

Received: 2015.01.20  
Accepted: 2016.10.07  
Published: 2017.03.07

## Tolerancja monocytów i makrofagów w odpowiedzi na bakteryjną endotoksynę

### Tolerance of monocytes and macrophages in response to bacterial endotoxin

Ewelina Wiśnik, Ewa Pikus, Piotr Duchnowicz, Maria Koter-Michalak

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, Łódź

#### Streszczenie

Monocyty należą do mieloidalnych komórek efektorowych, tworzą pierwszą linię obrony nieswoistej organizmu przed patogenami oraz pełnią istotną funkcję w utrzymaniu homeostazy organizmu. W wyniku stymulacji monocyty różnicują się w makrofagi mające zdolność do fagocytozy drobnoustrojów i do wydzielania czynników odgrywających główną rolę w regulacji reakcji immunologicznej organizmu. Długotrwała ekspozycja monocytów/makrofagów na lipopolisacharyd bakterii Gram-ujemnych – LPS doprowadza do nabycia przez te komórki immunotolerancji, czego skutkiem jest zaburzenie wielu procesów biologicznych m.in. wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych oraz towarzyszy wielu stanom chorobowym (schorzenia o podłożu immunologicznym, zapalnym, czy nowotworowym). W regulacji aktywności monocytów/makrofagów biorą udział także miRNA, które są jednocześnie zaangażowane w modulację immunotolerancji nabytej przez te komórki. Zjawisko immunotolerancji wpływa również na procesy potranskrypcyjne i potranslacyjne modyfikacje epigenetyczne, co może upośledzać prawidłową reakcję immunologiczną m.in. przez zmiany w regulacji ekspresji wielu genów zaangażowanych w jej przebieg. Przedmiotem pracy jest przedstawienie stanu wiedzy na temat modulacji aktywności monocytów/makrofagów w odpowiedzi na bakteryjną endotoksynę, a także konsekwencji zaburzenia odpowiedzi immunologicznej i równowagi ustroju.

#### Słowa kluczowe:

monocyty/makrofagi • immunotolerancja • bakteryjna endotoksyna

#### Summary

Monocytes belong to myeloid effector cells, which constitute the first line of defense against pathogens, also called the nonspecific immune system and play an important role in the maintenance of tissue homeostasis. In response to stimulation, monocytes differentiate into macrophages capable of microorganism phagocytosis and secrete factors that play a key role in the regulation of immune responses. However excessive exposure of monocytes/macrophages to the lipopolysaccharide (LPS) of Gram negative bacteria leads to the acquisition of immune tolerance by these cells. Such state results from disruption of different biological processes, for example intracellular signaling pathways and is accompanied by a number of disease states (immune, inflammatory or neoplastic conditions). Regulation of monocytes/macrophages activity is controlled by miRNAs, which are involved in the modulation of immune tolerance acquired by these cells. Moreover, the tolerance to endotoxin is conditioned by the posttranscriptional processes and posttranslational epigenetic modifications leading to the impairment of normal immune response for example by alterations in the expression of many genes encoding immune signaling mediators. The aim of this paper is to provide an

<b>Keywords:</b>	overview existing knowledge on the modulation of activity of monocytes/macrophages in response to bacterial endotoxin and impaired immune responses. <b>monocytes/macrophages • immunotolerance • bacterial endotoxin</b>
<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1232858">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1232858</a>
<b>DOI:</b>	10.5604/01.3001.0010.3802
<b>Word count:</b>	3396
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	2
<b>References:</b>	40

**Adres autorki:** mgr Ewelina Wiśnik, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: ewelina-wisnik@wp.pl

## WSTĘP

Monocyty są komórkami pochodzącymi z haploidalnych komórek macierzystych dających początek prekursorom mieloidalnym i limfoidalnym, które w następstwie różnicowania ulegają dalszej specyfikacji w komórki efektorowe predysponowane do pełnienia określonych funkcji w organizmie. Rola monocytów podobnie jak innych komórek mieloidalnych czy limfoidalnych skupia się głównie na ochronie organizmu przed drobnoustrojami przez ich udział w reakcjach odpornościowych. W odpowiedzi na różne bodźce środowiska, tj. przerwanie ciągłości tkanek bądź infekcja patogenami, monocyty wydostają się z krwiobiegu i ulegają przekształceniu w komórki dendrytyczne lub fagocytarne makrofagi tkankowe [28].

Makrofagi opisał Miecznikow, który został laureatem Nagrody Nobla za zidentyfikowanie fagocytów i teorię fagocytozy. Od tego czasu poczyniono duży postęp w odkryciu mechanizmu aktywacji makrofagów i roli jaką odgrywają w organizmach. Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że makrofagi są ważnymi komórkami odporności wrodzonej [14]. Odporność wrodzona, będąca pierwszą barierą ochronną zapewnia szybkość, ale niepełną odpowiedź przeciwbakteryjną organizmu gospodarza, do czasu aż rozwinię się nabyta odpowiedź immunologiczna [29]. Dlatego makrofagi odgrywają istotną rolę w pierwotnej reakcji organizmu na patogeny, prawidłowej homeostazie tkankowej, prezentacji obcych i własnych antygenów [14].

Układ odpornościowy ma jednak pewne wady, które wpływają na szlaki warunkujące prawidłową odpowiedź immunologiczną, a jego działanie może ulegać zakłóceniu pod wpływem pewnych czynników, takich jak np. LPS (lipopolysaccharide) będący endotoksyną bakteryjną [24].

Pierwszy kontakt monocytów i makrofagów z bakteryjną endotoksyną wywołuje pożądaną reakcję organizmu i uruchomienie transkrypcji genów kodujących cytokiny prozapalne w monocytach i makrofagach. Dłuższa ekspozycja tych komórek na bakteryjną endotoksynę powoduje natomiast nabywanie przez monocyty i makrofagi tolerancji na endotoksyny, która polega na zahamowaniu ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne, co upośledza działanie całego układu immunologicznego [24]. U podłoża tego zjawiska leżą epigenetyczne oraz potranslacyjne mechanizmy współpracujące ze szlakami transdukcji sygnału regulującymi ekspresję mediatorów prozapalnych. Zaburzenia wewnątrzkomórkowych szlaków mogą doprowadzić do paraliżu układu odpornościowego, dla którego cytokiny i chemokiny pełnią funkcję cząstek sygnałowych [29].

