inflammoszóma aktivációjában. A ROS-t semlegesítő anyagok alkalmazásával gátolható az NLRP3 inflammoszóma aktivációja, ami a ROS szerepére utal az inflammoszóma aktivációjában. A reaktív oxigéngyökök inflammoszóma aktivációs tulajdonsága bizonyos patológiás kórképek kialakításában is részt vesz. A pollenszemcsék által a légzőrendszerben kialakított allergiás tünetek megjelenéséért többek között a megemelkedett IL-1 β szint felelős, melynek termelődését a pollenszemcsék NADPH-oxidáz enzime által termelt reaktív oxigéngyökök segítik elő. Munkacsoportunk a közelmúltban (Varga et al., 2012) kimutatta, hogy LPS-sel kezelt THP-1 makrofágokban az NLRP3 inflammoszóma aktivációja és az IL-1 β szekréciója pollen kivonat és NADPH jelenlétében a ROS termelésén keresztül jelentősen fokozódik. Számos irodalmi adat azonban arra utal, hogy a ROS-nak inkább kiegészítő szerepe lehet a többi NLRP3 inflammoszómát aktiváló mechanizmus mellett (Schroder, Tschopp, 2010).

A harmadik aktivációs mechanizmus a P2X7 receptor aktivációját követő K⁺ kiáramlás. A receptor N- és C-terminális régiója intracellulárisan helyezkedik el, köztük két transzmembrán régióval. Az extracelluláris hurkon cisztein, lizin és fenilalanin aminosavak formálják az ATP kötéséért felelős régiót. Az extracelluláris ATP kötődésére egy kationspecifikus csatorna gyors nyitódása következik be, aminek eredményeképpen az intracelluláris Na⁺ és Ca⁺⁺ koncentráció emelkedik, míg a K⁺ koncentráció csökken, ami az NLRP3 inflammoszóma aktivációjához vezet (Miller et al., 2011). Irodalmi adatok szerint magas extracelluláris K⁺ koncentráció esetén a sejtek nem képesek IL-1 β szekretálni (Perregaux, Gabel, 1994). Pétrilli és munkatársai (2007) kimutatták, hogy a fiziológiás intracelluláris K⁺ koncentráció gátolja az inflammoszóma aktivációját, így csökkenése szükségesnek tűnik az NLRP3 inflammoszóma aktivációjához. Ennek oka, hogy az ASC molekula csak csökkent K⁺ koncentráció esetén képes a prokaspáz-1-gyel összekapcsolódni. 70 mM-nál kisebb K⁺ koncentrációjú oldatban lizálva a sejteket az inflammoszóma spontán aktivációja volt megfigyelhető, míg efeletti koncentrációnál nem. Az intracelluláris K⁺ koncentráció csökkenése révén aktiválják az

NLRP3 inflammoszómát bizonyos mikrobiális pórusformáló toxinok is, így a nigericin, a *Staphylococcus aureus* α -hemolizinje, a maitotoxin és a gramicidin (Pétrilli et al., 2007).

Fiziológiás körülmények között a sejtek intracelluláris ATP koncentrációja 5-10 mM, ugyanakkor az extracelluláris térben nagyon alacsony. Szöveti károsodás vagy fertőzés esetén azonban a nekrotizáló sejtekből nagy mennyiségű ATP szabadul fel, ami biztosíthatja az NLRP3 inflammoszóma aktivációs szignálját a környező sejteknek. Ennek modellezésére *in vitro* körülmények között 2-5 mM koncentrációjú ATP-t használnak az LPS-sel kezelt sejtek IL-1 β felszabadításához. Ugyanakkor kimutatták, hogy humán primer monociták esetében az LPS kezelés önmagában elegendő az NLRP3 inflammoszóma aktivációjához és az IL-1 β szekrécióhoz. A kísérletekből származó eredmények alapján azt feltételezik, hogy a jelenség háttérében a monociták által szekretál ATP áll, ami auto- és parakrin módon visszahatva a sejtekre a P2X7 receptorokon keresztül az intracelluláris ionkoncentráció változását eredményezi (Netea et al., 2009; Piccini et al., 2008).

Fontos azonban kiemelni, hogy az egyes NLRP3 inflammoszóma aktivációs mechanizmus elméletek nem kizárólagosak, sokszor egyszerre kettő vagy mindhárom folyamat szerepet játszik az NLRP3 inflammoszóma aktivációjában. Riteau és munkatársai (2012) forbol-mirisztin-acetáttal (PMA-val) aktivált THP-1 makrofágokon kimutatták, hogy a sejtek a különböző részecske természetű anyagokkal történő kezelést követően ATP-t szekretáltak, ami a P2X7 receptorok keresztül autokrin módon serkentette az IL-1 β termelést. Más adatok szerint a P2X7 receptor aktivációját követő ionáramok a MAPK útvonalon keresztül a ROS képzést serkentik, a foszfolipáz-D aktivációjával pedig a fagoszóma és lizoszóma fúzióját segítik elő, így ezeken a folyamatokon keresztül is serkenthető az inflammoszóma aktivációja (Miller et al., 2011).

2. Célkitűzés

Az NLRP3 inflammoszóma az egyik legintenzívebben tanulmányozott inflammoszóma komplex, ennek köszönhetően az aktiválási mechanizmusa általánosságban egyre jobban feltérképezett. Ugyanakkor az is egyre nyilvánvalóbb, hogy az NLRP3 inflammoszómán keresztüli IL-1 β termelést végső soron azok a molekuláris mechanizmusok határozzák meg, melyek az adott sejttípusra és szöveti környezetre jellemzőek.

Irodalmi és saját kutatási eredményeink alapján tudjuk, hogy míg az MCSF makrofágok kevés IL-1 β -t termelnek, addig a GMCSF makrofágok nagy mennyiségű IL-1 β -t szekretálnak. Munkánk során az MCSF illetve GMCSF jelenlétében differenciáltatott makrofágok eltérő IL-1 β termelésének molekuláris hátterét vizsgáltuk, különös tekintettel az NLRP3 inflammoszóma tagok expressziójára, és az NLRP3 inflammoszóma aktiválására. Az LPS-sel aktivált makrofágokon hozzáadott ATP hiányában és jelenlétében vizsgáltuk az IL-1 β szekréciót, valamint az ATP-t érzékelő P2X7 receptor expresszióját és szerepét a folyamatban.

Célunk volt továbbá a GMCSF makrofágok esetén meghatározni azokat a molekuláris mechanizmusokat, amelyek külsőleg adott második szignál nélkül is aktiválják az NLRP3 inflammoszómát, ennek részeként vizsgáltuk többek között a sejtek ATP termelését, valamint a P2X7 receptor szerepét a folyamatban.

3. Anyag és módszer

3.1. Monocita szeparálás, makrofág differenciáltatás és kezelések

Egészséges humán donorok perifériás véréből tartalmazó buffy coat-ból Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich) oldatra rétegzés után sűrűséggradiens centrifugálás segítségével (2500 rpm, 20 perc, 28 °C) mononukleáris sejteket (PBMC) választottunk el. A PBMC sejteket fiziológiás sóoldattal, majd MACS pufferrel (PBS puffer, amely 0,1% BSA-t és 2mM EDTA-t tartalmaz) mostuk. A PBMC-ből pozitív szelekció elve szerint CD14⁺ monocitákat választottunk el, anti-CD14 antitesttel konjugált paramágneses gyöngyöket (Milteny Biotec) felhasználva, a gyártó leírása szerint (Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation, Miltenyi Biotec, <http://www.miltenyibiotec.com>). A mágneses tér megszüntetésével a monocitákat eluáltuk az oszlopról.

A frissen izolált monocitákat $1,5 \times 10^6$ sejt/ml sűrűségben differenciáltattuk, 50 ng/ml koncentrációjú MCSF (PeproTech) vagy 80 ng/ml koncentrációjú GMCSF (Gentaur Molecular Products) jelenlétében 10% borjúsérumot (FCS), 2% L-glutamint és 1% penicillin-sztreptomocint tartalmazó RPMI 1640 (Gibco) tápoldatban. A sejteket 37 °C-on, 5%-os CO₂-tenzió mellett tenyésztettük, a tápoldatot a szeparálástól számított 2. napon frissre cseréltük. A sejteket 5 napon keresztül differenciáltattuk makrofággá.

A differenciáltott makrofágokat 2, 6, 12 vagy 24 órára 500 ng/ml koncentrációban lipopoliszachariddal (ultrapure LPS) kezeltük (Invitrogen). Ezután a felülúszót óvatosan leszívtuk, centrifugálás után a törmelékmentes felülúszó mintákat -20 °C-on tároltuk. A sejteket szérumentes tápoldatban 5 mM koncentrációjú ATP-vel kezeltük 45 percig, majd a sejteket felszedtük. A felülúszóból ELISA technikával citokineket mértünk, a sejtekből qPCR módszerrel mRNS és Western blot technikával fehérje expressziós vizsgálatokat végeztünk.

Egyes kísérletekben a P2X7 receptor specifikus gátlásához az A740003 (Sigma Aldrich) molekulát (A74) használtuk, 100 μM koncentrációban (Donnelly-Roberts, Jarvis, 2007). A felülúszó ATP tartalmának lebontásához apiráz enzimet (Sigma Aldrich) használtunk, melyet 2,5 U/ml koncentrációban alkalmaztunk.

3.2. Western blot

A sejteket 2× mintafelvívő-pufferben (62,5 mM Tris-HCl, 25% glicerol, 2% SDS, 1% brómfenolkék, 5% merkaptotanol) lizáltuk, majd 100 °C-on 10 percig főztük.

Az elektroforézis során az IL-1 β -t 15%-os, az aktint, prokaspáz-1-et és a P2X7 receptort 10%-os, az NLRP3-at 7,5%-os SDS-poliakrilamid gélben futtattuk, szobahőmérsékleten. Az gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra (BioRad) transzferáltuk.

