

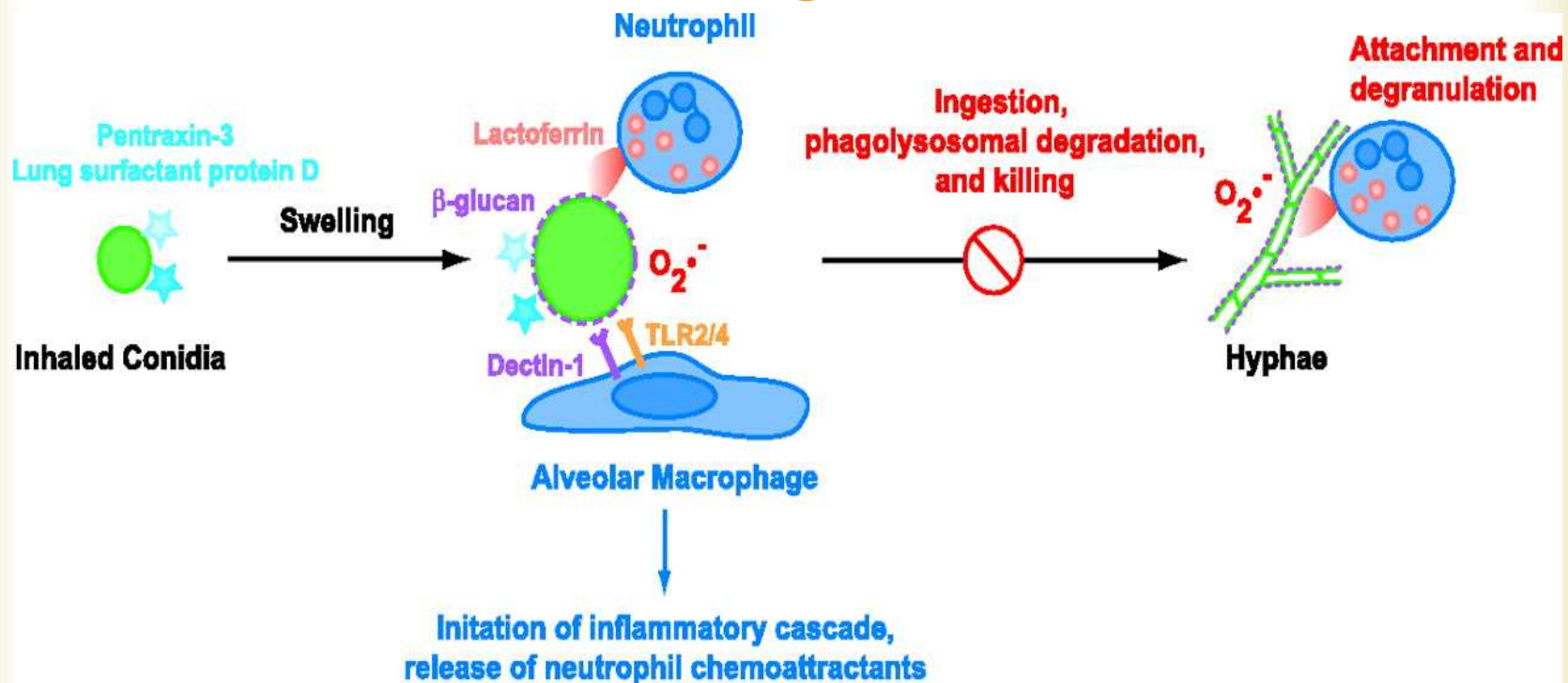
# Aktivacija Toll like receptora i ćelija urođenog imuniteta u prisustvu *Aspergillus fumigatus*-a kod djece



Bokonjic D.,<sup>1</sup> Minic P.,<sup>2</sup> Vasilijic S.,<sup>3</sup> Vucevic D.,<sup>3F</sup>  
Colic M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Pediatric pulmonology, Medical  
faculty Foca, University of East Sarajevo, BH; <sup>2</sup>Institute for  
Mother Care-Belgrade, Serbia; <sup>3</sup>Institute for Medical  
Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

# Odgovor urođenog imuniteta na *Asp. fumigatus*



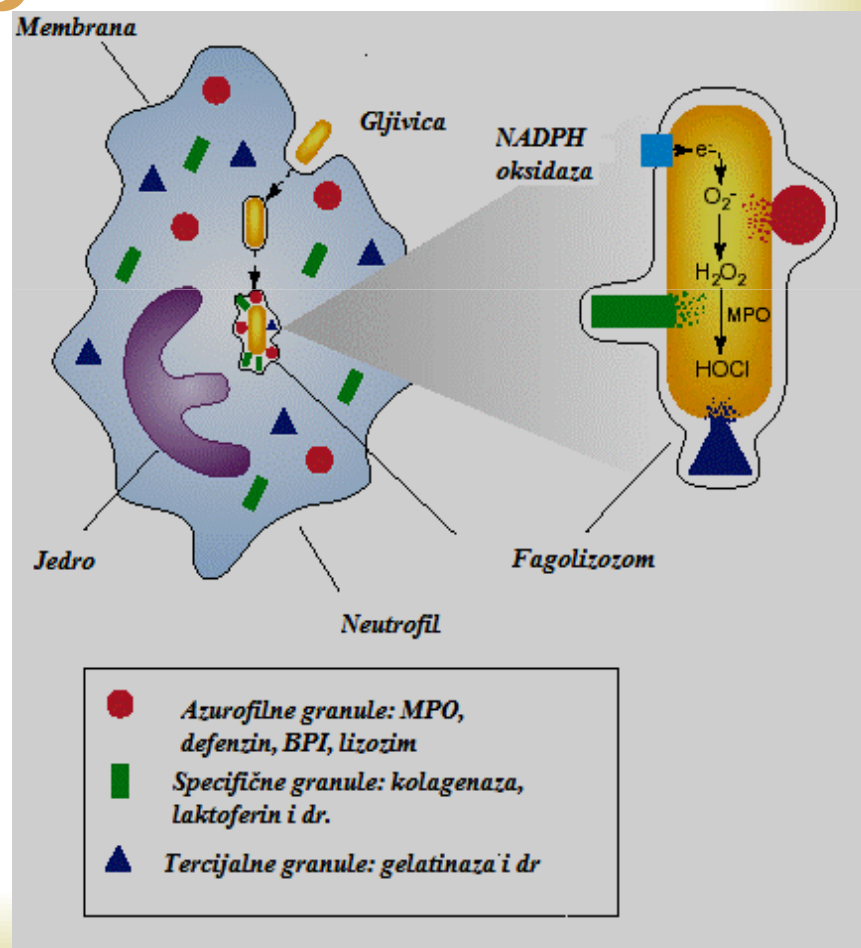
Hohl T M , Feldmesser M Eukaryotic Cell 2007;6:1953-1963

Eukaryotic Cell

# Granulociti



- Granulociti igraju najvažniju ulogu unutar urođenog imuniteta u borbi protiv gljivičnih i drugih infekcija kod ljudi
- Patogene prepoznaju pomoću PAMP receptora, posebno Toll like receptora (TLR)
- Sintetišu različite proteine, kao što su citokini, različiti stimulatorni i antimikrobni molekul, što pokazuje da oni igraju važnu ulogu i u specifičnom imunitetu