## RÓŻNICOWANIE MONOCYTÓW W MAKROFAGI ORAZ POLARYZACJA M1, M2

Klasykne monocyty prozapalne zawierają zestaw receptorów rozpoznających konserwatywne wzorce patogenów PRR (pattern recognition receptors), uniwersalne dla szerokiej grupy tych organizmów. W zainfekowanym organizmie wchodzi w interakcje ze znajdującymi się na powierzchni drobnoustrojów charakterystycznymi wzorcami związanymi z patogenami PAMP (pathogen associated molecular patterns), w skład których wchodzi m.in. LPS, glikoproteiny, lipidy, cukry i białka powierzchniowe. Interakcja między PRR a PAMP uruchamia ekspresję cytokin prozapalnych, odpowiedzialnych za inicjację reakcji zapalnej [13].

Do najlepiej poznanych receptorów PRR należą receptory Toll-podobne TLR (*Toll-like receptors*), których N-końcowe fragmenty bogate w leucynę determinują rozpoznawanie PAMP, natomiast C-końcowa domena TIR odpowiada za mechanizmy wewnątrzkomórkowej odpowiedzi na PAMP [13].

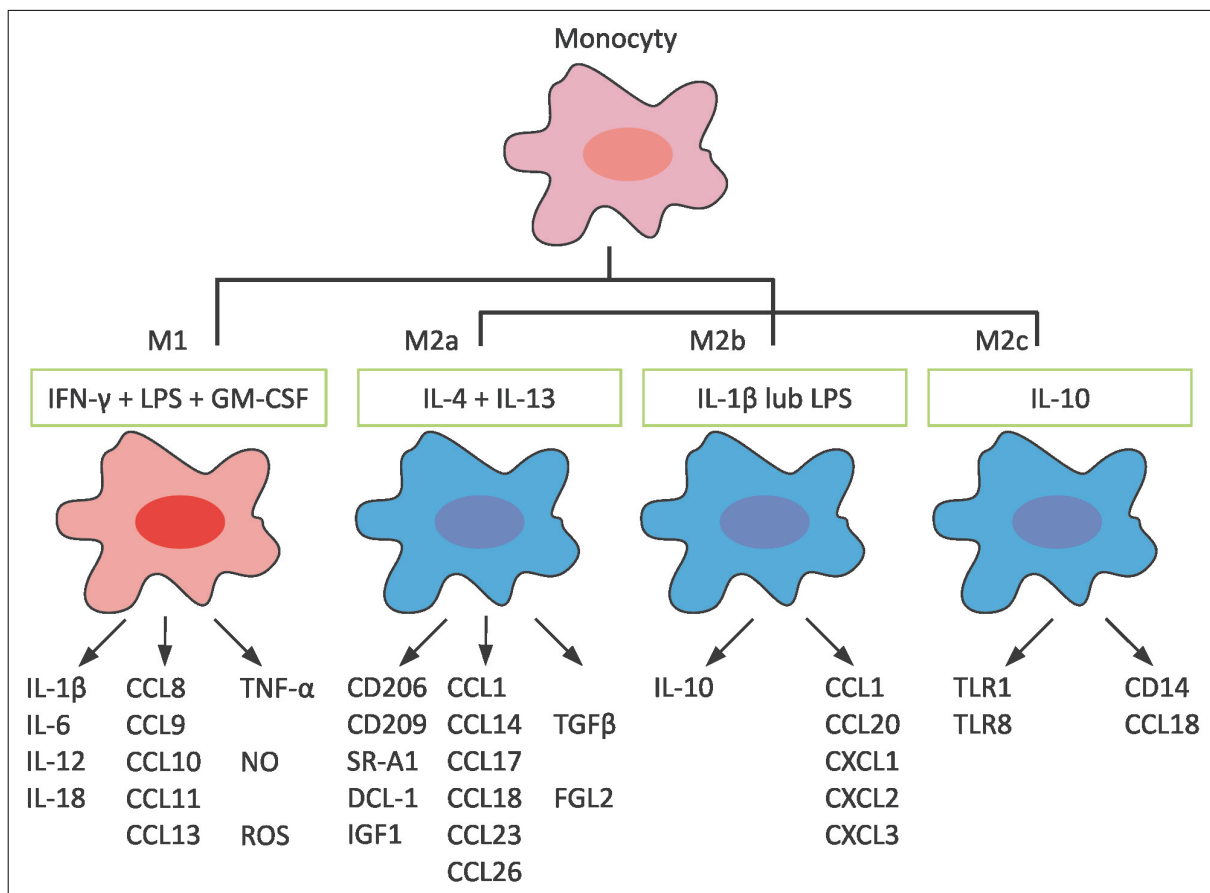
Lipopolisacharydy bakteryjne są antygenami powierzchniowymi charakterystycznymi dla bakterii Gram-ujemnych, a aktywność biologiczna zależy od ich uwolnienia z komórek bakterii. Odgrywają zasadniczą rolę w budowie i funkcji zewnętrznej ich ściany komórkowej. Część cząsteczki bakteryjnej endotoksyny jest zbudowana z lipidu A odpowiadającego za jego aktywność i endotoksyczność rdzenia oligocukrowego będącego domeną środkową i łańcucha O-swoistego warunkującego zmienność wewnątrzgatunkową patogenów. Bakteryjna endotoksyna bierze udział w transporcie hydrofobowych cząsteczek do wnętrza komórek bakteryjnych i jest istotnym czynnikiem w interakcjach mikroorganizm-gospodarz [31].

Monocyty różnicują się w makrofagi pod wpływem czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) lub czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). Polaryzacja makrofagów może się odbywać w sposób klasyczny – prozapalne makrofagi o fenotypie M1 bądź alternatywnej – przeciwzapalne makrofagi o fenotypie M2 [32].

Polaryzacja M1 zachodzi w pierwszym etapie odpowiedzi zapalnej pod wpływem ligandów bakteryjnych recepto-

rów TRL, takich jak interferon gamma IFN- $\gamma$  (interferon gamma) i bakteryjna endotoksyna. Wówczas prozapalne makrofagi M1 wydzielają wiele cytokin prozapalnych, tj. interleukiny IL-1 $\beta$ , -6, -12, -18 i czynnik martwicy nowotworu TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), chemokin prozapalnych CCL 8-11 oraz 13, reaktywne formy tlenu ROS (reactive oxygen species) i uruchamiają metabolizm argininy inicjujący wytwarzanie tlenku azotu NO (nitric oxide) [27,32].

