

Received: 2014.01.20
Accepted: 2015.05.25
Published: 2015.08.19

Udział białek szoku cieplnego w modulacji aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB podczas zakażeń bakteryjnych*

Participation of heat shock proteins in modulation of NF-κB transcription factor activation during bacterial infections

Justyna Struzik, Lidia Szulc-Dąbrowska, Marek Niemiałowski

Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie

Czynnik jądrowy κB (NF-κB) jest pleiotropowym czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje odpowiedź immunologiczną i procesy zapalne. NF-κB może ulegać aktywacji na skutek zakażeń bakteryjnych z udziałem receptorów Toll-podobnych (TLR), które rozpoznają molekularne wzorce związane z patogenami (PAMP), takie jak lipopolisacharydy (LPS). W wyniku stymulacji komórki następuje fosforylacja inhibitora κB (IκB) i translokacja NF-κB do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do transkrypcji genów kodujących m.in. cytokiny prozapalne i chemokiny. Aktywacja NF-κB podlega modulacji w wyniku szoku termicznego, który indukuje ekspresję białek szoku cieplnego (HSP). NF-κB uczestniczy w regulacji transkrypcji genów kodujących HSP, a należące do tej rodziny białka są modulatorami aktywacji NF-κB, która następuje w wyniku zakażeń bakteryjnych i doprowadza do rozwoju zapalenia. HSP90 to główne białko opiekuńcze występujące w kompleksach z podjednostkami kinazy białka IκB (IKK). Inhibitory HSP90 umożliwiają dysocjację takich kompleksów, blokują aktywację NF-κB oraz proces zapalny podczas zakażeń bakteryjnych. HSP72 i HSP70 modulują ekspresję genów kontrolowanych przez NF-κB w czasie trwania sepsy i spełniają rolę ochronną, a egzogenne HSP70 może wzmacniać odpowiedź zapalną. Bakteryjne HSP, takie jak HSP60 *Chlamydia pneumoniae* i *Helicobacter pylori* czy GroL *Porphyromonas gingivalis*, a także HSP65 i HSP70 *Mycobacterium tuberculosis* oraz DnaK *Francisella tularensis* aktywują NF-κB i proces zapalny. Znajomość tych oddziaływań jest niezwykle pomocna w opracowywaniu sposobów leczenia.

Słowa kluczowe:

zakażenia bakteryjne • czynnik transkrypcyjny NF-κB • białka szoku cieplnego

Summary

Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells (NF-κB) is a pleiotropic transcription factor, which regulates processes of immune response and inflammation. NF-κB can undergo activation as a result of bacterial infections via Toll-like receptors (TLR), which recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMP), such as lipopolysaccharides (LPS). Stimulation of the cells results in phosphorylation of inhibitor κB (IκB) and the translocation

*Praca finansowana z grantu MNiSW [N N308 573740].

of NF- κ B to the nucleus, where the transcription of genes encoding molecules, such as proinflammatory cytokines and chemokines takes place. Activation of NF- κ B undergoes modulation upon heat shock, which induces the expression of heat shock proteins (HSP). NF- κ B, in turn, is involved in the regulation of transcription of genes encoding HSP, while members of HSP family are modulators of NF- κ B activation, which occurs as a result bacterial infections and leads to the development of inflammation. HSP90 is a major chaperone, which is associated with I κ B kinase (IKK) subunits. HSP90 inhibitors enable dissociation of such complexes, thus blocking NF- κ B and inflammatory process during bacterial infections. HSP72 and HSP70, in turn, modulate the expression of NF- κ B controlled genes during sepsis and play a protective role, whereas exogenous HSP70 may enhance the inflammatory response. Bacterial HSP, such as HSP60 of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori*, or GroL of *Porphyromonas gingivalis*, as well as HSP65 and HSP70 of *Mycobacterium tuberculosis* and DnaK of *Francisella tularensis* activate NF- κ B and inflammation. Knowledge of these interactions is extremely helpful in the development of therapeutic strategies.