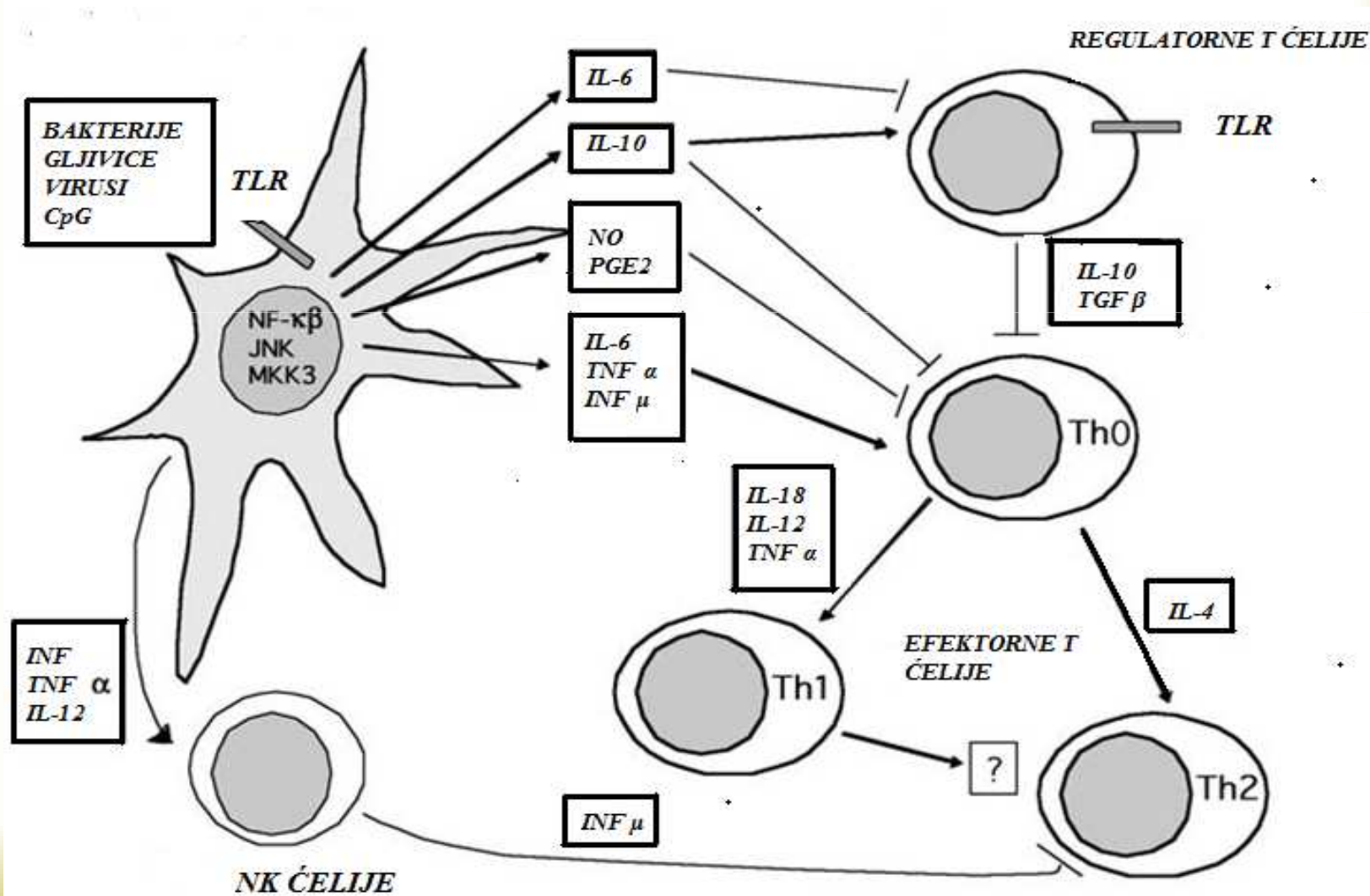


# Dendritične ćelije



- Dendritične ćelije su ključne antigen prezentujuće ćelije koje mogu da iniciraju i regulišu antigen specifični T ćelijski odgovor.
- Brojne studije su pokazale da DC igraju ključnu ulogu u razvoju Th1 i Th 2 odgovora.