Polaryzacja M2 odbywa się w późniejszym etapie reakcji zapalnej – w procesach regeneracyjnych, a także w nowotworach, włóknieniu tkanek i miażdżycy [27]. Polaryzacja przeciwzapalnych makrofagów M2 może się odbywać trzema drogami polaryzacji: M2a, M2b oraz M2c. Polaryzacja M2a zachodzi pod wpływem IL-4 i IL-13, towarzyszy jej aktywacja czynników, takich jak receptory mannozowe CD206 i CD209 (mannose receptor), aktywatory receptorów steroidowych RNA SR-A1 (steroid receptor RNA activator 1), receptory lektyn typu C DCL-1 (phagocytic C-Type lectin receptor), insulinopodobne czynniki wzrostu IGF1 (insulin-like growth factor 1) oraz wytwarzanie fibroleukiny FGL2 (fibrinogen-like protein 2) i transformującego czynnika wzrostu TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), CCL (CCL13, 14, 17, 18, 23, 26). Polaryzacja M2b zachodzi głównie pod wpływem IL-1 $\beta$  lub bakteryjnej endotoksyny i towarzyszy jej



Ryc. 1. Klasyczna (M1) i alternatywna (M2a-c) aktywacja makrofagów [opracowanie autorskie]

wytwarzanie IL-10, CCL (CCL1, 20), CXCL (CXCL1, 2, 3). Polaryzacja M2c następuje natomiast w odpowiedzi na TGF- $\beta$  i IL-10 towarzyszy jej wytwarzanie CD163, IL-21R, TLR1, TLR8 i CCL18 (ryc. 1) [26,17].

Ważnym aspektem polaryzacji makrofagów jest możliwość ewolucji ekspresji transkrypcji niektórych genów w czasie. Przykładem może być stopniowe tłumienie ekspresji genów w prozapalnych monocytach i makrofagach w odpowiedzi na długotrwałą ekspozycję na bakteryjną endotoksynę, którą nazywa się „endotoksyną tolerancji” [20].

Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe są zaangażowane w modulowanie odpowiedzi immunologicznej organizmu oraz ich zaburzenia w odpowiedzi na stymulację bakteryjną endotoksyną

### **MyD88 i TRIF JAKO MEDIATORY SYGNALIZACJI KOMÓRKOWEJ INICJOWANEJ AKTYWACJĄ RECEPTORA TLR4**

W wyniku kontaktu z patogenami, receptory TLR aktywują wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne. Aktywacja receptorów Toll-podobnych obecnych na powierzchni błon komórkowych monocytów/makrofagów prowadzi do indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej. Dotychczas u ludzi zidentyfikowano 10 rodzajów receptorów TLR: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 obecnych w błonie komórkowej oraz TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 w błonach endosomów i lizosomów umiejscowionych w cytoplazmie [18]. Receptor TLR4 jest najlepiej poznany receptorem TLR rozpoznającym lipopolisacharyd bakterii Gram-ujemnych – LPS. Natomiast długotrwała i/lub kilkukrotna ekspozycja monocytów/makrofagów na działanie bakteryjnej endotoksyny zaburza wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnałów przekazywanych przez receptory TLR, na poziomie samego receptora, białek adaptorowych, enzymów, a także czynników transkrypcyjnych [1].

### **MyD88-ZALEŻNA TRANSDUKCJA SYGNAŁU PRZEKAZYWANA OD RECEPTORA TLR4**

Aktywacja receptora TLR4 jest uwarunkowana obecnością dwóch białek, takich jak: MD2 i mCD14 (postać błonowa białka CD14, zakotwiczona w błonie komórkowej m.in. monocytów/makrofagów, za pomocą łącznika glikofosfatydylinozytoloowego). W wyniku kontaktu z patogenem dochodzi do utworzenia kompleksu TLR4/MD2/mCD14, który rozpoznaje LPS. Dalsza droga transdukcji sygnału od receptora TLR4 odbywa się za pośrednictwem białek adaptorowych, tj. MyD88 (myeloid differentiation 88) i TIRAP (TIR-domain-containing adapter protein) [1]. Homodimer składający się z białek MyD88-MyD88 w obecności białka TIRAP łączy się z receptorem TLR4, czego skutkiem jest aktywacja zarówno receptora, jak i kinazy IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4) oraz fosforylacja kinazy IRAK1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1). Ufosforylowana kinaza IRAK1 łączy się z czynnikiem TRAF6 (TNF receptor-associated

factor 6), aktywując kompleks TAK1/TAB, który prowadzi do aktywacji kinazy MAP (mitogen activated protein kinases) oraz kinaz serynowo-treoninowych IKK (inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B kinase) odpowiadających za fosforylację białek I $\kappa$ B [7]. Fosforylacja białek inhibitorowych powoduje ich degradację w wyniku ubiquitytacji i proteolitycznego rozkładu przez proteasom 26S. Wskutek odłączenia białka inhibitorowego I $\kappa$ B od czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) dochodzi do odsłonięcia sekwencji NLS białka NF- $\kappa$ B, umożliwiając jego translokację do jądra komórkowego, gdzie jako aktywny czynnik transkrypcyjny, reguluje transkrypcję licznych genów docelowych kodujących prozapalne cytokiny, chemokiny, cząsteczki adhezji komórkowej oraz enzymy wytwarzające czynniki prozapalne [38]. W odpowiedzi na stymulowanie komórek bakteryjną endotoksyną zaobserwowano w makrofagach o genotypie MyD88<sup>-/-</sup> oraz TRIF<sup>-/-</sup>, że białko MyD88 jest odpowiedzialne za aktywację NF- $\kappa$ B, a TRIF odpowiada za późniejszą jego aktywację [7].

### **MyD88-NIEZALEŻNA TRANSDUKCJA SYGNAŁU PRZEKAZYWANA OD RECEPTORA TLR4**

Odpowiedź na dsRNA i długotrwałe oddziaływanie receptora TLR4 z endotoksyną bakteryjną prowadzi do MyD88-niezależnej aktywacji receptora TLR4, w której główną rolę odgrywa białko adaptorowe TRIF i białko TRAF3. Ubikwitylacja białka TRAF3 uaktywnia kinazy TBK1 (TANK-binding kinase 1; TANK-TRAF-associated NF- $\kappa$ B activator) i IKK, które następnie fosforylują czynnik transkrypcyjny IRF3 (interferon regulatory factor 3). Wówczas IRF3 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie opóźnia ekspresję dwóch genów, takich jak: TNF- $\alpha$  i IFN- $\beta$ . Natomiast w makrofagach długotrwałe stymulowanie bakteryjną endotoksyną szlak TRIF/IRF3 doprowadza do nadekspresji genu kodującego przeciwapalną cytokinę IL-10 [7,37].