A membránt TBS-Tween oldatban (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20 oldva, pH 7,6) mostuk, majd 5%-os tejben (5% zsírszegény tejpor TBS-Tween oldatban) 1 órán keresztül blokkoltuk a szabad kötőhelyeket. A membránt egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk az elsődleges antitestet 1:1000 hígításban tartalmazó 2,5%-os tejben (IL-1 β , Santa Cruz Biotechnology; hasított IL-1 β , Cell Signaling Technology; P2X7, Alomone Labs Ltd.; NLRP3, Enzo Life Sciences; prokaspáz-1, Santa Cruz Biotech). Ezután a membránt háromszor mostuk TBS-Tween oldatban, majd torna peroxidázzal konjugált másodlagos antinyúl antitesttel (Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technology) 1 órán keresztül inkubáltuk (1:2000 hígítás, 2,5%-os tejben), majd újabb mosás után detektáltuk a fehérjéket.

A membránokon kötődött fehérjék detektálásához ECL (Thermo Scientific) reagenseket használtunk 1:1 arányú elegyenben. Az előhíváshoz fényérzékeny filmet (Kodak) használtunk.

3.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

A sejtek felülúszójából IL-1 β citokint mutattunk ki szendvics ELISA módszerrel a gyártó leírása szerint. 96 lyukú ELISA plate-et az IL-1 β -ra specifikus monoklonális antitesttel (4 μ g/ml koncentrációban) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. A nem kötődött ellenanyagokat lemostuk PBS-Tween oldattal (0,12M NaCl, 3,2 mM KH₂PO₄, 10,5 mM Na₂HPO₄, 0,1% Tween oldva), majd a szabad kötőhelyeket 5% FCS-t tartalmazó PBS-Tween oldattal blokkoltuk. A standard és a minták hozzáadását két óra inkubáció követte, majd biotinált monoklonális (BD OptEIA Human IL-1 β ELISA SET II) antitestet mértünk a plate lyukaiba (2 μ g/ml). Az 1 óra inkubációs idő leteltével PBS-Tween oldattal mostuk a plate-et, majd hozzáadtuk a peroxidáz enzimet, ami kötődött a biotinált antitestekhez. Újabb mosás után a peroxidáz enzim szubsztrátját adtuk a rendszerhez, amely 2 komponensből áll, a 0,4 g/L koncentrációjú 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinnél és a 0,02%-os H₂O₂-ből. A reakciót 2N-os kénsav oldattal állítottuk le, a színintenzitást Microplate reader (BioTek) segítségével 450 nm hullámhosszon mértük.

A kiértékeléshez ismert IL-1 β koncentrációjú standard sort felhasználva kalibrációs egyenest készítünk, ehhez a standard oldat koncentrációjának függvényében ábrázoltuk a mért OD értékeket. A kalibrációs egyenes $y=ax+b$ általános formában írható le, ahol y a mért OD érték, x az IL-1 β koncentráció, a az egyenes meredeksége, b az egyenes tengelymetszete. A

kalibrációs egyenes egyenletének segítségével meghatározhatjuk az IL-1 β citokin koncentrációját, az egyes mintáknál mért OD érték behelyettesítésével.

3.4. RNS izolálás és qPCR technika

A sejteket 500 μ l TRIzol reagensben (Invitrogen) oldottuk fel, majd az RNS tartalom izolálását a gyártó leírása szerint végeztük. Mintáinkat kloroformmal extraháltuk, majd 3 perces szobahőmérsékleten történő inkubálást követően 15000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk. A felső vizes fázisból az RNS precipitálását izopropanollal végeztük. 20 perc inkubálás után a mintáinkat 4 °C-on maximális fordulatszám mellett 10 percig centrifugáltuk. A pelletet etanollal mostuk, az RNS-t beszárítottuk, majd nukleázmentes vízben oldottuk vissza. Az RNS koncentrációt és a minta szennyeződését Nanodrop (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Bioscience) készüléssel határoztuk meg. Kísérletünkben a 280 nm abszorpciós maximumú fehérje szennyezés ill. a 230 nm abszorpciós maximumú oldószer szennyezés adott hullámhosszon mért OD értékének és a 260 nm hullámhosszon mért OD érték hányadosából következtettünk mintáink tisztaságára.

A minták DNS tartalmának degradációját DN-áz enzim (Promega), 10x-es DN-áz puffer (Promega), MgCl₂ és RN-áz inhibitor (Promega) jelenlétében 30 percig 37 °C-on végeztük, majd az enzimet 5 perc alatt 72 °C-on inaktívtuk. Ezt követően reverz transzkripciót végeztünk, a cDNS-sé átírandó RNS mennyiségétől függően meghatározott mennyiségű 200 U/ μ l SSII RT enzimet (Invitrogen), random hexamert (Invitrogen), 2,5 mM dNTP mixet (Fermentas), 100mM DTT-t (Invitrogen) és 5x-ös SSII RT-PCR puffert (Invitrogen) tartalmazó közegben, 5 perc 25 °C-os, 2 óra 42 °C-os inkubálás során, a reverz-transzkriptáz enzimet 5 perc 72 °C-os inkubálással inaktívtuk.

A méréseket a <http://www.appliedbiosystems.com> weboldalon található Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems leírás alapján, ABI Prism 7000 (Applied Biosystem) készüléken végeztük. A gének expressziós szintjét a „comparative cycle threshold” (ΔC_T) módszerrel határoztuk meg, a transzkripció szinteket pedig a ciklofilin D szintjére normalizáltuk. Fluoreszcens festék alkalmazásával a jel intenzitása arányos a DNS koncentrációjával, ami a PCR reakció során növekszik, ha jelen van az adott primert kötni képes DNS szekvencia. A jel küszöbértékét, az ún. ΔC_T értéket a PCR ciklusok számához viszonyítjuk, ezáltal lehetőség nyílik a kiindulási DNS koncentráció meghatározására a mintában. Minél magasabb a DNS mennyisége a reakció elején, annál hamarabb éri el a jel a küszöbértékét. Az egyes transzkriptek detektálásához specifikus TaqMan próbákat (proIL-1 β ,

P2X7: Applied Biosystem) használtunk. A reakció 12 másodpercig 95 °C-on és 1 percig 60 °C-on zajlott 40 cikluson keresztül.

3.5. Az ATP koncentráció mérése

A felülúszók ATP tartalmának mérését ATPLite™ készlet (Perkin Elmer) használatával végeztük, a gyártó utasításai szerint (www.perkinelmer.com). A módszer alapja a szentjánosbogár luciferáz enzim működése. A készletben található a D-luciferin szubsztrát, ezt ATP hidrolízise közben a luciferáz oxidálja, amit fényjelenség kísér. A lumineszcencia intenzitása arányos az oldatban található ATP mennyiségével, amit a készlet stabilizál, így hosszú ideig mérhető.

A mérés során fehér 96 lyukú plate-et használtunk, melynek lyukaiba felvittük a lízis puffert, és a mintákat. Rázatus után hozzáadtuk az enzimet és szubsztrátot tartalmazó szubsztrát-oldatot, majd újabb rázatus után letakarva 10 percig inkubáltuk. A lumineszcenciát VICTOR Light™ készülékkel mértük.

A koncentráció meghatározása ismert koncentrációjú standard sor felhasználásával történt, amelynek lumineszcencia értékeit a koncentráció függvényében ábrázoltuk, majd erre kalibrációs egyenest állítottunk. A kalibrációs egyenes $y=ax+b$ általános formában írható le, ahol y a mért lumineszcencia érték, x az ATP koncentráció, a az egyenes meredeksége, b az egyenes tengelymetszete. A kalibrációs egyenes egyenletének segítségével meghatározhatjuk a minták ATP koncentrációját a mért lumineszcencia érték behelyettesítésével.

3.6. Statisztikai analízis

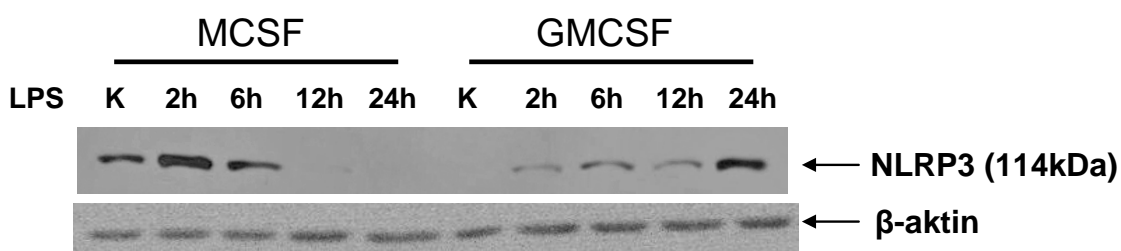
A statisztikai analízist párosított t-próbával végeztük, az eredményt $p<0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A számításokat Microcal Origin 6.0 program segítségével végeztük.

4. Eredmények

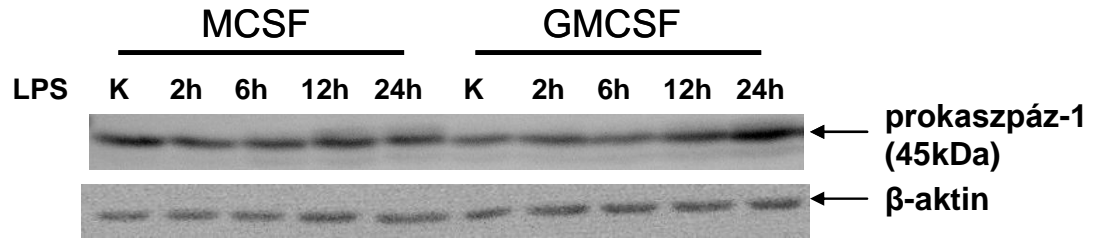
4.1. Az LPS indukálja az inflammoszómatagok és a proIL-1 β expresszióját

Az LPS a TLR4 receptorokon keresztül beindított jelátviteli útvonalak aktiválásával számos gén transzkripcióját indukálja. Irodalmi adatok szerint az LPS hatással van a proIL-1 β , valamint az inflammoszóma tagok expressziójára is, de ezt eddig az általunk vizsgált makrofágokon nem vizsgálták (Netea et al., 2009; Piccini et al., 2008; Pétrilli et al., 2007).