Keywords: bacterial infections • transcription factor NF- κ B • heat shock proteins

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1165199>

Word count: 2931
Tables: –
Figures: 2
References: 38

Adres autorki: dr inż. Justyna Struzik, Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: justyna_struzik@sggw.pl

Wykaz skrótów:

AP-1 – czynnik transkrypcyjny AP-1 (activator protein 1); **BCR** – receptor komórek B (B-cell receptor); **BFT** – enterotoksyna *Bacteroides fragilis* (*Bacteroides fragilis* enterotoxin); **BRCA1** – białko predysponujące do zachorowania na raka piersi 1 (breast cancer susceptibility 1); **chSP60** – chlamydialne HSP60 (chlamydial HSP60); **CLA** – sprzężony kwas linolowy (conjugated linoleic acid); **COX-2** – cyklooksygenaza 2 (cyclooxygenase-2); **CRP** – białko C-reaktywne (C-reactive protein); **ERK1/2** – kinaza ERK1/2 (extracellular signal-related kinase 1/2); **HIF-1 α** – indukowalny hipoksją czynnik 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α); **HSF-1** – czynnik szoku cieplnego 1 (heat shock factor 1); **HSP** – białko szoku cieplnego (heat shock protein); **HSR** – odpowiedź na szok cieplny (heat shock response); **ICAM-1** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (intracellular cell adhesion molecule-1); **IFN** – interferon (interferon); **IKK** – kinaza inhibitora I κ B (I κ B kinase); **IL** – interleukina (interleukin); **iNOS/NOS-2** – indukowalna syntaza tlenu azotu (inducible nitric oxide synthase/nitric oxide synthase-2); **IRAK** – kinaza IRAK (IL-1R-associated kinase); **I κ B** – inhibitor κ B (inhibitor κ B); **JNK1/2** – kinaza JNK 1/2 (c-jun-N-terminal kinase 1/2); **KC/CXCL1** – chemokina pochodząca z keratynocytów (keratinocyte-derived chemokine/[C-X-C motif] ligand 1); **LPS** – lipopolisacharyd (lipopolysaccharide); **MAPK** – kinaza MAPK (mitogen-activated protein kinase); **MCP-1** – białko chemotaktyczne monocytów 1 (monocyte chemoattractant protein 1); **MyD88** – białko adaptorowe 88 (myeloid differentiation factor 88); **NEMO** – podjednostka regulatorowa IKK γ (NF- κ B essential modulator); **NF- κ B** – czynnik jądrowy κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); **PAMP** – molekularny wzorzec związany z patogenami (pathogen-associated molecular pattern); **pERK1/2** – ufosforylowana postać kinazy ERK1/2 (phospho-ERK1/2); **SAA** – osoczowe białko amyloidowe (serum amyloid A); **SAPK/JNK** – kinaza SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase); **sHSP** – małocząsteczkowe HSP (small HSP); **SMAD** – przekaźniki drugiego rzędu aktywowane nadrodziną białek TGF- β (Sma and Mad related proteins); **TCR** – receptor komórek T (T-cell receptor); **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor β); **TLR** – receptor Toll-podobny (Toll-like receptor); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **VCAM-1** – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1 (vascular cell adhesion molecule-1); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej (vascular endothelial growth factor).

WSTĘP

Regulacja procesów związanych z odpowiedzią immunologiczną i zapaleniem zachodzi za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych, które warunkują ekspresję genów kodujących m.in. cytokin prozapalnych i chemokin. Na skutek zakażeń bakteryjnych zostają uruchomione w komórce kaskady sygnałowe, prowadzące do syntezy białek, takich jak cytokiny prozapalne. Ogromną rolę w mechanizmach odpowiedzi przeciwko patogenom przypisuje się czynnikowi transkrypcyjnemu κB (NF- κB), który może ulegać aktywacji na skutek oddziaływania elementów bakterii z receptorami na powierzchni komórki. Na procesy zapalne indukowane przez NF- κB istotny wpływ ma zjawisko szoku cieplnego, które doprowadza do syntezy białek szoku cieplnego (HSP). HSP, występujące zarówno w komórkach ssaków, jak i u bakterii, mogą być modulatorami procesów związanych m.in. z zapaleniem. Dlatego budzą zainteresowanie jako potencjalny cel działań terapeutycznych. W pracy przedstawiono interakcje zachodzące między odpowiedzią na szok cieplny a aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- κB w przebiegu zakażeń bakteryjnych. Obydwa procesy są głównymi elementami odpowiedzi komórek na różne warunki stresowe i są ściśle ze sobą powiązane, stąd zachodzące między nimi oddziaływania skupiają uwagę badaczy, ponieważ dostarczają informacji na temat regulacji odpowiedzi przeciwzapalnej.