# Aktivacija i uloga DC



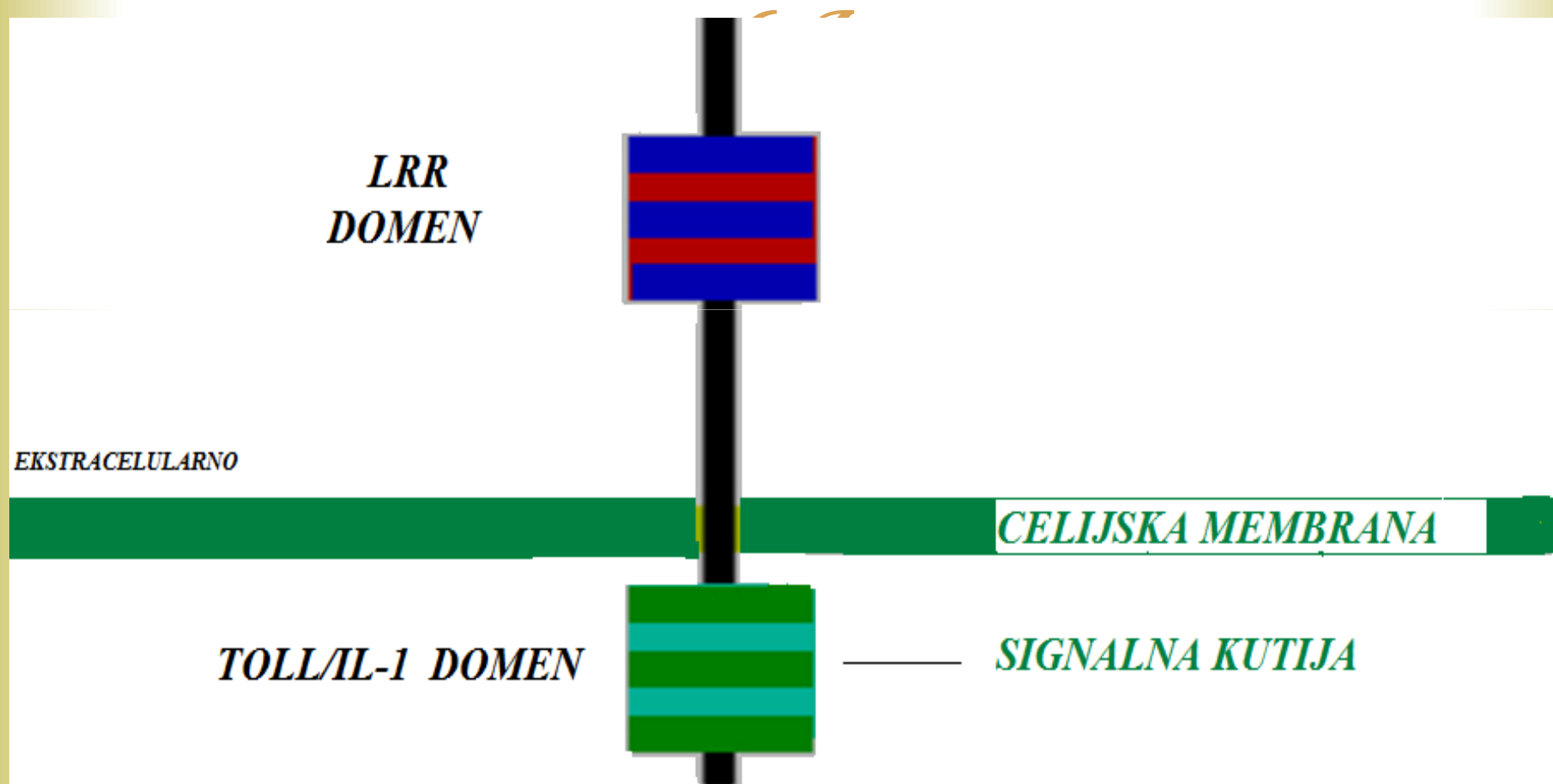


# Toll like receptori



- Otkriće postojanja PAMP receptora u potpunosti je promijenilo ulogu urođenog imuniteta u zaštiti organizma od različitih infekcija
- TLR spadaju u grupu sedam transmembranskih receptora i sastoje se od citoplazmatskog i ekstracelularnog domena.

# GRAĐA TLR



# Toll like receptori i ligandi

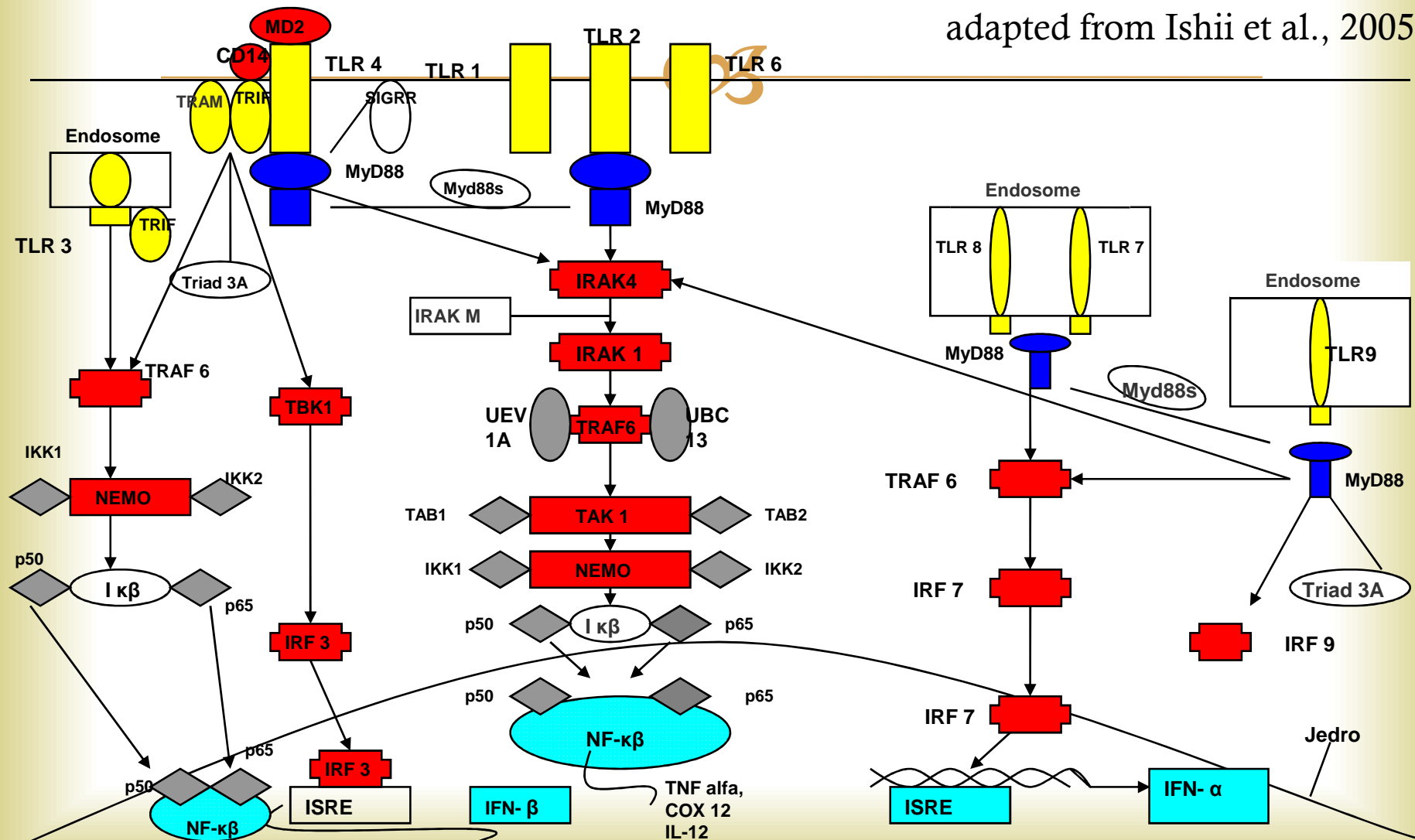
Toll like receptori	Ligandi	Patogeni
TLR 1	Kofaktor za TLR 2	Gram pozitivne, gram negativne bakterije, mikobakterije, gljivice, spirohete
TLR 2	Zymosan, glikolipidi, peptidoglikani, lipoteihoična kiselina, LPS, HSP 60	Gram pozitivne, gram negativne bakterije, mikobakterije, gljivice, spirohete
TLR 3	dsRNK, poli I:C	Virusi
TLR 4	LPS, fibronektin, fibrinogen	Gram negativne bakterije, RSV
TLR 5	Flagelin	Flagele gram pozitivnih i negativnih bakterija
TLR 6	Kofaktor za TLR 2	Gram pozitivne, gram negativne bakterije, mikobakterije, gljivice, spirohete
TLR 7	Imidazokvinolini	Virusi
TLR 8	Imidazokvinolini	Virusi
TLR 9	Nemetilisan CpG	Bakterije, virusi, gljivice
TLR 10 i TLR 11	?????	??????

adapted from Ishii et al., 2005




# TLR SIGNALNI PUT

adapted from Ishii et al., 2005

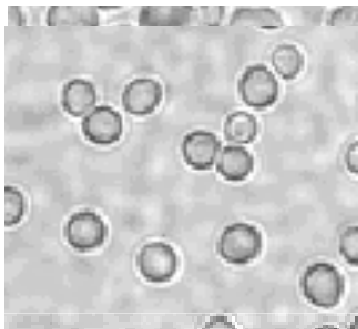


# Uloga TLR

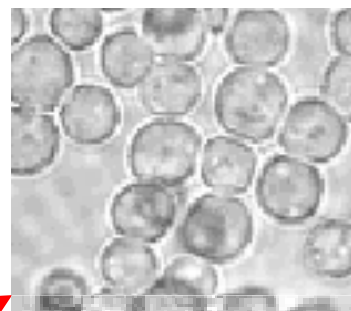
- **UROĐENI IMUNITET:** 
- TLR prepoznaju patogene i preko signalnih puteva aktiviraju transkripcione faktore u jedru ćelije
- Stimulišu sintezu citokina i kostimulatornih molekula i na taj način dovode do inflamatornog odgovora
- **STEČENI IMUNITET:**  
DC preko TLR indukuju ekspresiju gena za različite citokine i kostimulatorne molekule koji opet utiču na naivne T ćelije da se diferenciraju u pravcu Th1 ili Th2 odgovora.