Annak kiderítésére, hogy az LPS kezelés hatására hogyan változik az MCSF és GMCSF jelenlétében differenciáltott makrofágokban az inflammoszóma tagok és a proIL-1 β expressziója, LPS kezelést követően különböző időpontokban vizsgáltuk az NLRP3 és prokaspáz-1 fehérje-, valamint a proIL-1 β mRNS- és fehérjeszintű expresszióját. Eredményeink szerint az MCSF makrofágokban az inflammoszóma részét képező NLRP3 fehérje már alapállapotban, LPS kezelés nélkül is nagy mennyiségben jelen van, LPS kezelés hatására pedig jelentős, de rövid idejű expressziót tapasztaltunk (4. ábra). Ezzel szemben a GMCSF makrofágokban az NLRP3 fehérje alapállapotban, LPS kezelés nélkül nem detektálható. Ezekben a sejtekben az NLRP3 fehérje LPS kezelés hatására jelenik meg, és ellentétben az MCSF makrofágokkal, a fehérje expressziója a 24 órás kezelés során folyamatosan nő (4. ábra). A prokaspáz-1 mindkét makrofágtípusban megtalálható LPS kezelés nélkül is, de az MCSF makrofágokban a fehérje alapszintű expressziója erősebb, mint a GMCSF makrofágokban (5. ábra). A GMCSF makrofágokban a prokaspáz-1 expresszió maximumát a hosszabb időtartamú LPS kezelés hatására éri el, hasonlóan az NLRP3 fehérjéhez.

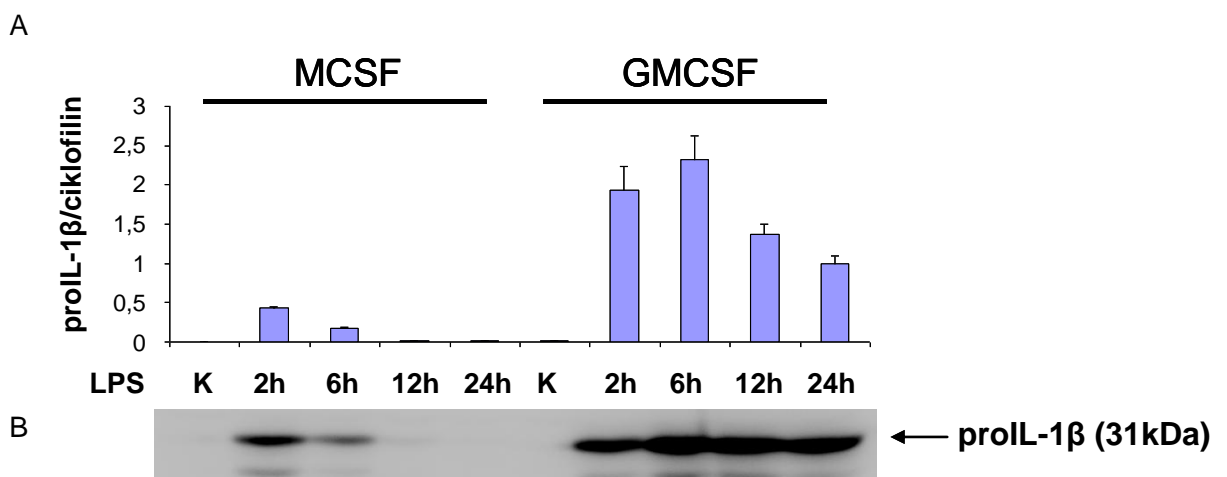


4. ábra. Az NLRP3 fehérje expresszióját az LPS indukálja. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.



5. ábra. A prokaspáz-1 expressziója LPS kezelés hatására indukálódik. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

A proIL-1 β expressziójának vizsgálata alapján megállapítható, hogy alapszinten, LPS kezelés nélkül egyik makrofágtípus sem fejezi ki a proIL-1 β -t. LPS kezelés hatására mindkét makrofágtípusban indukálódik a proIL-1 β mRNS- és fehérjeszintű expressziója, ugyanakkor eltérő mennyiségben és időkinetikával (6. ábra). Az MCSF makrofágokban az LPS kezelést követően korán indukálódik a proIL-1 β gén transzkripciója és translációja, a pro-IL-1 β fehérje mennyisége 2 órás LPS kezelés során éri el a maximumot. A fehérjeexpresszió indukcióját egy gyors, gén szintű dereguláció követi, ezért hosszabb időtartamú (12-24 órás) LPS kezelés során sem az mRNS, sem a fehérje nem található meg a sejtekben. A GMCSF makrofágokban már rövid LPS kezelés hatására indukálódik a gén transzkripciója és translációja, de ez, ellentétben az MCSF makrofágokkal, hosszabb időtartamú LPS stimulus során is fennmarad. A GMCSF makrofágoknál az expresszió csúcspontja a késői időpontokban (12-24h) van mind az mRNS, mind a fehérje esetében.

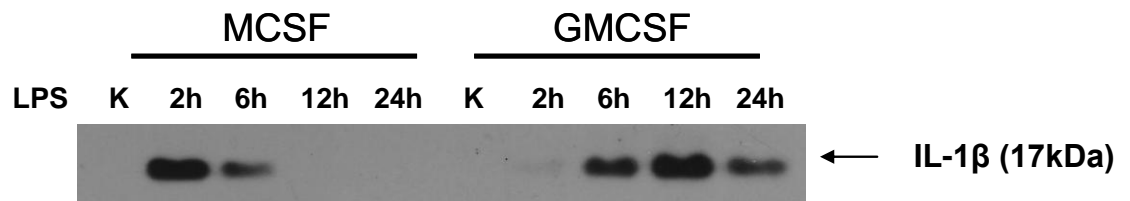


6. ábra. Az LPS indukálja a pro-IL-1 β gén expresszióját. A – A proIL-1 β relatív mRNS expressziója, ciklofilinre normálva. qPCR eredmény, az ábra négy független mérés alapján reprezentatív. B – A proIL-1 β fehérje expressziója, Western blot eredmény, az ábra négy független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

Ezek az eredmények összességében azt mutatják, hogy az LPS mindkét makrofágban indukálja a proIL-1 β termelődéséért közvetlenül felelős fehérjék expresszióját.

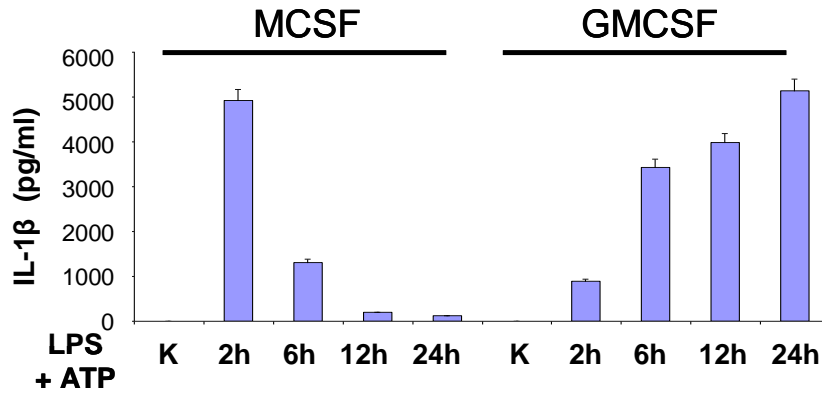
4.2. Az ATP kezelés szerepe a makrofágok IL-1 β szekréciónak

Az előzőekben bemutatott NLRP3 inflammoszóma és proIL-1 β expressziós mintázat feltételezi, hogy az MCSF makrofágok csak a korai, míg a GMCSF makrofágok inkább a késői időpontokban képesek IL-1 β -t felszabadítani. Mivel irodalmi adatok szerint a makrofágok csak egy második szignál hatására képesek aktiválni az NLRP3 inflammoszómát és hasítani a proIL-1 β -t (Netea et al., 2009), ezért ennek biztosításához az LPS kezelést követően ATP-vel kezeltük a sejteket. Ez az alkalmazott kezelés az irodalom szerint P2X7 receptor aktiválásán keresztül aktiválja az inflammoszómát, ami az IL-1 β éréséhez vezet. Az ATP kezelés után a sejtlizátumból Western blot segítségével hasított IL-1 β -t mutattunk ki. Az érett IL-1 β az MCSF makrofágokban már az LPS kezelést követő 2. órában nagy mennyiségben kimutatható. A GMCSF makrofágokban az IL-1 β megjelenéséhez hosszabb időtartamú LPS kezelés szükséges (7. ábra).



7. ábra. Az LPS kezelést követő ATP kezelés hatására mindkét makrofágtípusban megjelenik az érett IL-1 β . Western blot eredmény sejtlizátumból. Az ábra négy független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

Az ATP kezelés hatására nem csak a sejtekben jelenik meg az aktív IL-1 β . A második szignál hatására mindkét makrofágtípus képes szekretálni az érett IL-1 β -t, a termelődésének megfelelő kinetikával. A proIL-1 β és az NLRP3 inflammoszóma tagok expressziójának megfelelően az MCSF makrofágok rövid idejű (2-6 óra) LPS kezelés után, míg a GMCSF makrofágok inkább hosszabb időtartamú (12-24 óra) LPS kezelés után szekretálnak IL-1 β -t (8. ábra).