AKTYWACJA I PLEJOTROPOWA ROLA CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO NF- κB

Zakażenia bakteryjne i wirusowe, cytokiny prozapalne, a także interakcje antygeny z receptorem komórek T (TCR) czy B (BCR), a także czynniki stresowe: fizyczne, takie jak promieniowanie UV, promieniowanie γ oraz fizjologiczne, tj.: szok hiperosmotyczny, stres oksydacyjny, mogą wywołać aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κB w komórce (ryc. 1). Czynniki te mają właściwości pleiotropowe i mogą ulegać aktywacji w większości typów komórek w odpowiedzi na różne bodźce, które są związane z aktywacją, przeżywaniem i różnicowaniem się komórek. U kręgowców rodzina białek NF- κB obejmuje podjednostki RelA (p65), c-Rel, RelB, p50 i p52, które tworzą dimery, co umożliwia selektywną regulację docelowych genów, kodujących molekuly zaangażowane w mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, takie jak białka regulatorowe, cytokiny, regulatory proliferacji (cykliny, czynniki wzrostu) i apoptozy oraz białka z rodziny Rel/I κB (białka inhibitorowe NF- κB) [29,33].

W aktywacji kaskady sygnałowej stymulującej czynniki NF- κB przez patogeny biorą udział m.in. receptory Toll-podobne (TLR), które rozpoznają molekularne wzorce związane z patogenami (PAMP), do których należą m.in. określone komponenty bakteryjnej ściany komórkowej. Lipopolisacharydy (LPS), kwas lipoteichojowy, lipoproteiny błony komórkowej i flagelina są rozpoznawane przez TLR1, 2, 4 i/lub 5. TLR3, 7, 8 i 9, wiążą kwasy nukleinowe

mikroorganizmów, włączając ds i ssRNA pochodzące od wirusów RNA, a także DNA większości organizmów [11]. Na skutek stymulacji TLR następuje aktywacja kinaz białkowych, a następnie czynników transkrypcyjnych, takich jak NF- κB . W komórkach niestymulowanych lub niedzielących się białko to występuje w cytoplazmie w postaci nieaktywnej związane z inhibitorem κB (I κB). Aktywacja przez TLR lub inne receptory, w tym receptory cytokin prozapalnych, tj.: interleukiny (IL)-1 β czy czynnika martwicy nowotworu (TNF), uruchamia kaskadę sygnałową, zwaną klasyczną aktywacją NF- κB . Podczas tego procesu I κB ulega fosforylacji przez kompleks kinazy I κB (IKK), zbudowanej z podjednostek katalitycznych IKK α i IKK β oraz podjednostki regulatorowej IKK γ (NEMO), a następnie ubiquitytacji oraz proteasomalnej degradacji (ryc. 1). Uwolniony czynnik NF- κB przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie wiążąc się do sekwencji promotorowych i enhancerów, aktywuje proces transkrypcji genów, których produkty, takie jak: TNF- α , IL-6, IL-12 p40, indukowalna syntaza tlenu azotu (iNOS/NOS-2), czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń (VEGF), uczestniczą m.in. w odpowiedzi prozapalnej [1,20,28,33].

WSPÓŁZALEŻNOŚĆ MIĘDZY ODPOWIEDZIĄ NA SZOK CIEPLNY A AKTYWACJĄ NF- κB

Aktywacja NF- κB może podlegać modulacji w wyniku szoku cieplnego. Odpowiedź na szok cieplny (HSR) jest indukowana przez stres środowiskowy, włączając, oprócz szoku cieplnego, metale ciężkie czy wolne rodniki tlenowe. Inną kategorią induktorów HSR są warunki patofizjologiczne, np. gorączka i zapalenie, zakażenia wirusowe i bakteryjne. Ponadto HSR powstaje pod wpływem czynników wpływających na wzrost i rozwój komórek, w tym onkogenów i protoonkogenów. Zaburzenia konformacyjne białek w chorobie Alzheimera i Parkinsona, a także starzenie się, również indukują HSR. Na skutek działania wymienionych czynników aktywacji ulega czynnik transkrypcyjny, zwany czynnikiem szoku cieplnego 1 (HSF-1), główny element odpowiedzi na działanie induktorów takiego szoku [27].

HSF-1 występuje w postaci nieaktywnych transkrypcyjnie monomerów w nukleoplazmie i, w mniejszym stopniu, w cytosolu. Pod wpływem warunków stresowych HSF-1 może się wiązać z DNA przez trimeryzację (ryc. 1). Białko to ulega fosforylacji w grupach serynowych i w jądrze komórkowym HSF-1 wiąże sekwencje w promotorach genów kodujących białka, takie jak HSP [4]. HSP modulują aktywację czynnika NF- κB , który może regulować transkrypcję genów je kodujących (np. *hsp90 α*) [2,23]. HSP są wysoce konserwatywnymi ewolucyjnie białkami, licznie występującymi w niemal wszystkich przedziałach komórkowych. Na podstawie masy cząsteczkowej zostały zaklasyfikowane do rodzin, takich jak: HSP100, 90, 70, 60, 40 i małowcząsteczkowych HSP (sHSP). W komórkach ssaków odgrywają rolę opiekuńczą i są niezbędne do prawidłowego zwijania białek, ich składania i wewnątrzkomórkowej translokacji [31].