# PRR prepoznaju različite morfolitipove *A. fumigatus*

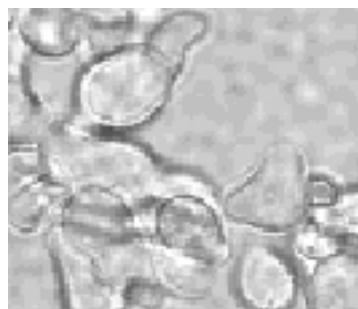
Resting conidia



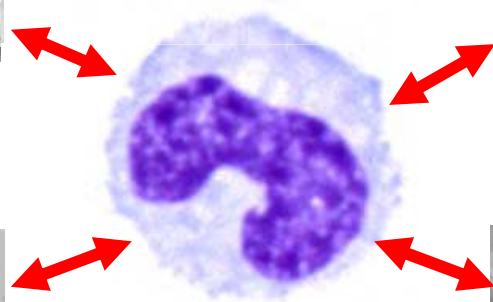
Swollen conidia



Germlings



Hyphae



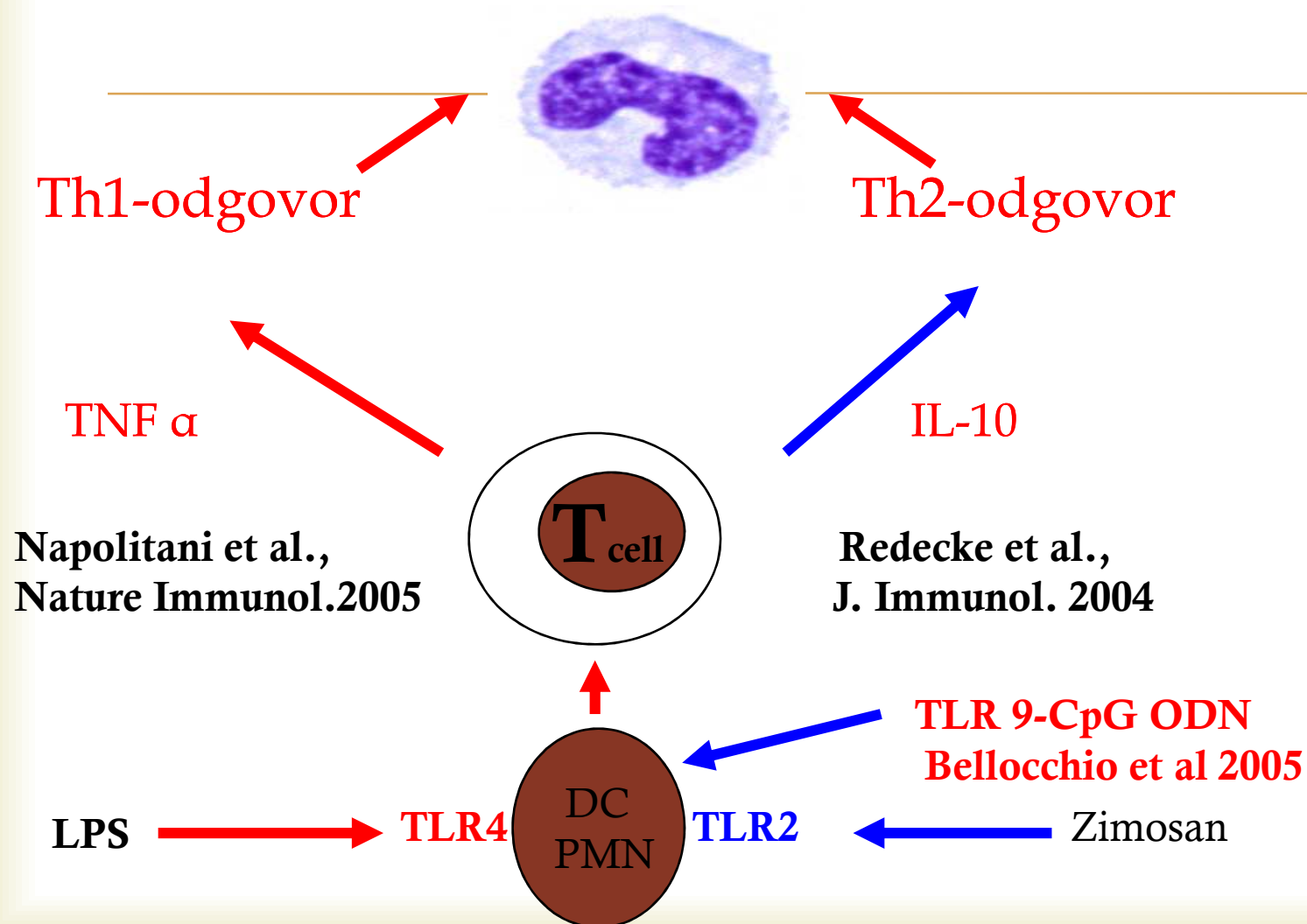
Frank Ebel-Toll like receptors recent advances

# Morfotipovi *Aspergillus fumigatus*-a i TLR



Reference	Asp fumigatus	TLR 2	TLR 4
Wang et al 2001	Hy	-	++
Mambula et al 2002	RC SC Hy	++ - ++	- ++ -
Netea et al., 2003	RC Hy	+ +	++ -
Meier et al., 2003	Rc Hy	+ +	++ ++
Bellocchio et al., 2004	Rc Hy	+ +	++ ++
Hohl et al., 2005	Rc	+	-

# TLR: Th1/Th2 odgovor



# Zaključak



- ❧ Evidentno je da TLR 2 i TLR 4 receptor igraju ulogu u prepoznavanju *A. fumigatus*-a ali njihova uloga se razlikuje od studije do studije
- ❧ Najnovije studije ukazuju da značajnu ulogu u odgovoru na *Asp. fumigatus* igraju TLR 9 i dektinski receptori i ovi receptori udruženi sa TLR 2