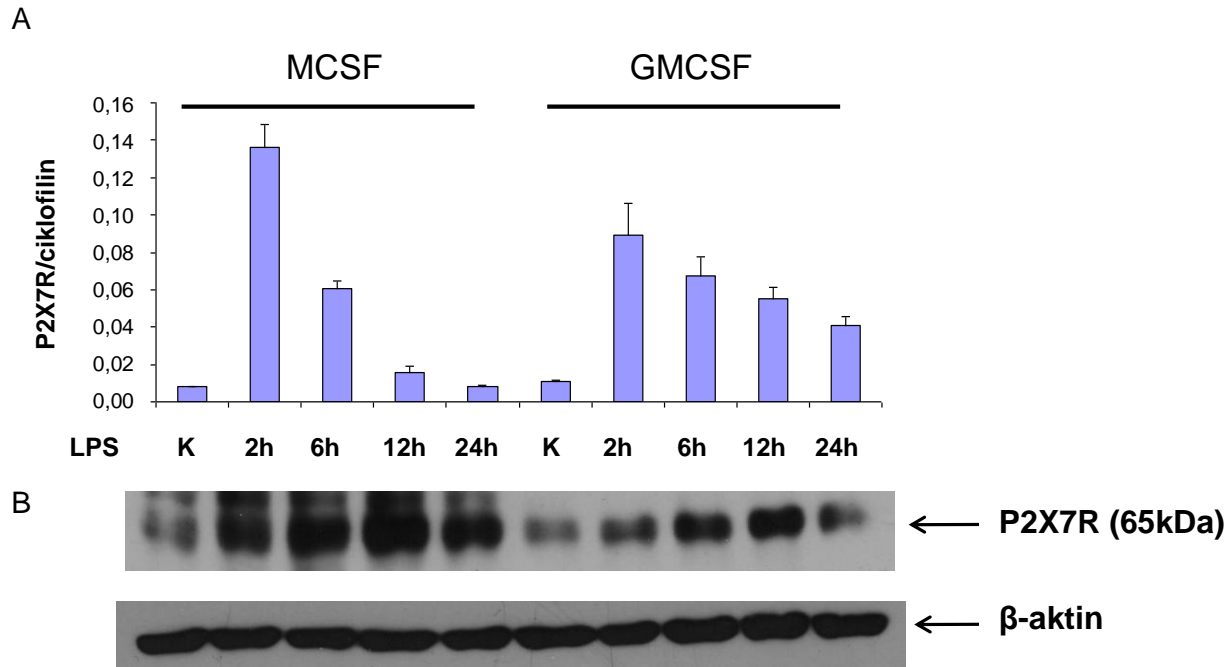


8. ábra. Az LPS kezelést követő ATP kezelés hatására mindkét makrofágtípus szekretál IL-1 β -t. Az IL-1 β citokin koncentrációját a felülúszóban ELISA technikával mértük, az ábra négy független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

4.3. A P2X7 receptor expressziója

A P2X7 purinerg receptor az extracelluláris ATP érzékelésért felelős, és az irodalom szerint ennek a receptornak van szerepe az ATP hatására történő inflammoszóma aktivációban. Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a két makrofágtípus P2X7 receptor expressziójában van-e különbség, ami szintén befolyásolhatja az inflammoszóma működését.

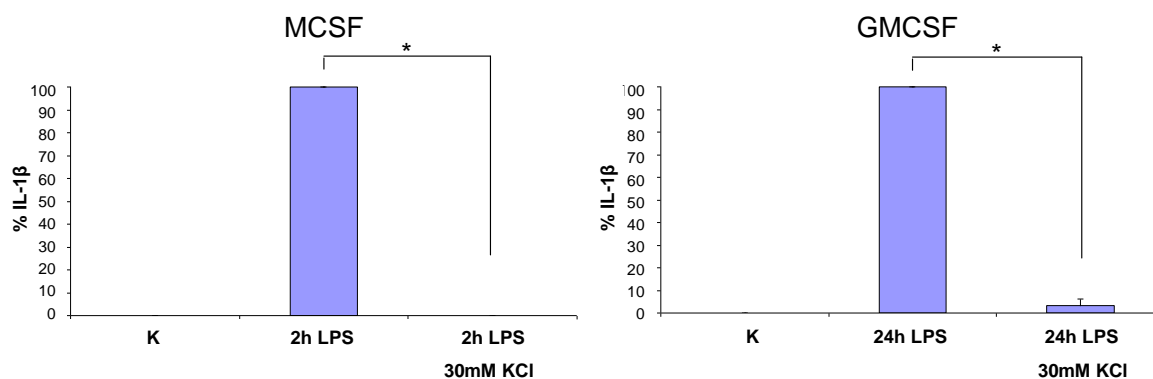
Eredményeink szerint LPS kezelés nélkül mindkét makrofágtípus körülbelül azonos mennyiségben expresszálja a P2X7 receptort mind mRNS-, mind fehérjeszinten. LPS kezelés hatására mindkét makrofágtípusban rövid idő alatt indukálódik a receptor génjének transzkripciója, ami a kezelés időtartama alatt fokozatosan csökken, az MCSF makrofágokban 24 órás LPS kezelés során elérve a kontroll szintet, míg a GMCSF makrofágokban hosszabb időtartamú LPS kezelés után is emelkedett marad a P2X7 receptort kódoló mRNS mennyisége (9.A ábra). A P2X7 receptor fehérjeexpressziója mindkét makrofágtípusban indukálódik az LPS kezelés hatására, az expresszió a maximumát a 12 órás LPS kezelésnél éri el (9.B ábra). Eredményeink szerint az MCSF makrofágokban nagyobb a fehérje mennyisége, mint a GMCSF makrofágokban, azonban a Western blot képe alapján nem határozható meg a fehérje lokalizációja, ami a receptor aktivitását nagyban befolyásolhatja. A receptor nem csak a sejt felszínén, hanem a mitokondriumban és a sejtmagmembránon is megtalálható (Suzuki-Kerr et al., 2008), valamint membránba kihelyeződése is szabályozott lehet (Smart et al., 2003), ezért a receptor lokalizációja jelentősen befolyásolhatja a sejtek ATP érzékenységét.



9. ábra. Az LPS indukálja a P2X7 receptor expresszióját mindkét makrofágtípusban. A – A P2X7 receptor relative mRNS expressziója, ciklofilinre normalizálva, qPCR eredmény, az ábra három független mérés reprezentatív eredményét mutatja. B – A P2X7 receptor fehérje szintű expressziója, Western blot eredmény, az ábra négy független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

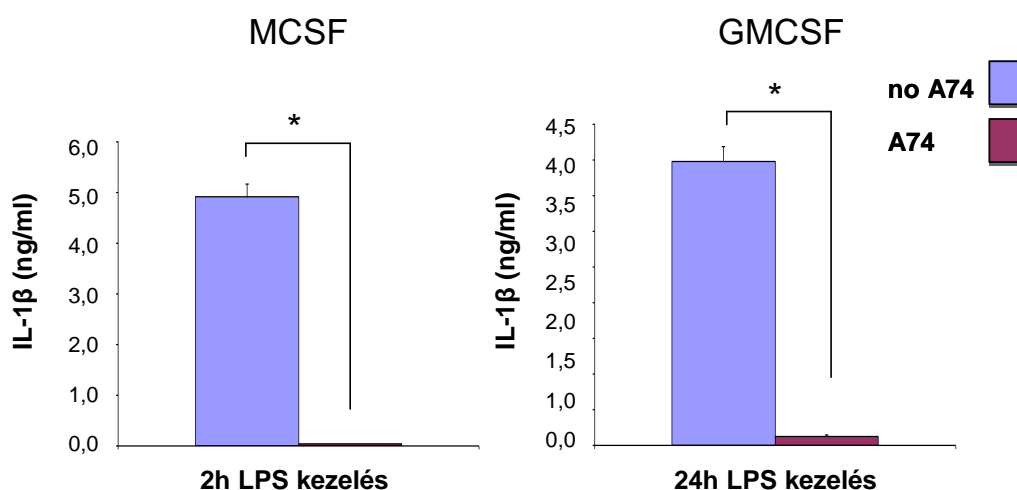
4.4. A P2X7 receptor szerepe az inflammoszóma exogén ATP általi aktivációjában

Az irodalom szerint az LPS kezelést követő ATP kezelés a sejtek IL-1 β expresszióját a P2X7 receptoron keresztül segíti elő (Di Virgilio, 2007). Aktiválódása után a P2X7 receptor, a többi P2X receptorhoz hasonlóan, kation specifikus csatornát nyit, amelyen keresztül a sejtől K⁺ áramlik ki, ami az intracelluláris K⁺ koncentráció csökkenéséhez vezet, és ez az irodalom szerint szükséges az NLRP3 inflammoszóma aktivációjához (Pétrilli et al., 2007). A tápoldat magas K⁺ koncentrációja képes megakadályozni a P2X7 receptor által beindított K⁺ áramlást, ezért az ATP kezelés előtt 30mM koncentrációban KCl-ot adtunk a tápoldathoz, hogy a P2X7 receptor funkciójának gátlásával is igazoljuk szerepét a folyamatban. Az MCSF makrofágok esetén 2 órás LPS kezelést követően vizsgáltuk a magas extracelluláris K⁺ koncentráció hatását, mivel ebben a időpontban képesek IL-1 β -t szekretálni. A kísérletet a GMCSF makrofágok esetében 24 órás LPS kezelés után végeztük el, mivel ezek a sejtek ekkor szekretálnak nagy mennyiségű IL-1 β -t. Eredményeink szerint a magas extracelluláris K⁺ koncentráció jelenlétében az ATP nem volt képes az IL-1 β szekrécióját indukálni (10. ábra).