### **ZABURZENIA SZLAKU NF- $\kappa$ B PODCZAS TOLERANCJI BAKTERYJNĄ ENDOTOKSYNĄ**

Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B należy do rodziny białek NF- $\kappa$ B. Dotychczas zidentyfikowano u ssaków pięć czynników transkrypcyjnych: p50/p105 (NF- $\kappa$ B1), p52/p100 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), RelB i c-Rel. Kanoniczny szlak NF- $\kappa$ B jest zaangażowany w proces regulacji transkrypcji wielu ważnych genów, będących mediatorami procesu zapalnego. W warunkach fizjologicznych czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B występuje w cytoplazmie większości komórek w postaci nieaktywnego dimeru utworzonego z białek p50/p65 połączonego z białkami I $\kappa$ B [38]. W odpowiedzi na różnorodne bodźce nieaktywny dimer p50/p65 ulega aktywacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie reguluje transkrypcję docelowych genów. Dostępne dane literaturowe dowodzą, że podczas tolerancji bakteryjną endotoksyną dochodzi do zaburzenia przekazywania sygnału na szlaku NF- $\kappa$ B zarówno w mysich makrofagach, jak i ludzkich monocytach. Zaobserwowano



podwyższoną ekspresję homodimeru składającego się z białek p50/p50. Białka p50 w przeciwieństwie do białek p65 są pozbawione sekwencji TAD (transcription activation domain), umiejscowionej na C-końcu odpowiedzialnej za aktywację transkrypcji. Wówczas homodimer p50/p50 działa jako represor transkrypcji wielu genów, takich jak: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 oraz IL-12 $\beta$ . Pośrednio wpływa natomiast na wzrost ekspresji genów kodujących czynniki przeciwzapalne, takie jak TGF- $\beta$  i IL-10, których nadekspresja jest charakterystyczna dla procesu immunotolerancji [6]. Ponadto podczas tolerancji bakteryjną endotoksyną w cytoplazmie dochodzi do akumulacji inhibitorów I $\kappa$ B głównie: I $\kappa$ B $\alpha$  i I $\kappa$ B $\epsilon$ , które przez przyłączenie się do NF- $\kappa$ B maskują sekwencję NLS, uniemożliwiając translokację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego. Badania przeprowadzone przez Litvaka i wsp. [23] dowodzą, że stymulacja bakteryjną endotoksyną uaktywnia nie tylko białka NF- $\kappa$ B, ale także czynnik transkrypcyjny C/EBP $\delta$  w mysich makrofagach, który jest zaangażowany w regulację ekspresji m.in. genu IL-6.

#### NEGATYWNE REGULATORY SYGNALIZACJI RECEPTORA TRL4 PODCZAS TOLERANCJI ENDOTOKSYNĄ LPS

##### sCD14

Białko CD14 występuje w postaci rozpuszczalnej (sCD14) w surowicy, moczu i innych płynach fizjologicznych. Receptor sCD14 rywalizuje z mCD14 o wiązanie bakteryjnej endotoksyny, czego skutkiem może być brak odpowiedzi na jej działanie zarówno w układzie *in vitro* jak i *in vivo*, zwłaszcza w aktywacji komórek niewykazujących ekspresji mCD14, takich jak komórki śródbłonka, nabłonka i mięśni gładkich [25].

##### ST2

ST2 występujący w błonie komórkowej monocytów/makrofagów należy do negatywnych regulatorów sygnalizacji TRL4. Badania Liu i wsp. [21] dowiodły, że w odpowiedzi na działanie bakteryjnej endotoksyny, białko ST2 hamuje sygnalizację MyD88-zależną, w którą jest zaangażowane m.in. białko TIRAP, uniemożliwiając translokację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i aktywację ekspresji docelowych genów.

##### SIGIRR

Białko SIGIRR (single-immunoglobulin and toll – interleukin1 receptor) występuje w błonie komórkowej monocytów i niedojrzałych komórek dendrytycznych. Jest zbudowane z domeny zewnątrzkomórkowej Ig i wewnątrzkomórkowej TIR, które są niezbędne do hamowania przekazywania sygnału przez receptor IL-1 $\beta$ , natomiast tylko domena TIR jest odpowiedzialna za inhibicję sygnalizacji LPS. SIGIRR hamuje sygnalizację od receptora TRL4, hamując zarówno MyD88-zależną, jak i niezależną ścieżkę transdukcji sygnału [1].

#### Białko MyD88s

Białko MyD88s jest zaangażowane w ujemny mechanizm kontrolujący nadmierną aktywację receptorów TLR. Badania *in vitro* przeprowadzone przez Janssens i wsp. [16] dowodzą, że 16-godzinna stymulacja bakteryjną endotoksyną wywołuje nadekspresję MyD88s w ludzkich nieśmiertelnionych monocytach linii THP1. Skutkiem nadmiernej ekspresji MyD88s jest utworzenie heterodimeru składającego się z białek MyD88s-MyD88 zamiast homodimeru MyD88-MyD88, którego obecność jest wymagana do rekrutacji IRAK4. Wówczas kinaza IRAK1 przez domenę DD oddziałuje z białkiem MyD88s, ale nie zostaje ufosforylowana przez IRAK4. Uniemożliwia to aktywację podrzędnych białek zaangażowanych w przewodzenie sygnału od receptora TLR4 [1].

#### IRK-M

Ekspresja IRK-M jest indukowana głównie w okresie różnicowania makrofagów i podczas sygnalizacji TRL. Wzrost ekspresji kinazy IRK-M w odpowiedzi na niskie stężenie bakteryjnej endotoksyny potwierdzono zarówno u myszy, jak i u ludzkich nieśmiertelnionych monocytów [1]. Domena DD (death domain) umiejscowiona na N-końcu kinazy IRK-M jest niezbędna do interakcji cytoplazmatycznej domeny TIR z białkiem MyD88. C-końcowa domena TIR jest najważniejsza w uruchomieniu kaskady sygnałów, w następstwie kontaktu z białkami adaptorowymi. Kinaza IRK-M może tworzyć również heterodimery z kinazą IRK-1/2 i wiązać się zarówno z białkiem MyD88, jak i białkiem TRF6. Kinaza IRAK-M razem z heterodimerem MyD88/IRAK4 hamuje fosforylację kinazy IRAK1, uniemożliwiając połączenie TRAF6 z IRAK1 i doprowadzając do inhibicji kinaz IKK i MAP, niezbędnych do aktywacji czynników transkrypcyjnych, tj. NF- $\kappa$ B i AP1 (activator protein 1), kontrolujących ekspresję czynników prozapalnych [6].