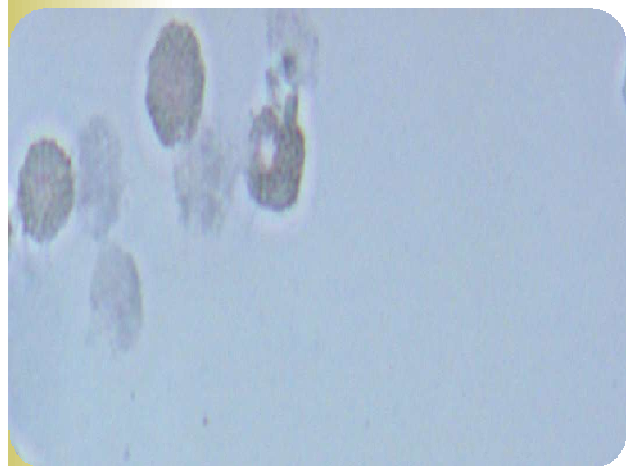
# Metodologija rada



- U studiju su uključena djeca oboljela od CF i ABPA iz pulmološke službe IMD Novi Beograd i sa Dječije univerzitetske klinike u Heidelbergu, njih ukupno 30
- Izolacija ćelija i gljivica i postavljanje kultura
- RT-PCR, izolacija RNK, izolacija jednolančane DNK
- Priprema citospin preparata i imunocitohemija
- Permeabilizacija i citofluorimetrijska analiza
- Analiza citokina korišćenjem humanog Th1/Th2 11plex Kit (Bender MedSystems GmbH)
- Miješana limfocitna reakcija
- Fagocitna i MPO aktivnost granulocita



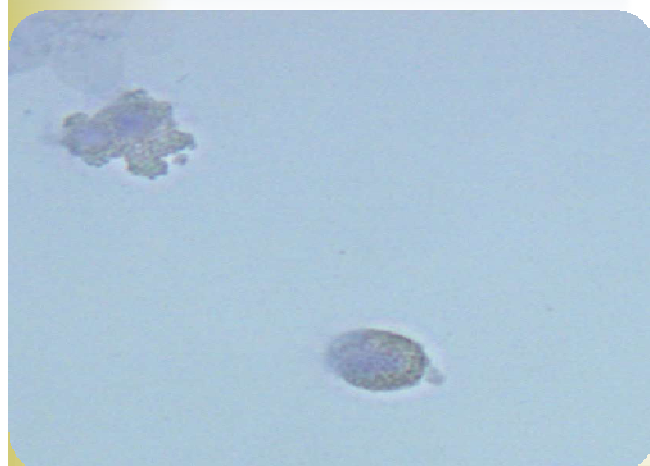
# Ekspresija različitih TLR na nestimulisanim granulocitima



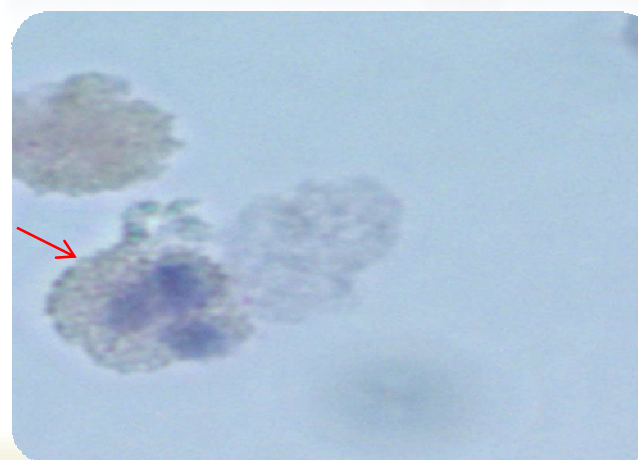
kontrola



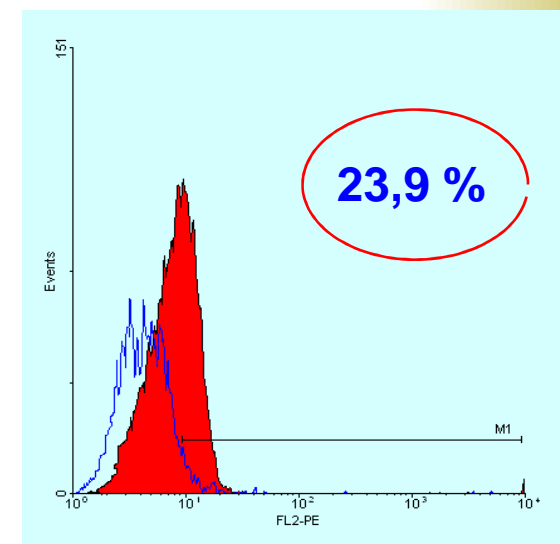
TLR 2



TLR 4

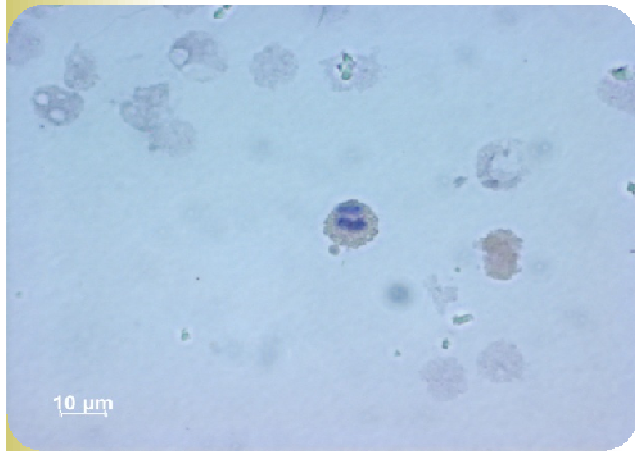


TLR 9

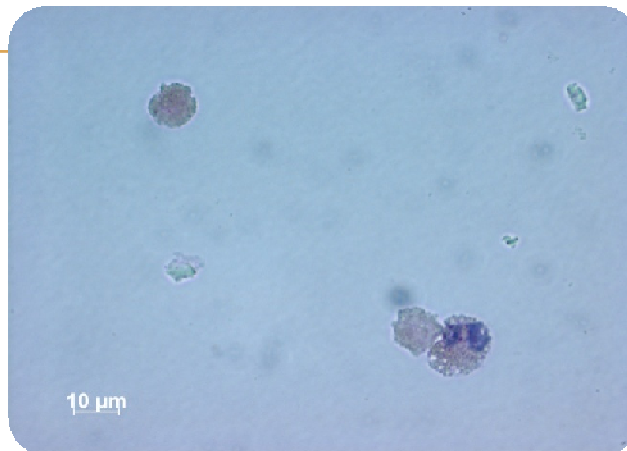


TLR 9

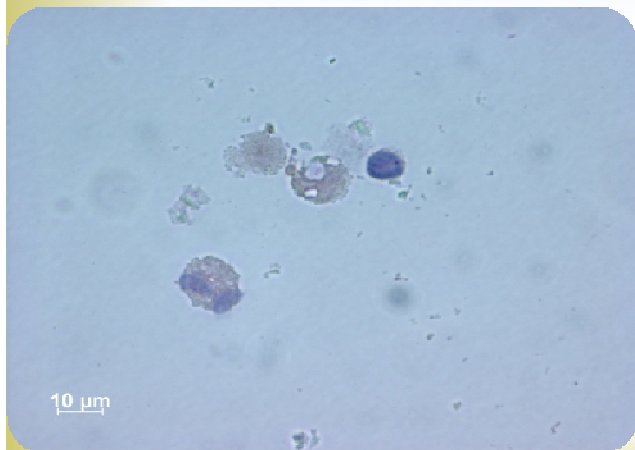
# Ekspresija TLR na granulocitima stimulisanim Asp. fumigatus-om