10. ábra. A magas extracelluláris K^+ koncentráció gátolja az IL-1 β termelést. Relatív IL-1 β koncentráció a felülúszóban, az LPS-sel kezelt kontrollhoz képest. A kísérlet során 30mM KCl koncentráció mellett történt a sejtek ATP kezelése. Az értékeket három kísérlet alapján számítottuk, * $p < 0,01$, az LPS-hez kezelt kontrollhoz viszonyítva

Annak eldöntésére, hogy az ATP mindkét általunk vizsgált sejttípus NLRP3 inflammoszómáját a P2X7 receptoron keresztül aktiválja, vagy esetleg más P2X receptor is szerepet játszik ebben a folyamatban, specifikus P2X7 receptor gátlószerrel (A74) előkezeltük a sejteket az ATP kezelés előtt. Mivel az MCSF makrofágok csak a rövid idejű LPS kezelést követő ATP kezelés után képesek érett IL-1 β -t szekretálni, ezért a receptor gátlásának hatását is rövid idejű (2 órás) LPS kezelés után vizsgáltuk. Ezzel szemben a GMCSF makrofágok a hosszabb LPS kezelés után szekretálnak IL-1 β -t, ezért ezeken a sejteken 24 órás LPS kezelés után vizsgáltuk a P2X7 receptor gátlásának hatását. Az A74 gátlószer hatására jelentősen csökkent az IL-1 β mennyisége a felülúszóban (11. ábra). Ez az eredmény megerősíti a P2X7 receptor szerepét a folyamatban.



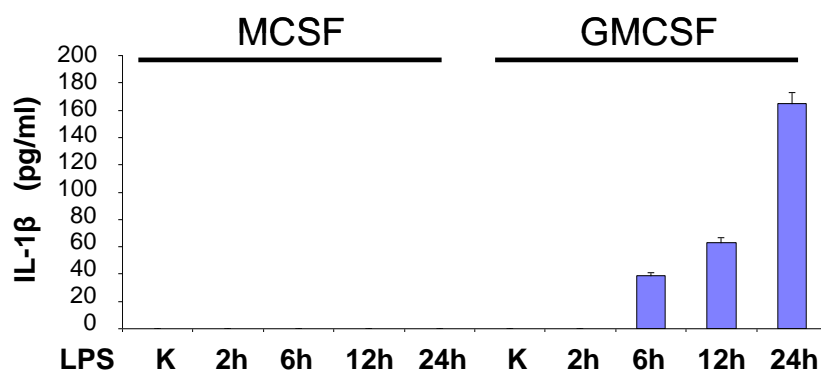
11. ábra. A P2X7 receptor gátlása csökkenti az IL-1 β szekréciót mindkét sejttípusban. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja, * $p < 0,05$, az LPS kezelt kontrollhoz képest.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az LPS kezelést követően adott exogén ATP mindkét sejttípusban a K^+ kiáramlás révén segíti elő az inflammoszóma aktiválódását, amit főleg a P2X7 receptor aktiválódása okoz.

4.5. A GMCSF makrofágok ATP kezelés nélkül is szekretálnak IL-1 β -t

Irodalmi adatok szerint a humán és egér eredetű makrofágok LPS kezelést követő IL-1 β termeléséhez szükséges az exogén ATP jelenléte (Netea et al., 2009). Ugyanakkor a humán monociták esetében kimutatták, hogy a sejtek önmagában LPS kezelés hatására is szekretálnak IL-1 β -t, amit endogén ATP termelésük révén autokrin módon segítenek elő (Netea et al., 2009; Piccini et al., 2008). Kíváncsiak voltunk arra, hogy az általunk vizsgált sejtek esetén is szükséges-e mindkét szignál az NLRP3 inflammoszóma aktivációjához, ugyanis az általunk alkalmazott módszerrel differenciáltot makrofágok esetén ezt eddig nem vizsgálták.

Eredményeink azt mutatják, hogy az MCSF makrofágok, az LPS kezelést követően ATP kezelés nélkül nem szekretálnak IL-1 β -t. Érdekes módon azonban a GMCSF makrofágok önmagában az LPS kezelés hatására is képesek IL-1 β -t felszabadítani, a külsőleg biztosított 2. szignál nélkül is (12. ábra). Ez arra utal, hogy a GMCSF makrofágokban valamilyen mechanizmus által aktiválódik az inflammoszóma már LPS kezelés hatására is.

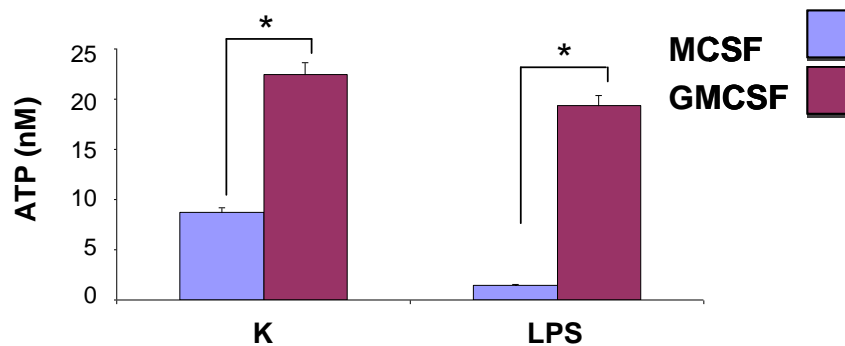


12. ábra. A GMCSF makrofágok ATP nélkül is szekretálnak IL-1 β -t LPS hatására. Az IL-1 β citokin koncentrációját a felülúszóban ELISA technikával mértük, az ábra négy független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

4.6. A makrofágok ATP termelése

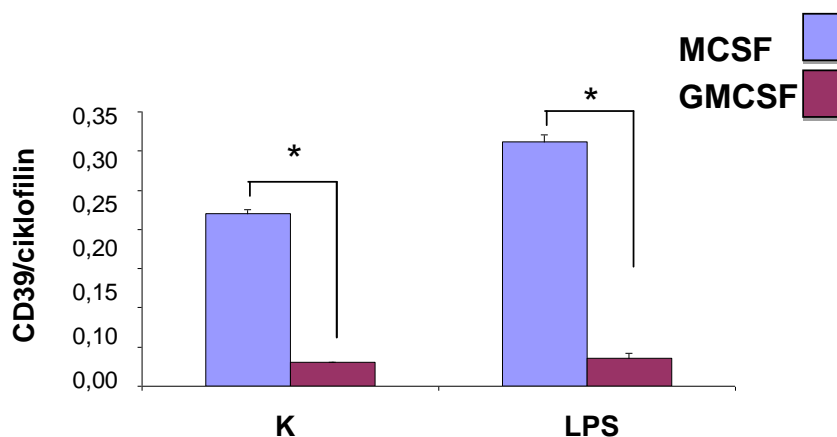
Eredményeink szerint a GMCSF makrofágokban az NLRP3 inflammoszóma LPS stimulus hatására is aktiválódik, egy eddig ismeretlen mechanizmus által. Mivel a GMCSF makrofágok a monocitákból differenciálódnak, ezért feltételeztük, hogy a monocitákhoz hasonlóan a

GMCSF makrofágok ATP termelésük révén auto- és parakrin módon szabályozzák az inflammoszóma aktivációt. Annak eldöntésére, hogy a sejtek termelnek-e ATP-t, megmértük a kétféle makrofágtípus felülűszójának ATP koncentrációját. Eredményeink szerint a GMCSF makrofágok felülűszója mind LPS kezelés hiányában, mind LPS kezelés hatására több ATP-t tartalmazott, mint az MCSF makrofágoké (13. ábra), amit okozhat a GMCSF makrofágok fokozottabb ATP-szekrécója.



13. ábra. A kétféle makrofágtípus felülűszójának ATP tartalma. Az LPS-sel nem kezelt kontroll illetve a 12 órás LPS kezelés után mért ATP koncentráció a kétféle makrofág felülűszójában. Az ábra három kísérlet reprezentatív eredményét mutatja, * $p < 0,05$ a két sejtípus között.

A felülűszó ATP tartalmát azonban nem csak a szekretált ATP mennyisége befolyásolja, hanem a sejtek által kifejezett ekto-ATPázok is (Yegutkin, 2008). Az ekto-ATPázok a sejtek plazmamembránján helyezkednek el, de szolubilis, szekretált formája is létezik. A különböző ekto-ATPázok az egyes sejtípusokban eltérő mértékben expresszálódnak. Irodalomból ismert, egér eredetű makrofágokon végzett kísérletek eredményei szerint az ekto-ATPázoknak fontos szerepük van az IL-1 β szekréciónak szabályozásában, a P2X7 receptor funkciójának befolyásolásán keresztül (Lévesque et al., 2010). Az ATP-t ADP-vé illetve AMP-vé hidrolizáló CD39 (ENTPDase1) humán endothel sejtek IL-1 α és IL-1 β szekréciónak is csökkenti (Imai et al., 2000). Annak kiderítésére, hogy a két makrofágtípus felülűszójának eltérő ATP tartalmát befolyásolhatják-e az ekto-ATPázok, megvizsgáltuk a CD39 expresszióját. qPCR adataink alapján az MCSF makrofágok mind LPS kezelés hiányában, mind LPS kezelést követően expresszálják a CD39 molekulát (14. ábra). A GMCSF makrofágokban azonban az LPS nem befolyásolja a CD39 molekula expresszióját, mely LPS kezelés nélkül és LPS kezelés után is szignifikánsan alacsonyabb az MCSF makrofágok CD39 expressziójánál.



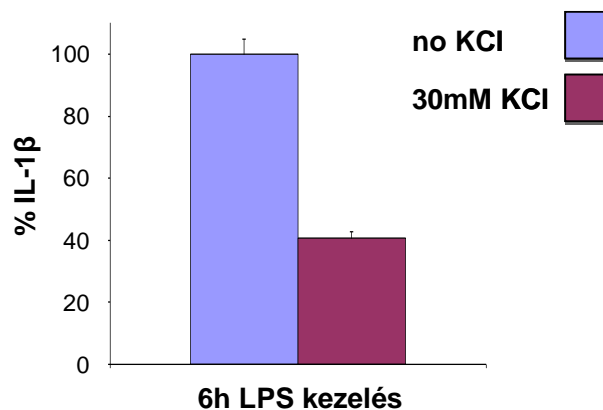
14. ábra. A CD39 ekto-ATPáz génexpressziója a kétféle makrofágtípusban. Az LPS-sel nem kezelt kontroll illetve a 12 órás LPS kezelés után mért relatív CD39 mRNS expresszió, a ciklofilin D-re normalizálva. Az ábra négy kísérlet reprezentatív eredményét mutatja, * $p < 0.05$ a két sejttípus között.