Interakcje między odpowiedzią na szok cieplny i aktywacją NF- κ B wykazano zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Szok cieplny prowadzi do zahamowania aktywacji NF- κ B, jednocześnie wzmacnia ekspresję genu I κ B α , cytoplazmatycznego inhibitora NF- κ B, przez zwiększenie stabilności mRNA I κ B α [13]. Badania wykazały, iż wiele związków, które (ko)indukują HSR są inhibitorami NF- κ B. Inhibitory proteasomu, które powodują wzrost zawartości nieprawidłowo zwiniętych białek w cytosolu, indukują HSR, zapobiegają również degradacji I κ B α , a tym samym uniemożliwiają aktywację NF- κ B. Wiadomo również, iż wiele induktorów HSR hamuje aktywację NF- κ B nie tylko przez stabilizowanie I κ B α , ale również dzięki zdolności do indukowania ekspresji genu kodującego ten inhibitor. Związki takie mogą działać przeciwwzajemnie, bezpośrednio blokując kaskadę aktywacji NF- κ B [26,37]. Induktory szoku cieplnego, np. hipertermia lub inhibitory proteaz serynowych, mogą hamować aktywację NF- κ B przez różne stymulatory. Czynniki te prowadzą do jednoczesnej aktywacji genów cytoprotekcyjnych oraz negatywnej regulacji genów wirusowych i uczestniczących w zapaleniu [31].

Jak już wspomniano, odpowiedź na szok cieplny jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny HSF-1. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, iż białko to hamuje odpowiedź zapalną. NF- κ B jest aktywatorem HSF-1 oraz zwiększa ekspresję HSP72 [23]. Wykazano również rolę HSF-1 w zakażeniach bakteryjnych, w tym jego znaczenie dla obrony przeciwko zakażeniom bakteryjnym w płucach. Myszy pozbawione genu kodującego HSF-1 charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na zakażenie *Mycoplasma pneumoniae*, co objawiało się większą zawartością tego patogenu w płucach w porównaniu z myszami HSF1^{+/+}. Ponadto myszy HSF1^{-/-} wykazywały zaburzenie w indukcji odpowiedzi immunologicznej [15].