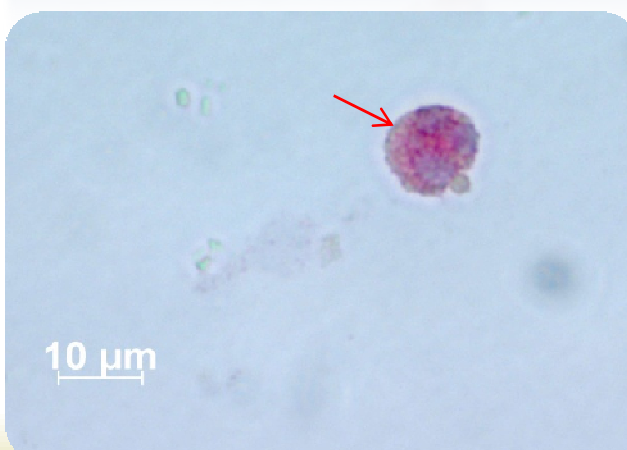
kontrola



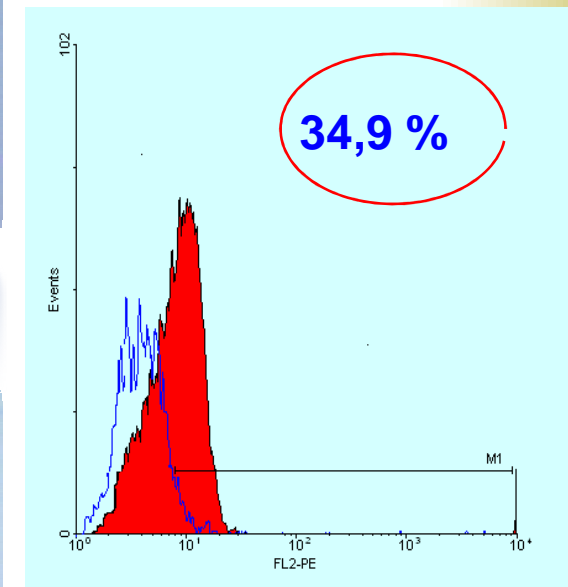
TLR 2



TLR 4



TLR 9



TLR 9

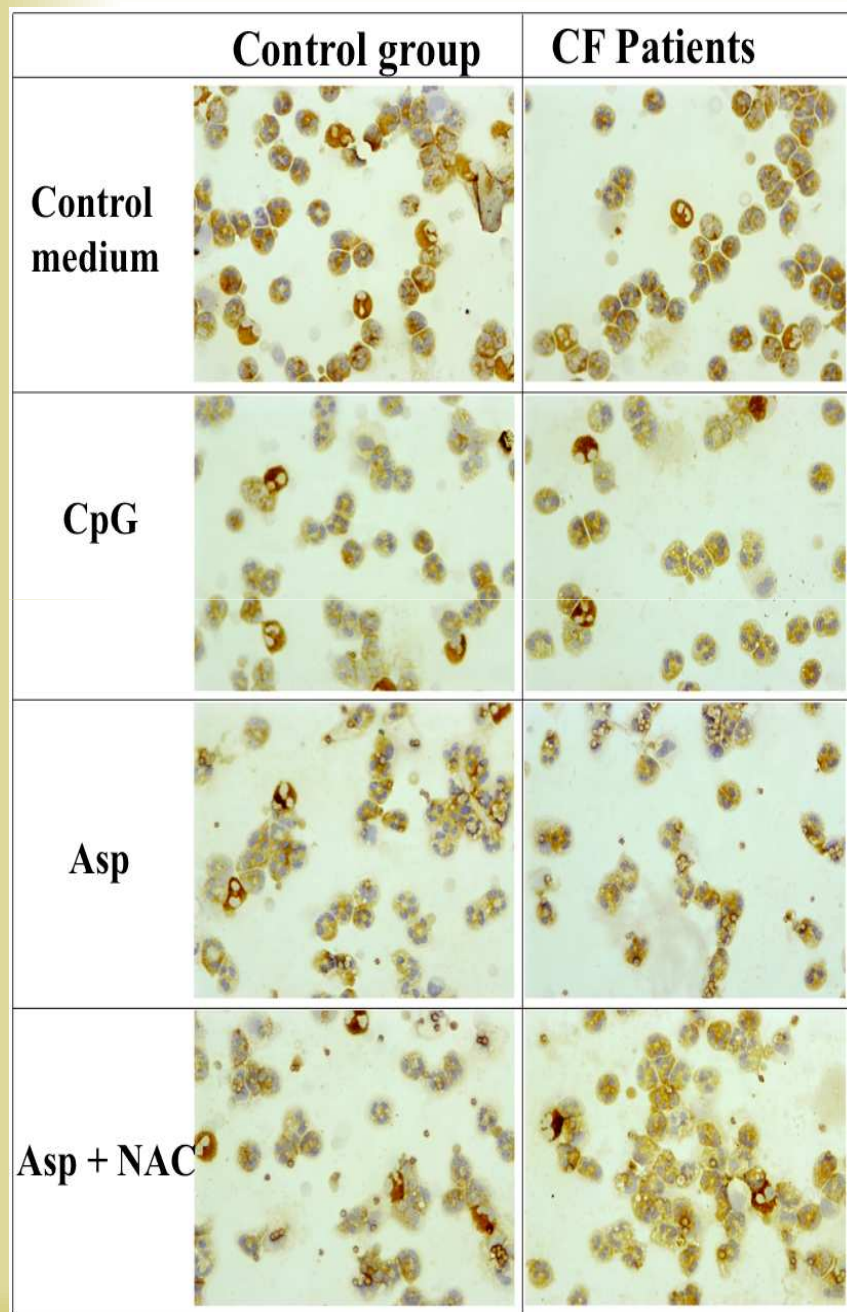
# Uticaj *Aspergillus fumigatus*-a na fagocitnu aktivnost granulocita kod djece koja boluju od CF



	Controls	Patients
Asp.	135±6.0	71.3±6.9
NAC+Asp.	47.6±38.6	42.0±5.2
Citoh. B+Asp.	25.1±16.8	17.7±7.6