Eredményeink szerint feltételezzük, hogy a GMCSF makrofágok felülűszójának magasabb ATP tartalmát a fokozott ATP-t szekréció, és a lebontás hiánya is okozhatja, míg az MCSF makrofágok a szekretált ATP-t elbontják, ami a felülűszó alacsony ATP koncentrációját eredményezi. Eddig bemutatott eredményeink arra utalnak, hogy a GMCSF makrofágok a monocitákhoz hasonlóan ATP termelésük révén autokrin módon befolyásolják az IL-1 β szekréciót.

4.7. A GMCSF makrofágok LPS indukált IL-1 β termelésében a P2X7 receptornak elhanyagolható a szerepe

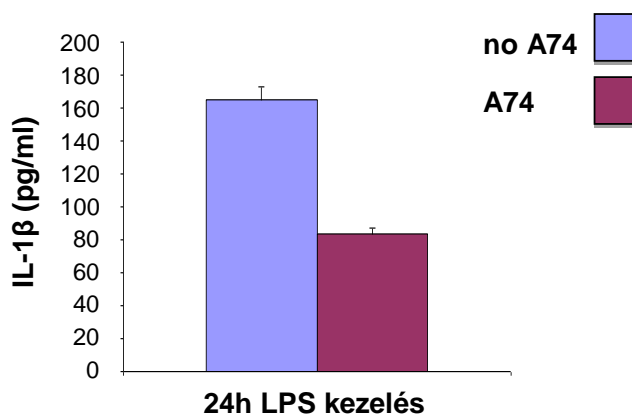
Az irodalom szerint a monociták esetén a P2X7 receptor autokrin aktivációja felelős az LPS indukált IL-1 β szekrécióért (Netea et al., 2009; Piccini et al., 2008). Az előzőekben bemutattuk, hogy a GMCSF makrofágok is képesek LPS hatására IL-1 β -t termelni, további kísérleteinkben pedig azt vizsgáltuk, hogy ebben szerepet játszhat-e egy, a monocitákéhoz hasonló mechanizmus.

Ahogy korábban az ATP kezelés esetében, itt is vizsgáltuk a K⁺ kiáramlás gátlásának hatását az IL-1 β szekrécióra, hiszen az intracelluláris K⁺ koncentráció csökkenése az inflammoszóma aktiválásához elengedhetetlen (Pétrilli et al., 2007). Magas (30mM) extracelluláris K⁺ koncentrációt alkalmaztunk az LPS kezelés ideje alatt, ami az IL-1 β szekréció csökkenéséhez vezetett, de azt nem szüntette meg (15. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy a GMCSF makrofágok LPS indukált IL-1 β szekrécióját valamelyik P2X receptor, vagy egyéb ionáramlást befolyásoló csatorna segítheti elő.



15. ábra. A magas extracelluláris K^+ koncentráció az LPS kezelés ideje alatt csökkenti az IL-1 β termelődését a GMCSF makrofágokban. Relatív IL-1 β mennyiség az LPS kezelt kontrollhoz képest, az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

Kimutattuk, hogy a K^+ kiáramlásnak szerepe van a GMCSF makrofágok LPS indukált IL-1 β termelésében, továbbá adataink arra utalnak, hogy ATP-t szekretálnak, ezért megvizsgáltuk, hogy a P2X7 receptor szerepet játszik-e a folyamatban. Kísérleteinkben a P2X7 receptort specifikusan gátló A74 molekulával előkezeltük a sejteket az LPS kezelés előtt, majd ELISA technikával mértük a felülúszó IL-1 β tartalmát. A kezelés hatására csökkent a felülúszó IL-1 β tartalma, de teljes gátlást nem tudtunk elérni (16. ábra), és az eredmény nagyfokú donorfüggést mutatott.

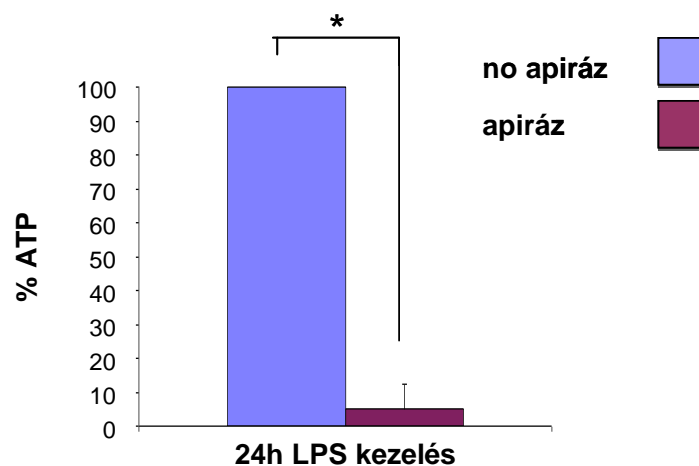


16. ábra. A P2X7 receptort specifikusan gátló A74 ágens alkalmazásával a GMCSF makrofágok IL-1 β termelése csökken. A felülúszó IL-1 β koncentrációja ELISA technikával mérve, LPS kezelés, valamint egyidejű LPS és A74 kezelés hatására. Az ábra három kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

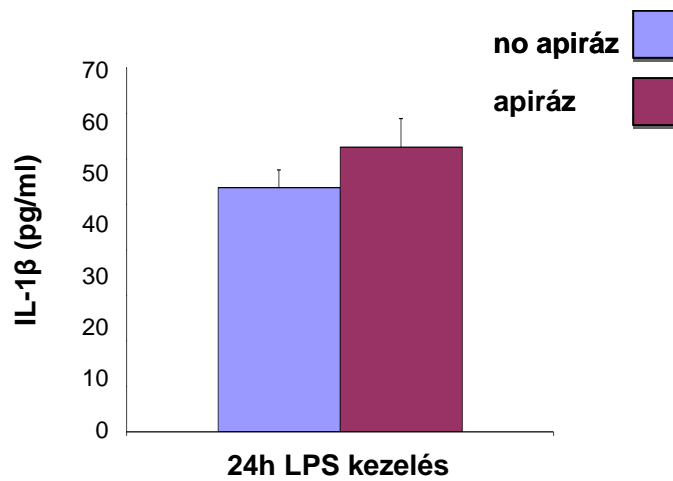
Összességében tehát ezen eredményeink arra utalnak, hogy a P2X7 receptornak csekély a szerepe a GMCSF makrofágok LPS indukált IL-1 β termelésében. Ugyanakkor a K^+ kiáramlás ebben a folyamatban is szükséges az inflammoszóma aktivációhoz és az IL-1 β szekrécióhoz, ami felveti azt a lehetőséget, hogy egy másik purinerg receptor felelős a jelenségért.

4.8. Az extracelluláris ATP lebontása nem csökkenti az IL-1 β szekréción

Piccini és munkatársai (2008) a monociták feltételezett ATP termelését és a felszabadított ATP hatását az IL-1 β szekréción az ATP-t hidrolizáló apiráz kezeléssel is igazolták. Saját eredményeink szerint a GMCSF makrofágok ATP-t termelnek, s feltételeztük, hogy ez az ATP auto- és parakrin módon serkentheti az IL-1 β szekréciónjukat. A sejtek által szekretált ATP szerepét szeretnénk volna bizonyítani a szekretált ATP-t hidrolizáló kezeléssel. Az ATP-t apiráz enzimmel hidrolizáltuk, mely az ATP-t ADP-vé bontja, majd ezt tovább hidrolizálja. A felülúzó ATP koncentrációja az apiráz kezelés hatására szignifikáns csökkenést mutatott (17. ábra), de a várakozással ellentétben az IL-1 β mennyiségében nem tapasztaltunk változást (18. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy nem az ATP szekréción okozza az LPS indukált IL-1 β szekréción, de az apiráz kezelés IL-1 β termelésben tapasztalt hatástalanságát az is okozhatja, hogy az ATP hidrolízise során keletkező ADP, AMP és adozin különböző purinerg receptorokat aktiválhatnak (P2, P1), amelyeken keresztül befolyásolhatják a gyulladáso folyamatokat (Coutinho-Silva, Ojcius, 2012; Gombault et al., 2012; Miller et al., 2011), illetve további metabolitok és mechanizmusok is hozzájárulhatnak az LPS indukált IL-1 β termeléshez.



17. ábra. A GMCSF makrofágok felülúzójának ATP tartalmát az apiráz bontja. Relatív ATP mennyiség az LPS kezelt kontrollhoz képest, az ábra három független kísérlet átlagos relatív ATP mennyiségét mutatja, * $p < 0,001$ az LPS kezelt kontrollhoz képest.



18. ábra. Az aspirin kezelés nem csökkenti a GM-CSF makrofágok felülűszójának IL-1 β tartalmát. A felülűszó IL-1 β koncentrációja ELISA technikával mérve, az LPS kezelés, valamint az egyidejű LPS és aspirin kezelés hatására. Az ábra három mérés reprezentatív eredményét mutatja.

5. Diszkusszió

Eredményeink szerint a kétféle makrofág IL-1 β citokin termelése jelentős különbségeket mutat, mind mennyiségében, mind termelődésének időbeli kinetikájában. A TLR4 receptor ligandum LPS, mindkét általunk vizsgált makrofágtípusban indukálja a proIL-1 β expresszióját, valamint hatással van az NLRP3 inflammoszóma tagjainak expressziójára, ahogy már más sejttípusokban, humán monocitákban, makrofágokban, egér makrofágokban és dendritikus sejtekben is kimutatták (He et al., 2013; Netea et al., 2009; Piccini et al., 2008; Pétrilli et al., 2007). Kimutattuk továbbá, hogy az NLRP3 inflammoszóma aktiválódását elősegítő 2. szignált biztosító ATP nem szükséges a GMCSF makrofágoknak, habár az exogén ATP jelentős mértékben serkenti az IL-1 β szekréción mindkét általunk vizsgált sejttípusban. Az ATP kezelés hatását a P2X7 receptor specifikus gátlásával teljes mértékben meg tudtuk akadályozni, ami azt mutatja, hogy a receptor felelős az exogén, nagy mennyiségű ATP érzékeléséért a vizsgált sejttípusokban is.