UDZIAŁ HSP90 I NF- κ B W ODPOWIEDZI ZAPALNEJ PODCZAS ZAKAŻEŃ BAKTERYJNYCH

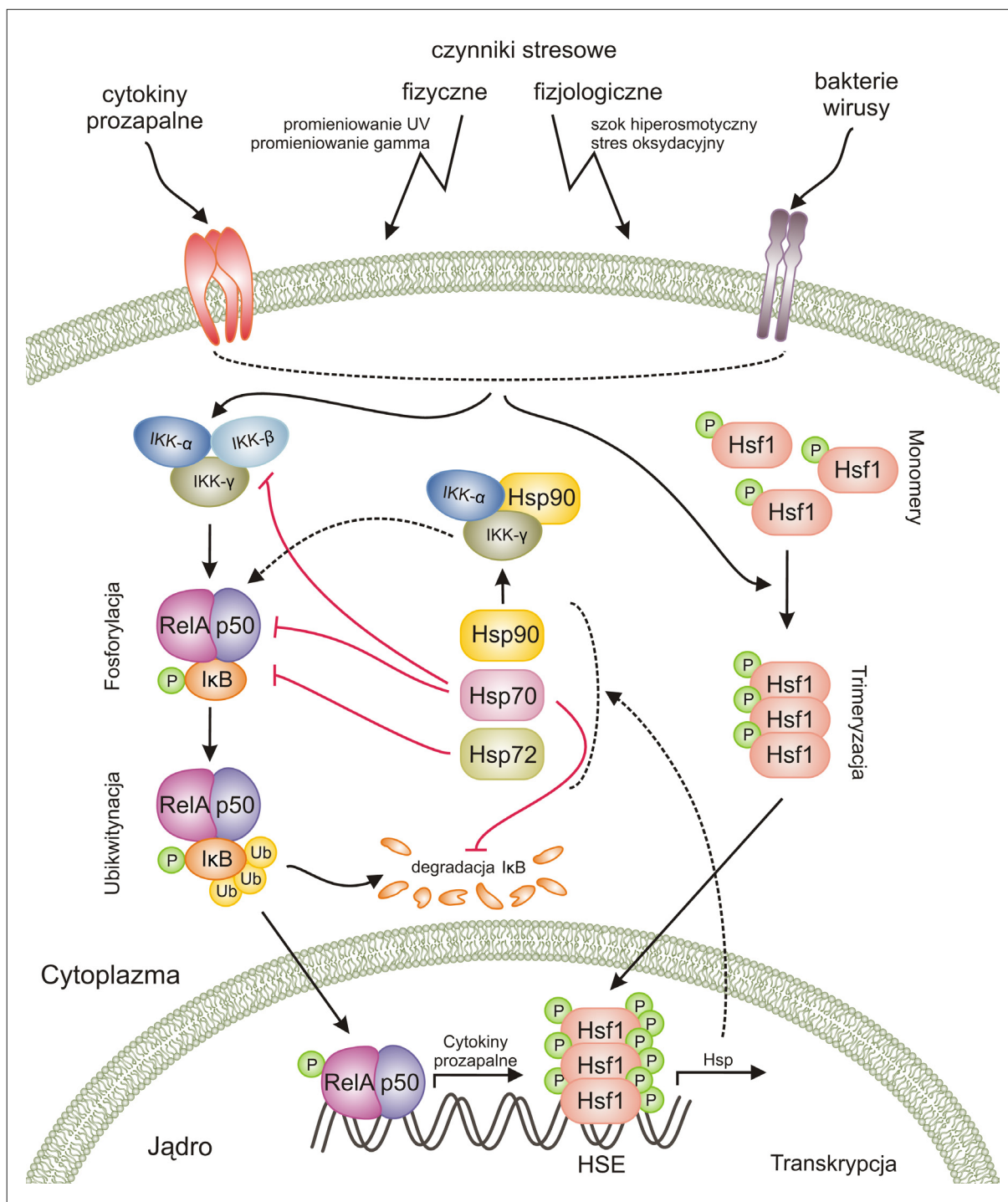
Badania wykazały występowanie interakcji między patogenami a HSP90, głównym białkiem opiekuńczym będącym elementem ścieżek sygnałowych aktywowanych, m.in. podczas odpowiedzi zapalnej. Białko JlpA *Campylobacter jejuni*, patogenu wywołującego ostre zapalenie żołądka i jelit, wiąże się swoiście z izoformą HSP90 α , która stanowi receptor powierzchniowy JlpA. W wyniku takiej interakcji dochodzi do fosforylacji i degradacji I κ B α oraz aktywacji NF- κ B [19]. Dowiedziono również, iż inhibitor HSP90, geldanamycyna, prowadzi do zablokowania wytwarzania IL-8 indukowanej zakażeniem *Helicobacter pylori*, przez inaktywację czynników transkrypcyjnych NF- κ B i AP-1, które regulują transkrypcję genu tej cytokiny. Inhibitor aktywacji IL-8 może posłużyć więc jako czynnik hamujący proces zapalny w zakażeniach *H. pylori* [38]. Takie właściwości wykazują probiotyki, które redukują odpowiedź zapalną wywołaną zakażeniem tym patogenem. Jednym z nich jest sprzężony kwas linolowy (CLA) wytwarzany przez *Lactobacillus acidophilus*. CLA wykazuje zdolność do obniżania

aktywności IKK i NF- κ B, indukowanej przez *H. pylori* i, w konsekwencji, spadku ekspresji genu IL-8. W ludzkich komórkach nabłonka żołądka linii MKN-45 zakażonych *H. pylori* stwierdzono obecność kompleksów HSP90 z podjednostkami IKK α i IKK γ (ryc. 1). Wykazano, iż CLA indukuje dysocjację kompleksu HSP90-IKK γ , co jest związane z aktywnością przeciwwzajemną tego związku [21].

Podobne właściwości wykazują ekstrakty *Artemisia asiatica* Nakai należącej do rodziny Asteraceae. Jeden z aktywnych farmakologicznie składników ekstraktów *A. asiatica* jest syntetyczną pochodną eupatyliny, która jest inhibitorem NF- κ B. Wykazano, iż pochodna ta, DA-6034, hamuje ekspresję IL-8 i białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1) oraz aktywację NF- κ B w komórkach nabłonkowych żołądka linii MKN-45 zakażonych *H. pylori*. Dowiedziono również, iż DA-6034 znacząco blokuje aktywację IKK β indukowaną przez ten patogen. Ponadto DA-6034 indukuje dysocjację kompleksu HSP90 i IKK γ w komórkach MKN-45 zakażonych *H. pylori*, przez co znacząco zmniejsza aktywność IKK, a tym samym hamuje aktywację NF- κ B i działa przeciwwzajemnie [24].