#### A20

Białko A20 może regulować zarówno MyD88-zależne i niezależne szlaki sygnalizacyjne od receptorów TLR. Hamuje ekspresję TRAF6 na szlaku receptora TLR4, prowadzącego do aktywacji NF- $\kappa$ B. Zahamowanie ekspresji TRAF6 uniemożliwia fosforylację białka I $\kappa$ B, co stabilizuje kompleks I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B w cytoplazmie, blokując aktywację transkrypcji istotnych genów przez czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B. Badania *in vitro* na mysich monocytach z endotoksemią wskazały, że kompleks A20-TRF6 zapobiega aktywacji NF- $\kappa$ B w odpowiedzi na działanie bakteryjnej endotoksyny, a wyciszenie białka A20 pozwala na przywrócenie funkcji TRAF6 i aktywację NF- $\kappa$ B. Białko to może zatem mieć podstawowe znaczenie dla powstawania zjawiska indukowanej endotoksyną tolerancji, ponieważ w badanym układzie eksperymentalnym zaobserwowano ekspresję białka A20 i MKP1 (inhibitor transdukcji sygnału) już po 2 h stymulacji mysich monocytów z endotoksemią bakteryjną endotoksyną [36].

## EPIGENETYCZNE MODYFIKACJE WYWOŁANE PRZEZ TOLERANCJĘ NA BAKTERYJNE ENDOTOKSYNY

Analiza ekspresji genów w komórkach, w których wyindukowano zjawisko tolerancji pozwala na wyróżnienie dwóch klas genów, których transkrypcja inicjowana jest aktywacją receptora TLR4, mianowicie geny klasy T (called tolerizable genes or class T), tj. geny kodujące cytokiny prozapalne, których transkrypcja zostaje wyciszona w krótkim czasie po pierwszej ekspozycji komórek na działanie endotoksyny oraz geny klasy NT (non-toleriza genes or class NT), które pozostały indukowalne lub których transkrypcja ulega zwiększeniu w odpowiedzi na ponowną ekspozycję na bakteryjną endotoksynę [2].

Analiza transkryptomu ludzkich monocytów oraz mysich makrofagów w stanie ET (endotoxin tolerance) wykazała zmiany ekspresji genów spowodowane epigenetycznymi modyfikacjami histonów, które zmieniają stopień upakowania chromatyny, a to ma znaczący wpływ na jego dostępność dla czynników transkrypcyjnych [7]. Mono- i trzymetylacja reszty lizyny w pozycji 4 histonu H3 (H3K4me1, H3K4me3) oraz acetylacja reszt lizyny histonów H3 i H4 w obrębie proksymalnych i dystalnych sekwencji regulatorowych genów wzmacniają ich transkrypcję, podczas gdy metylacja lizyny w pozycji 9 i 27 histonu H3 (H3K9me3, H3K27me3) w kondensacji chromatyny i represji transkrypcji [4].

Według danych literaturowych pierwsza stymulacja makrofagów powoduje trzymetylację reszty lizyny w pozycji 4 histonu H3 (H3K4me3) zarówno w obrębie promotorów genów klasy T, jak i NT, acetylację histonu H4 oraz przyłączenia białka BRG1 będącego składnikiem kompleksu remodelującego nukleosomy, który ułatwia wiązanie się czynników transkrypcyjnych, m.in. NF- $\kappa$ B oraz ekspresję genów od niego zależnych [2,5]. Podczas gdy aktywująca transkrypcję metylacja lizyny w pozycji 4 histonu H3 utrzymuje się w sekwencjach promotorowych genów klasy NT, zostaje usunięta z regionów regulatorowych genów klasy T. W konsekwencji geny klasy NT, w przeciwieństwie do genów klasy T, ulegają transkrypcji w odpowiedzi na ponowną stymulację komórek bakteryjną endotoksyną. Badania Fostera i wsp. [11] zwróciły uwagę na możliwy udział enzymów odpowiedzialnych za epigenetyczne modyfikacje histonów w nabywaniu tolerancji niektórych genów. Inhibicja demetylasy LSD1 (lysine-specific histone demethylase 1), która odpowiada za eliminację metylacji reszt lizyny białek histonowych, za pomocą pargyliny zapobiegała wyciszeniu genów klasy T przez utrzymanie m.in. wspomnianej wcześniej trzymetylacji reszty lizyny w pozycji 4 histonu H3. W makrofagach nie zaobserwowano metylacji reszty lizyny w pozycji 9 i 27 histonu H3 (H3K9me, H3K27me) w żadnej z omawianych klas genów. Inaczej jest w monocytach z nabytą w wyniku ekspozycji na bakteryjną endotoksynę tolerancją, gdzie metylacja reszty lizyny w pozycji 9 (H3K9me) oraz brak fosforylacji seryny w pozycji 10 histonu H3 (H3S10) osłabiało wiązanie się czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (podjednostki

p65) z promotorem genu IL-1 $\beta$  i obniżenie ekspresji cytokiny IL-1 $\beta$ . Podobny mechanizm represji transkrypcji zaobserwowano również w przypadku genu TNF- $\alpha$ . Ponadto, w wyciszeniu genów IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  wykazano udział białka o dużej ruchliwości elektroforetycznej – HMGB1 (high mobility group box 1 protein) ułatwiające wiązanie histonu H1 DNA w obrębie sekwencji promotorowych tych genów, co zwiększało kondensację chromatyny i represję transkrypcji kontrolowanej przez czynnik NF- $\kappa$ B, w którym podjednostka p65 zastępowana była ponadto przez czynnik RelB (v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B) [7,11]. Uwolnienie białka HMGB1 spowodowane działaniem bakteryjnej endotoksyny, powoduje oddysocjowanie RelB z promotorów genów IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , a także eliminuje metylację reszty lizyny w pozycji 9 histonu H3 (H3K9me) [7,34].

## ROLA miRNA W MODULOWANIU AKTYWNOŚCI MONOCYTÓW/MAKROFAGÓW I IMMUNOTOLERANCJI

Innym istotnym mechanizmem regulującym ekspresję genów są cząsteczki niekodującego RNA (non-coding RNA; ncRNA) stanowiące ponad 90% wszystkich transkryptów ludzkiego genomu. Do najlepiej poznanych ncRNA należą: długie niekodujące RNA (long non-coding RNA; lncRNA) oraz mikroRNA (microRNA; miRNA; miR). Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że miRNA odgrywa istotną rolę w różnicowaniu oraz aktywacji fenotypu monocytów/makrofagów. miRNA17-5p, miRNA-20a oraz miRNA-106a, miRNA424 zwiększają ekspresję genów czynnika transkrypcyjnego RUNX1 (runt-related transcription factor 1) oraz receptora M-CSF [10,30]. Podczas różnicowania monocytów do prozapalnych makrofagów o fenotypie M1 pod wpływem GM-CSF dochodzi do obniżenia ekspresji miRNA-142-3p, czego skutkiem jest wzrost aktywności czynnika transkrypcyjnego Egr2 (early growth response 2) [19]. W prozapalnych makrofagach M1 zidentyfikowano ekspresję miRNA26a, miRNA125a, miRNA155, w makrofagach o fenotypie M2a miRNA193b, natomiast w makrofagach fenotypu M2b miRNA27a, miRNA29b, miRNA132, miRNA155 i miRNA222 [12]. Badania przeprowadzone przez Zhu i wsp. [40] dowodzą, że w makrofagach stymulowanych bakteryjną endotoksyną dochodzi do obniżenia aktywności regulatorowego białka sygnałowego SIRP $\alpha$  (signal-regulatory protein  $\alpha$ ), który moduluje odpowiedź zapalną. Inhibicja aktywności SIRP $\alpha$  jest skorelowana z ekspresją miRNA-17, miRNA-20a oraz miRNA-106a, a skutkiem jest aktywacja odpowiedzi zapalnej makrofagów ze wzmożoną syntezą cytokin prozapalnych [40].