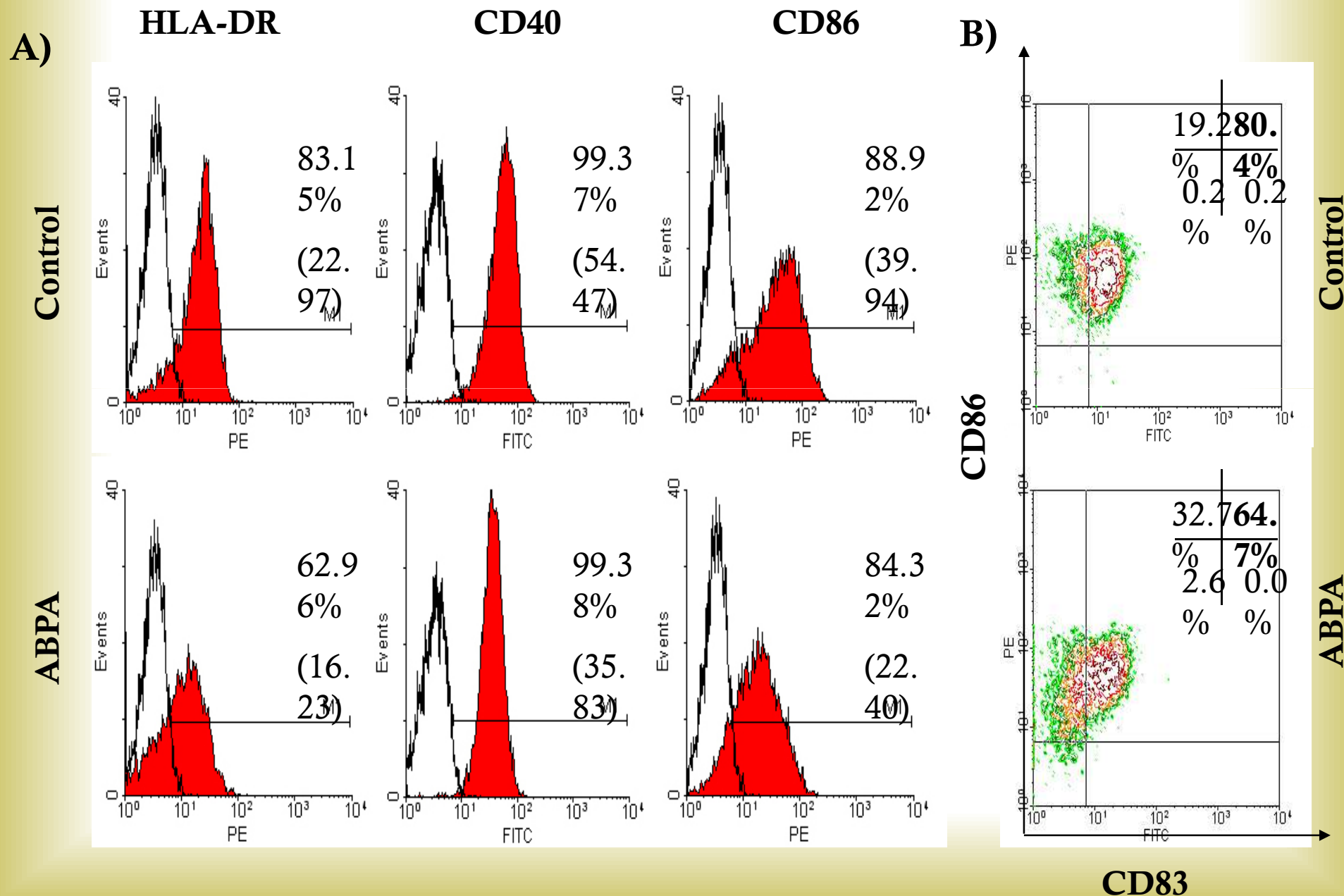
*Rezultati su prikazani preko fagocitnog index-a koji predstavlja ukupni broj internalizovanih konidija / 100 granulocita*

## MPO AKTIVNOST GRANULOCITA



MPO activity		
	Control	CF patients
Control cells	2.47±0.10	1.88±0.33
LPS	2.17±0.09	1.53±0.39
Zim.	2.16±0.10	1.57±0.40
CpG	2.40±0.01	1.84±0.31
NAC	2.01±0.28	1.71±0.41
Asp.	2.14±0.05	1.64±0.40
NAC+Asp.	1.92±0.05	1.52±0.37
Citoh.	1.90±0.14	1.59±0.41

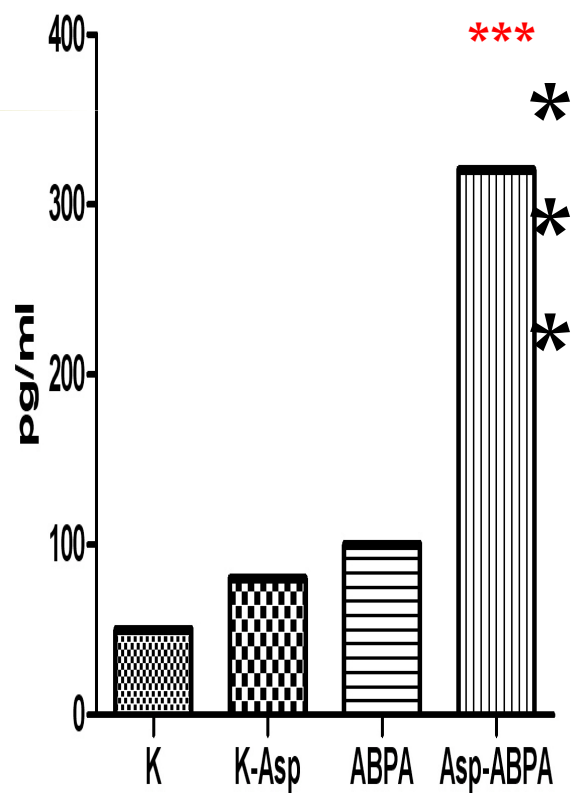
# FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE NEZRELIH I ZRELIH DC KOD DJECE KOJA BOLUJU OD ABPA



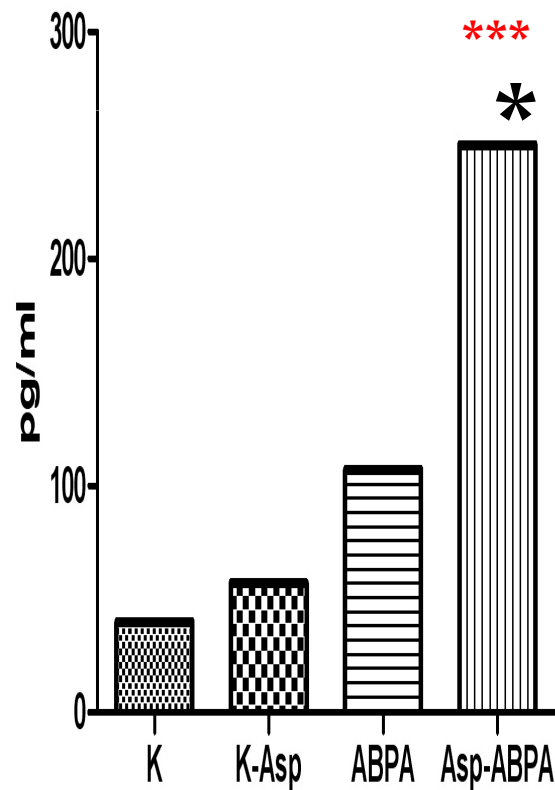
# Uticaj *Asp. fumigatus* na produkciju citokina