Przeciwwzajemne właściwości eupatyliny zbadano *in vitro* z użyciem linii komórek nabłonka jelitowego HT-29, stymulowanych enterotoksyną *Bacteroides fragilis* (BFT). *B. fragilis* jest czynnikiem wywołującym zapalenie błony śluzowej i choroby o przebiegu biegunkowym, a wytwarzana przez niego enterotoksyna aktywuje NF- κ B i jest induktorem IL-8, co może być związane z transigracją neutrofilów. Dowiedziono, iż w zależności od zastosowanej dawki eupatyliny obniża wytwarzanie IL-8 oraz prostaglandyny E₂ indukowanej przez BFT. Ponadto związek powoduje zahamowanie aktywacji NF- κ B, a więc i znaczne obniżenie ekspresji IL-8 i cyklooksygenazy 2 (COX-2). Badania wykazały, iż eupatyliną zapobiega indukowanej przez BFT fosforylacji I κ B α i IKK. Wykazano, iż związek ten powoduje rozdzielenie kompleksu HSP90 i IKK γ w komórkach HT-29 stymulowanych BFT. Potwierdza to właściwości przeciwwzajemne tego związku [22].

W badaniach wykorzystujących wspomniany wcześniej inhibitor HSP90, geldanamycynę, wykazano, iż związek ten wpływa na aktywację ścieżki sygnałowej NF- κ B indukowanej przez LPS. Myszy poddane ostremu stresowi toksycznemu wywołanemu przez LPS wykazywały czterokrotny wzrost ekspresji wewnątrzkomórkowego receptora TLR4 w limfocytach śledziony. Wzrost ekspresji tego receptora obserwowano także po podaniu geldanamycyny, a podanie obydwu związków normalizowało ekspresję TLR4 w splenocytach. Stres toksyczny powodował wzrost stężenia wolnych podjednostek I κ B, prawdopodobnie w związku ze zwiększoną ekspresją kinazy IKK α / β zaangażowanej w uwalnianie I κ B. Geldanamycyna hamowała aktywność HSP90 w czasie stresu toksycznego, obniżała ekspresję całkowitego NF- κ B i jego ufosforylowanej postaci oraz kinazy IKK α / β , która fosforyluje I κ B α i I κ B β . Sugeruje się, iż HSP90 odgrywa główną rolę w patogenezie stresu toksycznego wywołowanego



Ryc. 1. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF-κB i czynnika szoku cieplnego 1 (HSF-1) oraz interakcje między HSP a aktywacją NF-κB (opis w tekście; opracowanie własne)

przez endotoksynę, ponieważ hamowanie aktywności tego białka obniża reakcję prozapalną na poziomie receptora TLR4 oraz aktywacji kaskady NF-κB, a także kinazy SAPK/JNK [16].

Doświadczenia z użyciem modelu zapalenia błony naczyniowej oka u szczurów dowiodły, iż hamowanie HSP90

prowadzi do spadku ekspresji cytokin prozapalnych: TNF-α, i IL-1β oraz VEGF, odgrywających ważną rolę w patogenezie tego schorzenia. Ekspresja tych białek jest wywoływana przez LPS i podlega regulacji przez NF-κB oraz indukowany hipoksją czynnik 1α (HIF-1α) [30]. Stwierdzono, że 17-AAG, analog geldanamycyny, który jest również inhibitorem HSP90, powoduje reduk-

cję ilości białka podjednostek IKK α i IKK β i zahamowanie aktywacji NF- κ B oraz ekspresji IL-8 w ludzkich komórkach płuc linii A549, zakażonych *Legionella pneumophila* [36]. Takie właściwości inhibitorów HSP90 czynią je interesującym przedmiotem badań klinicznych. Czynniki hamujące aktywność HSP90 mogą być uznane za potencjalne molekuly przeciwrakowe, gdyż wykazują pożądany profil farmakokinetyczny przy braku zagrożenia poważnymi efektami ubocznymi.