Najnowsze doniesienia naukowe wskazują, że miRNA uczestniczą w regulowaniu wrodzonej odporności oraz w modulacji zjawiska immunotolerancji. miRNA146a, miRNA155 oraz miRNA203 należą do najważniejszych i najlepiej opisanych cząsteczek zaangażowanych w regulowanie transdukcji sygnału w odpowiedzi na działanie endotoksyny bakteryjnej. miRNA146a odpowiada za rozwój tolerancji makrofagów na bakteryjną

endotoksynę, która jest indukowana przewlekłą stymulacją receptora TLR4. Podczas zakażeń bakteryjnych, lipopolisacharyd indukuje w makrofagach ekspresję miRNA146a, którego nadekspresję zaobserwowano w czasie rozwoju immunotolerancji w tych komórkach. miRNA146a oraz miRNA147 należą również do negatywnych regulatorów sygnalizacji indukowanej przez ligandy receptorów TLR [35]. Ponadto kilkukrotna stymulacja makrofagów bakteryjną endotoksyną prowadzi do nadekspresji miRNA9 i miRNA155 [15]. miRNA155 jest również negatywnym regulatorem sygnalizacji receptora TLR4 zachodzącej na szlaku MyD88-zależnym (razem z miRNA146a hamuje fosforylację kinazy IRAK4) i TRIF (hamuje aktywację kinaz IKK i białka TBK1) podczas tolerancji endotoksyną. Ponadto miR203 przez obniżenie ekspresji białka adaptorowego MyD88 również reguluje odpowiedź makrofagów na aktywację TLR4 (ryc. 2) [37]. Natomiast badania przeprowadzone przez Zhanga i wsp. [39] na mysiej makrofagowej linii komórkowej RAW264.7 wskazują, że miRNA181b również odgrywa istotną rolę podczas tolerancji makrofagów. Pierwsza stymulacja makrofagów bakteryjną endotoksyną powoduje NF- $\kappa$ B-zależną nadekspresję miRNA181b, która utrzymuje się po dwukrotnej stymulacji endotoksyną, co jest skorelowane z obniżeniem ekspresji genu IL-6. miRNA181b przyłączając się do regionu 3'UTR genu IL-6 powoduje zahamowanie jego translacji, co przekłada się na obniżenie ekspresji IL-6 [39].

#### **WPEŁY ENDOTOKSYNY BAKTERYJNEJ NA IMMUNOSUPRESJĘ TOWARZYSZĄCĄ WIELE STANOM CHOROBYM ORAZ POTENCJALNE METODY LECZENIA**

Immunosupresja występuje w wielu chorobach zagrażających życiu, takich jak nowotwory czy sepsa. Tolerancja komórek układu odpornościowego na lipopolisacharyd bakteryjny w przypadku sepsy przyczynia się do powstania trudności w leczeniu tych chorób, powodując wysoką śmiertelność wśród pacjentów [33].

Główną przyczyną rozwoju sepsy jest występowanie nieprawidłowego działania układu odpornościowego gospodarza, co przyczynia się do powstawania przedłużającego się stanu zapalnego o dużym stopniu nasilenia [3]. Pierwsza faza choroby charakteryzuje się aktywacją leukocytów w odpowiedzi na endotoksynę bakteryjną i pobudzeniem ich do aktywności prozapalnej. W drugiej fazie następuje immunosupresja, charakteryzująca się obniżeniem poziomu ekspresji cytokin prozapalnych, takich jak: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-12 oraz aktywacją cytokin przeciwzapalnych, takich jak: IL-10, TGF- $\beta$  i IL-1RA [7]. W tym wypadku podawanie choremu antybiotyk spowodowałoby uwolnienie bakteryjnej endotoksyny z komórek bakteryjnych, co doprowadziłoby do pogorszenia stanu pacjentów. W celu zmniejszenia śmiertelności wśród pacjentów poszukuje się leków powodujących wyciszenie stanu zapalnego organizmu.