Az exogén eredetű 2. szignál hiányában nem csak az általunk vizsgált GMCSF makrofágok képesek IL-1 β -t felszabadítani, hanem a humán monociták, valamint az egér eredetű dendritikus sejtek is (He et al., 2013; Netea et al., 2009; Piccini et al., 2008). A GMCSF sejtek ATP termelése arra utalt, hogy ezekben a sejtekben a monocitákhoz hasonló autokrin mechanizmus segíti elő az IL-1 β szekréción, de a P2X7 receptort specifikusan gátolva nem tudtuk teljes mértékben megakadályozni az IL-1 β szekréción. Piccini és munkatársai (2008) illetve Netea és munkatársai (2009) a humán monociták LPS kezelése során peroxidált ATP-t (oATP) használtak a P2X7 receptor gátlására. A kezelés gátolta a monociták LPS indukált IL-1 β szekréciónját, ami egyéb adatokkal együtt arra utalt, hogy egy autokrin mechanizmus révén a P2X7 receptoron keresztül indukálódik az inflammoszóma aktivációja a monocitákban. Ugyanakkor az oATP gátlószer nem specifikus gátlószer a P2X7 receptornak, egyéb P2 receptorokat is gátol, valamint a purinerg szignalizációt mellőzve is képes csökkenteni a gyulladási választ (Beigi et al., 2003). Ezzel szemben mi a kísérleteinkben a P2X7 receptorra szelektív A74 inhibitor használtuk. Ez az ágens csak a P2X7 receptort gátolja (Donnelly-Roberts, Jarvis, 2007), az egyéb purinerg receptorokat nem. Valószínűsíthető, hogy kísérleteinkben egyéb purinerg receptorokon keresztül aktiválódhatott az inflammoszóma a P2X7 gátlása mellett is, így nem voltunk képesek teljes mértékű gátlást elérni, szemben a monocitáknál publikált eredményekkel.

A sejtek által szekretált ATP apirázzal történő bontása esetén a felszabadított IL-1 β mennyiségének csökkenését vártuk, de a várakozásainkkal ellentétben az apiráz kezelés nem

befolyásolta a felszabadított IL-1 β mennyiségét. Egyre több adat utal arra, hogy az ATP lebontásakor keletkező metabolitok, pl. az ADP kifejezetten serkenti az inflammoszóma aktivációját és az IL-1 β termelődését (Ferrari et al., 1997; Riteau et al., 2012), ami felveti annak a lehetőségét, hogy az apirázzal csökkentett ATP szint mellett is változatlan IL-1 β termelést tapasztaljunk.

Az eredményeink tehát arra utalnak, hogy a GMCSF makrofágok LPS indukálta IL-1 β szekrécijában az endogén ATP termelés és a P2X7 receptor aktivációjának nincs jelentős szerepe, hasonlóan egy közelmúltban megjelent közlemény eredményeihez, amelyben egér dendritikus sejtek IL-1 β termelését vizsgálták (He et al., 2013). Ellentétben azonban az egér eredetű dendritikus sejtekkel, a GMCSF makrofágokban a K⁺ efflux gátlása 30mM extracelluláris KCl koncentrációval az LPS kezelés időtartama alatt, gátolja az IL-1 β szekréciónak. Ez arra utal, hogy a K⁺ kiáramlásnak szerepe van az IL-1 β termelésben, ami akár valamely másik purinerg receptoron keresztül, vagy a P2X7 receptorral szinergizmusban is megvalósulhat (Miller et al., 2011). Egy másik purinerg receptor, a P2X4 receptor szerepét hangsúlyozza az ATP indukált NLRP3 inflammoszóma aktivációban egy 2013-ban megjelent közlemény (Chen et al., 2013). A kutatócsoport a kísérletekben a vese mikrotubuláris sejtjeit vizsgálta, amelyek magas glükóz koncentráció hatására IL-1 β -t szekretálnak, amelyet a sejtek által felszabadított nagy mennyiségű ATP segít elő. A kísérletekben a sejtek IL-1 β szekréciját a P2X4 receptor specifikus gátlásával vagy csendesítésével teljesen gátolni tudták, ami arra utal, hogy az adott sejttípusban a purinerg receptorok közül a P2X4 receptornak van a legfontosabb szerepe az NLRP3 inflammoszóma aktivációjában.

A legújabb eredmények megkérdőjelezzik P2X7 receptor tényleges szerepét az NLRP3 aktivációban. He és munkatársainak (2013) *in vivo* eredményei azt mutatják, hogy az LPS indukált IL-1 β szekréciónak nem szükséges a P2X7 receptor. P2X7^{-/-} egerekben is normális IL-1 β szérumszintet tapasztaltak LPS intraperitoneális bejuttatását követően. Emellett kimutatták, hogy a dendritikus sejtek is képesek IL-1 β -t szekretálni a P2X7 receptor aktivációja nélkül is. Saját eredményeink is arra utalnak, hogy a P2X7 receptornak nincs, illetve csak csekély a szerepe a GMCSF makrofágok LPS indukált IL-1 β szekrécijában. Mivel az inflammoszóma aktivációját nem csak az ATP mediálhatja, feltételezhető, hogy más nukleotidok és metabolitok más receptorokon keresztül hatva aktiválhatják a NLRP3 inflammoszómát. Az újabb eredmények szerint az ADP, UTP, UDP és adenzin is serkentheti az IL-1 β termelődését, így tehát ezek a metabolitok is hozzájárulhatnak a GMCSF makrofágok IL-1 β termeléséhez (Gombault et al., 2012; Riteau et al., 2012; Uratsuji et al., 2012).

További kísérleteinkben vizsgálni szeretnénk a P2X7 receptor sejten belüli lokalizációját illetve membránba kihelyeződésének szabályozását mikroszkópos technikával. Egy esetleges különbség a receptor sejtfelszíni mennyiségében a két makrofágtípus között utalhat a receptor IL-1 β szekréciójában betöltött szerepére. Vizsgálni kívánjuk továbbá a CD39 molekula fehérje szintű expresszióját is, mivel sok esetben az mRNS és a fehérje expresszió a poszttranszlációs szabályozó mechanizmusok miatt nem korrelál. A CD39 molekula hozzájárulhat a kétféle sejtípus eltérő ATP érzékenységéhez, valamint az ATP lebontása során keletkező AMP és adenozin gátolják a gyulladásos folyamatokat (Blackburn et al., 2009; Yegutkin, 2008), így a CD39 molekula kifejezése segítheti az MCSF makrofágok „anti-inflammatórikus” tulajdonságait. A GMCSF makrofágok esetén a P2X7 receptor specifikus gátlásával nem tudtuk megakadályozni az LPS indukált IL-1 β termelést. Egyéb purinerg receptorok szerepe ugyanakkor nem zárható ki a folyamatban, ezért kísérleteinket egy általános P2 receptor gátlószer jelenlétében is elvégezzük.

Eredményeink összességében alátámasztják az irodalmi megfigyeléseket, hogy az MCSF makrofágok inkább a szövetregenerációban vesznek részt és „anti-inflammatórikus” tulajdonságúak, hiszen adataink alapján, csak akkor képesek IL-1 β -t szekretálni, ha a környezeti tényezők valóban sérülésre, nekrozisra utalnak, tehát az extracelluláris ATP koncentráció magas. Ezzel szemben a GMCSF makrofágok az irodalom szerint gyulladásos aktivitásúak, amit adataink is alátámasztanak, hiszen a sejtek képesek lehetnek magas ATP-szint nélkül is gyulladást indukálni IL-1 β termelésük révén.

6. Rövidítések jegyzéke

A74 – A740003

ADP – adenzin-5'-difoszfát

AIM2 – absent in melanoma 2

AMP – adenzin-5'-monofoszfát

ASC – apoptózis asszociált specklike protein

ATP – adenzin-5'-trifoszfát

BIR – baculovirus inhibitor repeat

BLP – bakteriális lipoprotein

CARD – caspase activation and recruitment domain

DAMP – veszély asszociált molekuláris mintázat

dNTP – dezoxi-nukleotid-trifoszfát

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ENTPDase 1 – ekto-nukleozid-trifoszfát-difoszfahidroláz 1

GM-CSF – granulocita makrofág kolóniastimuláló faktor

FCS – borjúsérum

ICE – IL-1 β konvertáló enzim (kaspáz-1)

IL – interleukin

IFN – interferon

LPS – lipopoliszacharid

LRR – leucin gazdag ismétlődés

LTA – lipoteikolsav A

MAPK – mitogén aktivált protein kináz

M-CSF – makrofágok kolóniastimuláló faktor

NACHT – nucleotide-binding and oligomerization domain (nukleotid-kötő és oligomerizációs domén)

NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NBD – nucleotide-binding domain (nukleotid kötő domén)

NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NLR – NOD-like receptor

NLRP3 – NLR pyrin domain-containing 3

NOD – nucleotide-binding oligomerization domain

OD – optikai sűrűség (abszorbancia)
P2X7R – P2X7 receptor
PAMP – patogén asszociált molekuláris mintázat
PBMC – perifériás mononukleáris sejtek
PCR – polimerizációs láncreakció
PGN - peptidoglikán
PMA – forbol-mirisztil-acetát
PRR – mintázatfelismerő receptor
PYD – pirin domén
ROS – reaktív oxigén gyökök
rpm – fordulatszám
RT – reverz transzkriptáz
TLR – Toll-like receptor
TLR4 – Toll-like receptor 4
TNF- α – tumor nekrozis faktor α

7. Irodalom

Anand, Paras K; Malireddi, R K Subbarao; Kanneganti, Thirumala-Devi (2011): „Role of the NLRP3 inflammasome in microbial infection.“. In: *Frontiers in Microbiology*. 2 (February), p. 12, DOI: 10.3389/fmicb.2011.00012.