ROLA NF- κ B ORAZ HSP70 I HSP72 W MECHANIZMACH SZOKU SEPTYCZNEGO I ODPOWIEDZI PROZAPALNEJ

Badania dotyczące wpływu HSP na procesy zapalne indukowane endotoksyną mają duże znaczenie w poznaniu mechanizmów szoku septycznego. W doświadczeniach określa się m.in. wpływ szoku cieplnego na aktywację NF- κ B i ekspresję genów regulowanych przez ten czynnik.

Badania *in vitro* z użyciem makrofagów mysich linii RAW 264.7 poddanych szokowi cieplnemu wykazały, iż silny szok cieplny (ogrzewanie do temp. 43°C przez 90 min) powoduje całkowite zahamowanie aktywacji NF- κ B w okresie 6 godz. od powrotu do prawidłowych warunków. Wykazano, iż komórki poddane silnemu szokowi cieplnemu nie są zdolne do wytwarzania HSP72, nie wykazują również zdolności do aktywacji NF- κ B pod wpływem LPS. Stwierdzono, iż hamowanie aktywacji NF- κ B oraz zdolności komórek do syntezy HSP są uzależnione zarówno od siły szoku cieplnego, jak i czasu, jaki upłynął od powrotu do prawidłowych warunków [32].

W makrofagach mysich linii J774 poddanych takiemu szokowi, a następnie stymulowanych LPS, dochodzi do zmniejszenia ekspresji genu dla COX-2, głównego enzymu prozapalnego, a także aktywacji HSF-1 i wzrostu stężenia HSP72 oraz zablokowania aktywności NF- κ B [17]. Szok cieplny powoduje również hamowanie indukowanej LPS aktywacji NF- κ B i wytwarzania cytokin prozapalnych TNF- α i IL-6 w izolowanych od myszy komórkach Kupffera, które odgrywają ważną rolę w patogenezie sepsy [34]. Badania na modelu szczurzym wykazały, iż w przebiegu sepsy, kiedy dochodzi do wzrostu aktywności NF- κ B i nadekspresji TNF- α i iNOS w komórkach wątroby, szok cieplny przyczynia się do zahamowania tej aktywności. Sugeruje się, iż białko HSP72 wykazuje zdolność do hamowania septycznej aktywacji i jądrowej translokacji NF- κ B dzięki tworzeniu kompleksu z NF- κ B/I κ B, przez co moduluje ekspresję genów kontrolowanych przez NF- κ B podczas sepsy i spełnia rolę ochronną (ryc. 1) [10]. Inne badania, dotyczące HSP70 wykazały, iż nadekspresja HSP70 u szczurów zapobiega degradacji I κ B α , translokacji podjednostki p65 do jądra komórkowego w wątrobie oraz indukcji wytwarzania TNF- α i IL-6 pod wpływem LPS, co sugeruje udział HSP70 w regulacji aktywacji NF- κ B indukowanej LPS *in vivo* [12].

Zahamowanie indukowanej endotoksyną (LPS) aktywacji NF- κ B i obniżenie ekspresji cytokin prozapalnych (TNF- α

i IL-6) w wątrobie myszy może być jednym z mechanizmów korzystnego działania HSR, wywołanego arseninem sodu, który powoduje wzrost ekspresji HSP70. Zapobiega to wystąpieniu indukowanych endotoksemią zmian histologicznych w wątrobie, która odgrywa ważną rolę w patogenezie sepsy przez uwalnianie różnych cytokin i wydzielanie białek ostrej fazy [9]. Stwierdzono również, iż konstytutywna ekspresja ludzkiego białka HSP70 w szczurzych komórkach glejaka C6 ma wpływ na hamowanie ekspresji genu kodującego NOS-2, w wyniku blokowania jądrowej translokacji NF- κ B, następującej po stymulacji komórek LPS i cytokinami [TNF- α , IL-1 β i interferonem (IFN)- γ]. Wykazano, iż szok cieplny znosi skutek gwałtownego spadku stężenia I κ B α w nietransfekowanych komórkach C6, który zachodzi na skutek aktywacji LPS i tych cytokin [14].

Dowiedziano również, iż egzogenne podane białko HSP70 może wiązać błonę komórkową z dużym powinowactwem, a także aktywować NF- κ B oraz stymulować wytwarzanie cytokin prozapalnych w ludzkich monocytach przez zależną od CD14 aktywację szlaku MyD88/IRAK/NF- κ B. Wykazano, iż indukowana białkiem HSP70 aktywacja NF- κ B i synteza cytokin prozapalnych odbywa się przez TLR2 i TLR4 w sposób zależny od CD14. Dzięki takim właściwościom białko HSP70 może być wykorzystane jako adiuwant oraz induktor odpowiedzi przeciwnowotworowej [6].