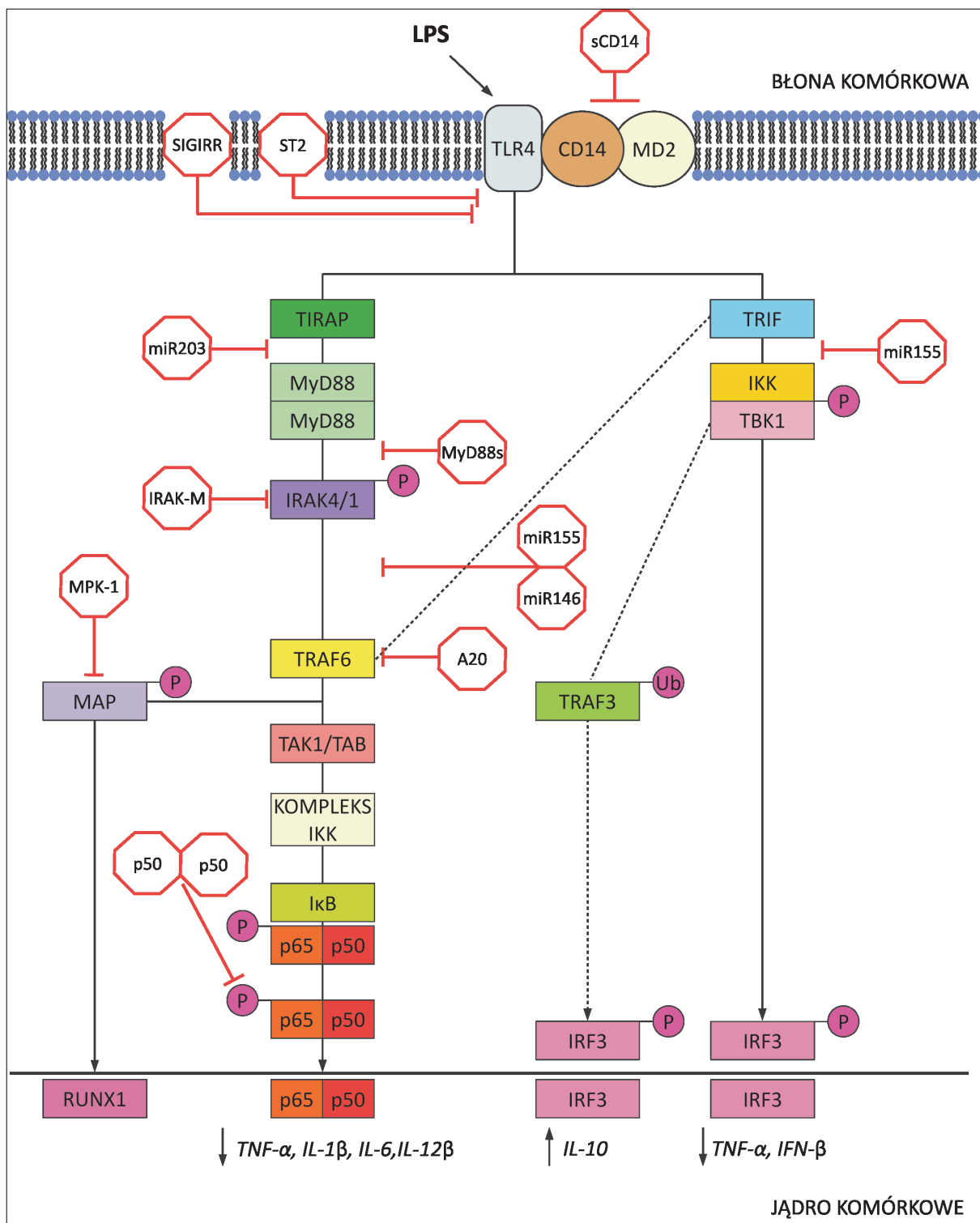
Badania skupiają się na szukaniu antagonistów TLR4, takich jak nietoksyczne pochodne lipidu A [9]. Dokładne poznanie mechanizmu aktywacji i struktury receptorów TLR oraz szlaków sygnałowych, które inicjuje ich aktywacja, dostarczy nowych możliwości interwencji leczniczej przez manipulację odpowiedzi immunologicznej. TLR są związane z rozpoczęciem reakcji odporności wrodzonej, hamowanie ich aktywności znajduje więc uzasadnienie w leczeniu chorób związanych z nadmierną odpowiedzią immunologiczną [8].

Bakteryjna endotoksyna będąca głównym ligandem TLR4 odgrywa podstawową rolę w procesie nowotworzenia, któremu towarzyszy stan zapalny. Jest również odpowiedzialny za aktywację jądrowego czynnika NF- $\kappa$ B odpowiedzialnego za aktywację transkrypcji genów cytokin prozapalnych. W związku z tym hamowanie wiązania bakteryjnej endotoksyny z TLR4 może zmniejszyć aktywację NF- $\kappa$ B hamując tym samym odpowiedź zapalną i powstawanie lub rozwój nowotworu. Przykładem może być rak okrężnicy rozwijający się u chorych z przewlekłym zapaleniem okrężnicy spowodowanym przez bakterie Gram-ujemne [22].

Nietoksyczne pochodne bakteryjnej endotoksyny, takie jak monopochozna lipidu A (MLPA), polimeryczna postać bakteryjnej endotoksyny (SP-LPS) są wykorzystywane w badaniach nad szczepionkami. MLPA podane wraz z bFGF (basic fibroblast growth factor) wykazuje przeciwnowotworowe działanie u myszy, natomiast SP-LPS podane z lekiem Paklitaksel (przedstawiciel przeciwnowotworowych związków z grupy taksanów) wykazuje antynowotworowe działanie poprzez indukcję apoptozy w komórkach docelowych [9].

#### **PODSUMOWANIE**

W pracy zebrano najnowsze doniesienia naukowe dotyczące roli monocytów i makrofagów w powstawaniu zjawiska tolerancji w odpowiedzi na bakteryjną endotoksynę. Tolerancja indukowana endotoksynami jest niekorzystnym zjawiskiem rozwijającym się w komórkach mających zdolność do ekspresji i wydzielania cytokin prozapalnych. Ekspresja większości cytokin jest kontrolowana przez jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B (p50/p65), a transdukcja sygnału indukowana bakteryjną endotoksyną powoduje zmiany w obrębie sekwencji regulatorowych, uniemożliwiając tworzenie heterodimeru p65/p50 przy kolejnej ekspozycji na bakteryjną endotoksynę. Inny mechanizm to regulowanie ekspresji cytokin przez miRNA, które obniża poziom transkryptu niektórych cytokin prozapalnych. Możliwość modulowania aktywności i zmiany właściwości monocytów/makrofagów może się przyczynić do opracowania nowoczesnych terapii mających na celu zahamowanie niechcianej odpowiedzi autoimmunologicznej czy immunologicznej.



Ryc. 2. Transdukcja sygnału przekazywana od receptora TLR4 i jego negatywna regulacja podczas tolerancji bakteryjną endotoksyną [opracowanie autorskie]