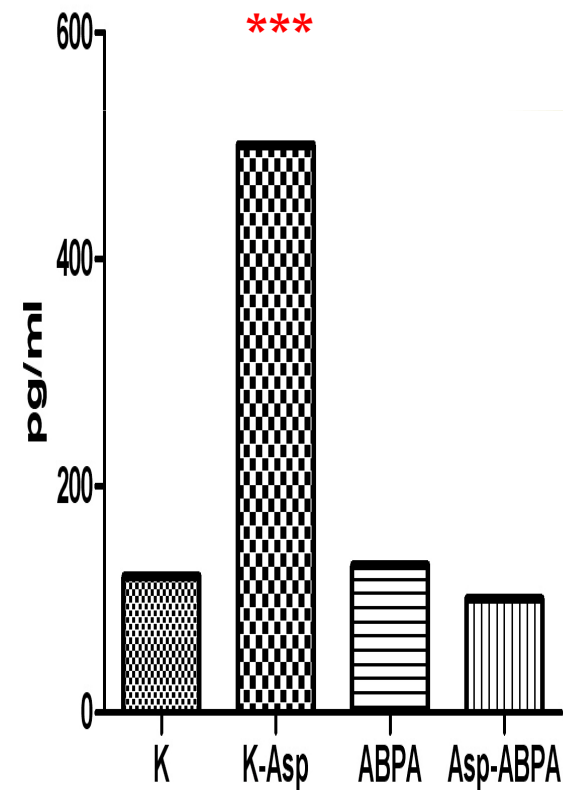
IL-10



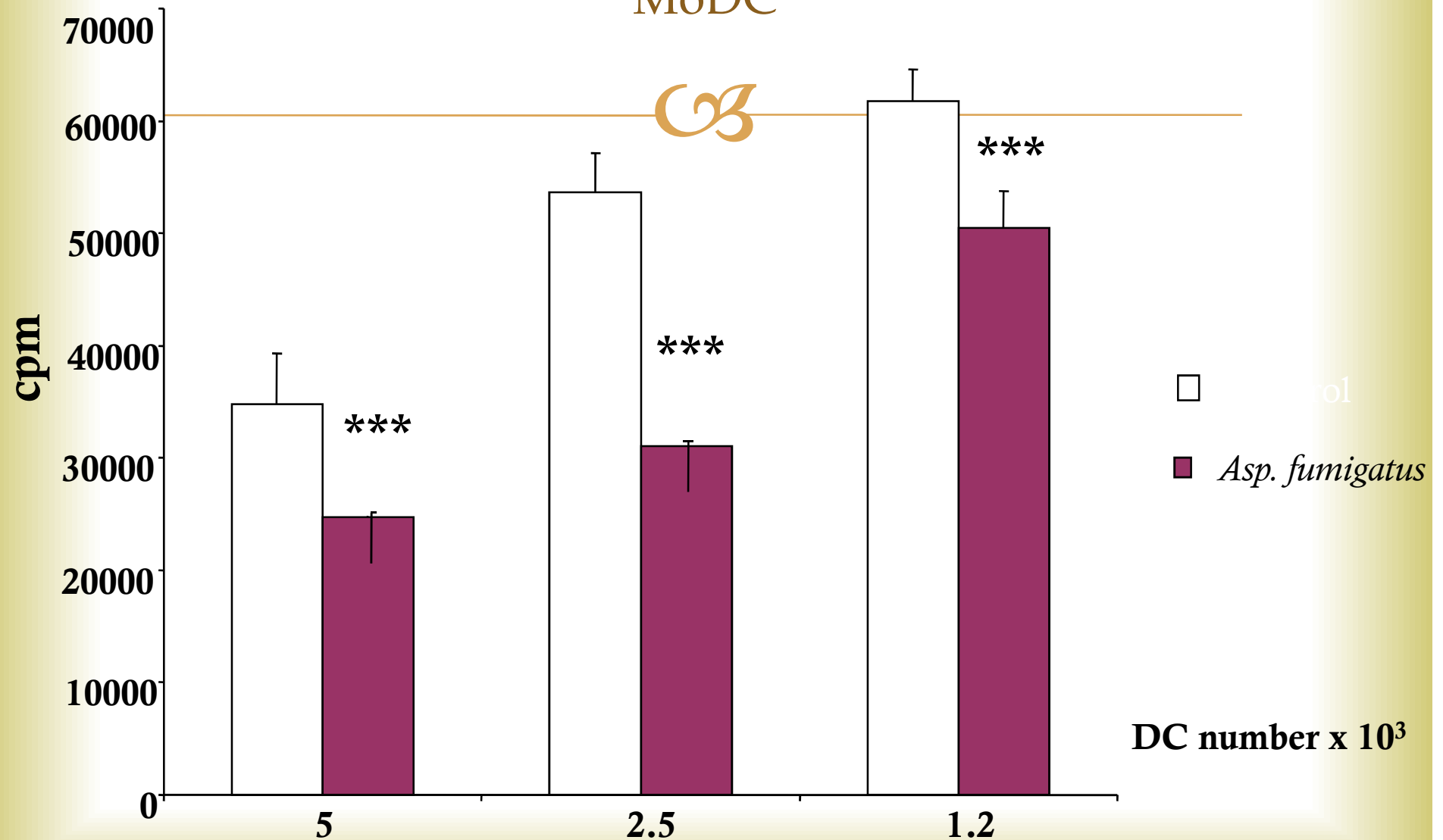
IL-1 $\beta$



IL-8



## Efekat na alostimulatornu aktivnost *Asp. fumigatus*-a MoDC





# Zaključak



- Diferencijacija i maturacija monocitnih dendritičnih ćelija kod djece oboljele od ABPA je poremećena.
- Proces je inhibisan u prisustvu *Asp. fumigatus-a* što zajedno sa povećanom produkcijom IL-10 ukazuje da su ove ćelije tolerogene što bi moglo biti veoma značajno u patogenezi ABPA.
- Smanjena fagocitna funkcija i MPO aktivnost granulocita i njihov smanjen odgovor na TLR-2 i TLR-4 agoniste može biti odgovoran za veću osjetljivost pacijenata na infekcije sa *Aspergillus-om*.

# ZAKLJUČAK



- Modulacija ekspresije TLR 9 receptora na granulocitima mogla bi igrati značajnu ulogu u tretmanu gljivičnih infekcija kod djece.
- Stimulacija Th1 odgovora nakon stimulacije sa TLR 9 agonistima mogla bi povećati efikasnost antifungalnih lijekova.

# Literature and future trends



- ❧ Ramaprakash H, Hogaboam C. Intranasal CpG Therapy Attenuated Experimental Fungal Asthma in a TLR9-Dependent and -Independent Manner Int Arch Allergy Immunol 2010;152:98-112.
- ❧ Ramaprakash H., Toshiro I., et al. Toll-Like Receptor 9 Modulates Immune Responses to Aspergillus fumigatus Conidia in Immunodeficient and Allergic Mice. Infect. Immun. 2009; 77: 108-119.
- ❧ Gazzinelli S; Levitz S et al. Toll-Like Receptor 9-dependent Immune Activation by Unmethylated CpG Motifs in Aspergillus fumigatus DNA. Infect. Immun. 2008, 76(5):2123.



- ❧ Park J. S and Mehrad B. Innate Immunity to Aspergillus Species. Clin. Microbiol. Rev. October 2009 vol. 22 no. 4 535-551
- ❧ Kasperkovitz V.P., Cardenas L.M., Vyas M.J. N-Terminal Proteolytic Cleavage Domain for TLR9 Is Actively Recruited to Aspergillus Proper Intracellular Trafficking. J Immunol 2010;185;7614-7622.