Beigi, Reza D; Kertesz, Sylvia B; Aquilina, Gretchen; et al. (2003): „Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms.“. In: *British Journal of Pharmacology*. 140 (3), pp. 507–19, DOI: 10.1038/sj.bjp.0705470.

Benko, Szilvia; Philpott, Dana J; Girardin, Stephen E (2008): „The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors.“. In: *Cytokine*. 43 (3), pp. 368–373.

Benoit, Marie; Desnues, Benoît; Mege, Jean-Louis (2008): „Macrophage polarization in bacterial infections.“. In: *The Journal of Immunology*. 181 (6), pp. 3733–9.

Blackburn, Michael R; Vance, Constance O; Morschl, Eva; et al.; Wilson, Constance N.; Mustafa, S. Jamal (eds.) (2009): „Adenosine Receptors and Inflammation“. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 193 , pp. 215–269, DOI: 10.1007/978-3-540-89615-9. — ISBN: 978-3-540-89614-2

Cassetta, Luca; Cassol, Edana; Poli, Guido (2011): „Macrophage polarization in health and disease.“. In: *The Scientific World Journal*. 11 , pp. 2391–402, DOI: 10.1100/2011/213962.

Chen, Kehong; Zhang, Jianguo; Zhang, Weiwei; et al. (2013): „ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: A novel pathway of diabetic nephropathy“. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*., DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.009.

Coutinho-Silva, Robson; Ojcius, David M (2012): „Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites.“. In: *Microbes and infection / Institut Pasteur*. Elsevier Masson SAS 14 (14), pp. 1271–7, DOI: 10.1016/j.micinf.2012.05.009.

Da Silva Correia, J.; Miranda, Y.; Austin-Brown, N. et al. (2006): „Nod1-dependent control of tumor growth“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 , pp. 1840–1845.

Di Virgilio, Francesco (2007): „Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome.“. In: *Trends in Pharmacological Sciences*. 28 (9), pp. 465–72, DOI: 10.1016/j.tips.2007.07.002.

Donnelly-Roberts, D L; Jarvis, M F (2007): „Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states.“. In: *British Journal of Pharmacology*. 151 (5), pp. 571–9, DOI: 10.1038/sj.bjp.0707265.

- Eder, Claudia (2009): „Mechanisms of interleukin-1beta release.“. In: *Immunobiology*. Elsevier 214 (7), pp. 543–53, DOI: 10.1016/j.imbio.2008.11.007.
- Ferrari, By Davide; Chiozzi, Paola; Falzoni, Simonetta; et al. (1997): „Purinergic modulation of Interleukin-1b release from Microglial Cells Stimulated with Bacterial Toxins“. In: *Journal of Experimental Medicine*. 185 (3), pp. 22–25.
- Fleetwood, A J; Lawrence, T; Hamilton, J A; et al. (2007): „GM-CSF and M-CSF Dependent Macrophages Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation“. In: *The Journal of Immunology*. 178 (8), pp. 5245–5252.
- Gombault, Aurélie; Baron, Ludivine; Couillin, Isabelle (2012): „ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation.“. In: *Frontiers in Immunology*. 3 (January), p. 414, DOI: 10.3389/fimmu.2012.00414.
- He, Yuan; Franchi, Luigi; Núñez, Gabriel (2013): „TLR Agonists Stimulate Nlrp3-Dependent IL-1 β Production Independently of the Purinergic P2X7 Receptor in Dendritic Cells and In Vivo.“. In: *The Journal of Immunology*. 190 (1), pp. 334–9, DOI: 10.4049/jimmunol.1202737.
- Imai, M; Goepfert, C; Kaczmarek, E; et al. (2000): „CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells.“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 270 (1), pp. 272–8, DOI: 10.1006/bbrc.2000.2410.
- Kersse, Kristof; Bertrand, Mathieu J M; Lamkanfi, Mohamed; et al. (2011): „NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death.“. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd 22 (5-6), pp. 257–76, DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.09.003.
- Lacey, Derek C; Achuthan, Adrian; Fleetwood, Andrew J; et al. (2012): „Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models.“. In: *The Journal of Immunology*. 188 (11), pp. 5752–65, DOI: 10.4049/jimmunol.1103426.
- Lamkanfi, Mohamed; Walle, Lieselotte Vande; Kanneganti, Thirumala-Devi (2011): „Deregulated inflammasome signaling in disease.“. In: *Immunological Reviews*. 243 (1), pp. 163–173.
- Lévesque, Sébastien a; Kukulski, Filip; Enjyoji, Keiichi; et al. (2010): „NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages.“. In: *European Journal of Immunology*. 40 (5), pp. 1473–85, DOI: 10.1002/eji.200939741.
- Miller, Catherine M; Boulter, Nicola R; Fuller, Stephen J; et al. (2011): „The role of the P2X₇ receptor in infectious diseases.“. In: *PLoS pathogens*. 7 (11), p. e1002212, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002212.
- Netea, Mihai G; Nold-Petry, Claudia a; Nold, Marcel F; et al. (2009): „Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages.“. In: *Blood*. 113 (10), pp. 2324–35, DOI: 10.1182/blood-2008-03-146720.

- Perregaux, David; Gabel, CA (1994): „Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 269 (21), pp. 15195–15203.
- Piccini, Alessandra; Carta, Sonia; Tassi, Sara; et al. (2008): „ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way.“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105 (23), pp. 8067–72, DOI: 10.1073/pnas.0709684105.
- Pétrilli, V; Papin, S; Dostert, C; et al. (2007): „Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration.“. In: *Cell Death and Differentiation*. 14 (9), pp. 1583–9, DOI: 10.1038/sj.cdd.4402195.
- Rathinam, Vijay a K; Vanaja, Sivapriya Kailasan; Fitzgerald, Katherine a (2012): „Regulation of inflammasome signaling.“. In: *Nature Immunology*. 13 (4), pp. 333–2, DOI: 10.1038/ni.2237.
- Riteau, N; Baron, L; Villeret, B; et al. (2012): „ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation.“. In: *Cell Death & Disease*. Nature Publishing Group 3 (10), p. e403, DOI: 10.1038/cddis.2012.144.
- Schroder, Kate; Tschopp, Jurg (2010): „The inflammasomes.“. In: *Cell*. 140 (6), pp. 821–32, DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.040.
- Shaw, Patrick J; McDermott, Michael F; Kanneganti, Thirumala-Devi (2011): „Inflammasomes and autoimmunity.“. In: *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd 17 (2), pp. 57–64, DOI: 10.1016/j.molmed.2010.11.001.
- Sims, John E; Smith, Dirk E (2010): „The IL-1 family: regulators of immunity.“. In: *Nature Reviews. Immunology*. 10 (2), pp. 89–102, DOI: 10.1038/nri2691.
- Smart, Megan L; Gu, Ben; Panchal, Rekha G; et al. (2003): „P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region.“. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (10), pp. 8853–60, DOI: 10.1074/jbc.M211094200.
- Strowig, Till; Henao-Mejia, Jorge; Elinav, Eran; et al. (2012): „Inflammasomes in health and disease“. In: *Nature*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. 481 (7381), pp. 278–286, DOI: 10.1038/nature10759.
- Suzuki-Kerr, Haruna; Vlajkovic, Srdjan; Donaldson, Paul J; et al. (2008): „Molecular identification and localization of P2X receptors in the rat lens.“. In: *Experimental Eye Research*. 86 (5), pp. 844–55, DOI: 10.1016/j.exer.2008.03.006.
- Uratsuji, Hideya; Tada, Yayoi; Kawashima, Tomohiko; et al. (2012): „P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals.“. In: *The Journal of Immunology*. 188 (1), pp. 436–44, DOI: 10.4049/jimmunol.1003746.

Varga, Aliz; Budai, Marietta; Miliesz, Sándor; et al. (2012): „Ragweed pollen extract intensifies LPS-induced priming of NLRP3 inflammasome in human macrophages.“. In: *Immunology.*, DOI: 10.1111/imm.12052.

Yegutkin, Gennady G (2008): „Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade.“. In: *Biochimica et Biophysica acta.* 1783 (5), pp. 673–94, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, dr. Benkő Szilviának és Budai Mariettának a kísérletek megtervezésében és kivitelezésében, valamint az eredmények értelmezésében és prezentációjában nyújtott támogatásukért, illetve a pályamunka készítése közben gyakorolt építő jellegű kritikájukért. Külön köszönettel tartozom Mariettának, amiért bevezetett a labormunka gyakorlatába és megtanította nekem a kísérletek elvégzéséhez szükséges technikákat, valamint azért, hogy a felmerülő kérdéseimet mindig nagy türelemmel megválaszolta.

Emellett szeretnék köszönetet mondani Varga Aliznak a felülúszókból történő ATP mérésekben való közreműködéséért, illetve minden egyéb segítségéért, amit a kísérletek során nyújtott.

Köszönettel tartozom a DE OEC ÁOK Élettani Intézet vezetőjének, Prof. Dr. Csernoch Lászlónak a tanácsaiért és segítségéért, valamint hogy kísérleteink elvégzéséhez rendelkezésünkre bocsájtotta a P2X7 receptor ellenes antitestet.

Köszönettel tartozom Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetből Prof. Dr. Tózsér Józsefnek aki tanácsaival segítette munkámat.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Függelék

A kísérletek megtervezése, valamint az eredmények értelmezése témavezetőimmal közösen történt. A kísérletek megtervezése során a P2X7 inhibitor kiválasztása az én feladatomból volt.

A kísérletek során saját munkám volt a monociták vérből való szeparálása, a makrofágok differenciálása, kezelése, felszedése. A Western blot és qPCR technikákat, valamint az RNS tisztítást én végeztem. Az ELISA méréseket Budai Mariettával közösen végeztük. A felülúszóból az ATP mérést dr. Benkő Szilvia és Varga Aliz végezte. Az adatok kiértékelése, ábrák készítése témavezetőim javaslatai alapján saját munkám volt.