## PIŚMIENICTWO

- [1] Antosz H., Choroszyńska D.: Negatywna regulacja sygnalizacji receptorów Toll-podobnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 339-351
- [2] Arbibe L., Sansonetti P.J.: Epigenetic regulation of host response to LPS: causing tolerance while avoiding Toll Errancy. *Cell Host Microbe*, 2007; 1: 244-246
- [3] Aziz M., Jacob A., Wang P.: Revisiting caspases in sepsis. *Cell Death Dis.*, 2014; 5: e1526
- [4] Bayarsaihan D.: Epigenetic mechanisms in inflammation. *J. Dent. Res.*, 2011; 90: 9-17
- [5] Bhatt D., Ghosh S.: Regulation of the NF- $\kappa$ B-mediated transcription of inflammatory genes. *Front. Immunol.*, 2014; 5: 71
- [6] Biswas S.K., Lopez-Collazo E.: Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.*, 2009; 30: 475-487
- [7] Biswas S.K., Shalova I.N.: Endotoxin tolerance as a key mechanism for immunosuppression. INTECH Open Access Publisher, 2012, Chapter 2
- [8] Christmas P.: Toll-like receptors: sensors that detect infection. *Nature Education*, 2010; 3: 85-90
- [9] Fontana L., Pelosi E., Greco P., Racanicchi S., Testa U., Liuzzi F., Croce C.M., Brunetti E., Grignani F., Peschle C.: MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 775-787
- [10] Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R.: Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, 2007; 447: 972-979
- [11] Futoma-Kołoch B., Godlewska U., Pędłowski M.: Lipopolisacharyd bakteryjny jako najnowszy obiekt badań nad sepsą. *Laboratorium - Przegląd Ogólnopolski*, 2014; 7/8: 37-41
- [12] Graff J.W., Dickson A.M., Clay G., McCaffrey A.P., Wilson M.E.: Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 21816-21825
- [13] Grygorowicz M.A., Kozłowska E.: Udział receptorów TLR rozpoznających wzorce molekularne organizmów patogennych w modulowaniu aktywności regulatorowych limfocytów T CD4+ CD25+ FOXP3+. *Post. Mikrobiol.*, 2011; 50: 141-154
- [14] Hao N.B., Lü M.H., Fan Y.H., Cao Y.L., Zhang Z.R., Yang S.M.: Macrophage in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012; 2012: 948098
- [15] Hotchi J., Hoshiga M., Takeda Y., Yuki T., Fujisaka T., Ishihara T., Hanafusa T.: Plaque-stabilizing effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor and/or angiotensin receptor blocker in a rabbit plaque model. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2013; 20: 257-266
- [16] Janssens S., Burns K., Tschopp J., Beyaert R.: Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation by alternative splicing of MyD88. *Curr. Biol.*, 2002; 12: 467-471
- [17] Krausgruber T., Blazek K., Smallie T., Alzabin S., Lockstone H., Sahgal N., Hussell T., Feldmann M., Udalova I.A.: IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.*, 2011; 12: 231-238
- [18] Kulczycka L., Sysa-Jędrzejowska A., Robak E.: Udział receptorów Toll-like w patogenieze wybranych chorób skóry. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 364-371
- [19] Lagrange B., Martin R.Z., Droin N., Aucagne R., Paggetti J., Largeot A., Itzykson R., Solary E., Delva L., Bastie J.N.: A role for miR-142-3p in colony-stimulating factor 1-induced monocyte differentiation into macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1833: 1936-1946
- [20] Lawrence T., Natoli G.: Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011; 11: 750-761
- [21] Litvak V., Ramsey S.A., Rust A.G., Zak D.E., Kennedy K.A., Lampano A.E., Nykter M., Shmulevich I., Aderem A.: Function of C/EBP $\delta$  in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. *Nat. Immunol.*, 2009; 10: 437-443
- [22] Liu J., Buckley J.M., Redmond H.P., Wang J.H.: ST2 negatively regulates TLR2 signaling, but is not required for bacterial lipoprotein-induced tolerance. *J. Immunol.*, 2010; 184: 5802-5808
- [23] Liu L., Li Y.H., Niu Y.B., Sun Y., Guo Z.J., Li Q., Li C., Feng J., Cao S.S., Mei Q.B.: An apple oligogalactan prevents against inflammation and carcinogenesis by targeting LPS/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in a mouse model of colitis-associated colon cancer. *Carcinogenesis*, 2010; 31: 1822-1832
- [24] Lu M., Varley A.W., Mundorf R.S.: Persistently active microbial molecules prolong innate immune tolerance in vivo. *PLoS Pathog.*, 2013; 9: e1003339
- [25] Majewska M., Szczepanik M.: Rola receptorów toll-podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i nabytej oraz ich funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 52-63
- [26] Martinez F.O., Gordon S.: The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime. Rep.*, 2014; 6: 13
- [27] Nazimek K., Bryniarski K.: Aktywność biologiczna makrofagów w zdrowiu i chorobie. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 507-520
- [28] Nazimek K., Filipczak-Bryniarska I., Bryniarski K.: Rola leków, egzosomów i cząsteczek miRNA w modulacji aktywności immunologicznej makrofagów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 1114-1129
- [29] Obata Y., Furusawa Y., Hase K.: Epigenetic modifications of the immune system in health and disease. *Immunol. Cell Biol.*, 2015; 9: 226-232
- [30] Ponomarev E.D., Veremeyko T., Weiner H.L.: MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia*, 2013; 61: 91-103
- [31] Reyes R.E., Andrade A.A., Jimenez R.C., González C.R., Herrera M.O.: Mechanisms of O-antigen structural variation of bacterial lipopolysaccharide (LPS). INTECH Open Access Publisher, 2012, Chapter 3
- [32] Roberts L.M., Ledvina H.E., Tuladhar S., Rana D., Steele S.P., Sempowski G.D., Frelinger J.A.: Depletion of alveolar macrophages in CD11c diphtheria toxin receptor mice produces an inflammatory response. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2015; 3: 71-81
- [33] Salomao R., Brunialti M.K., Rapozo M.M., Baggio-Zappia G.L., Galanos C.H., Freudenberg M.: Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock*, 2012; 38: 227-242
- [34] Smolarczyk R., Cichoń T., Jarosz M., Szala S.: HMGB1 – rola w progresji i terapii przeciwnowotworowej. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 913-920
- [35] Sun Y., Cai J., Ma F., Lu P., Huang H., Zhou J.: miR-155 mediates suppressive effect of progesterone on TLR3, TLR4-triggered immune response. *Immunol. Lett.*, 2012; 146: 25-30
- [36] van't Veer C., van den Pangaart P.S., van Zoelen M.A., de Kruif M., Birjmohun R.S., Stroes E.S., de Vos A.F., van der Poll T.: Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *J. Immunol.*, 2007; 179: 7110-7120
- [37] Wei J., Huang X., Zhang Z., Jia W., Zhao Z., Zhang Y., Liu X., Xu G.: MyD88 as a target of microRNA-203 in regulation of lipopolysaccharide or Bacille Calmette-Guerin induced inflammatory response of macrophage RAW264.7 cells. *Mol. Immunol.*, 2013; 55: 303-309

[38] Wiśnik E., Koter-Michalak M.: Komórkowy szlak sygnalizacyjny zależny od jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i jego zaburzenia w wybranych chorobach nowotworowych. *Post. Biol. Kom.*, 2015; 42: 559-572

[39] Zhang W., Shen X., Xie L., Chu M., Ma Y.: MicroRNA-181b regulates endotoxin tolerance by targeting IL-6 in macrophage RAW264.7 cells. *J. Inflamm.*, 2015; 12: 18

[40] Zhu D., Pan C., Li L., Bian Z., Lv Z., Shi L., Zhang J., Li D., Gu H., Zhang C.Y., Liu Y., Zen K.: MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein  $\alpha$ . *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013; 132: 426-436.e8

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.