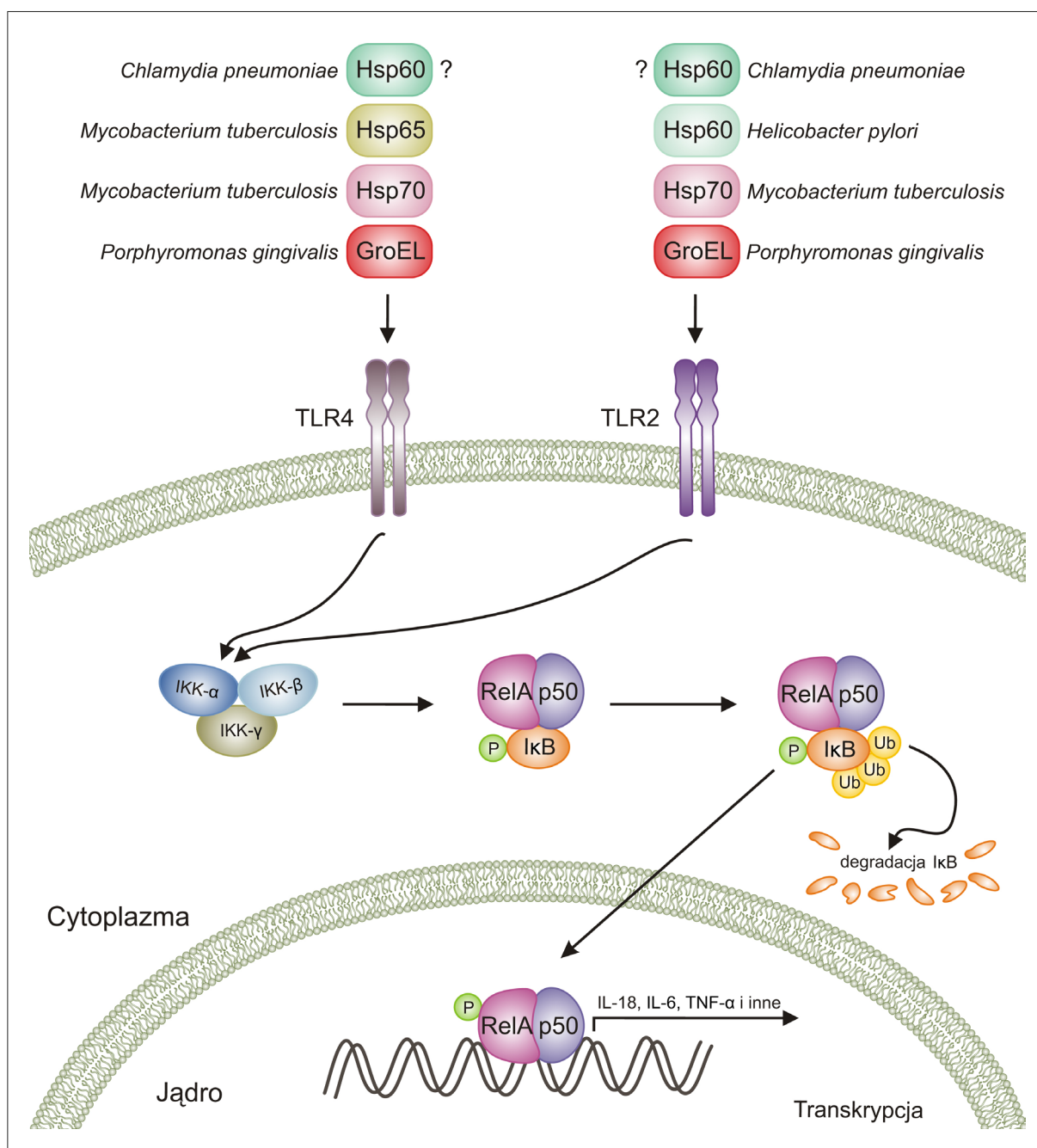
Gally i wsp. wykazali, iż w przypadku zakażenia *M. pneumoniae* myszy HSF^{-/-} wykazywały mniejszą zawartość białka TLR2 w tkankach płuc w 4 i 24 godzinie po zakażeniu (g.p.z.) w porównaniu z myszami HSF^{+/+} zakażonymi *M. pneumoniae*, a w 72 g.p.z. wyższe u HSF^{-/-}. Obserwowane zjawiska potwierdzono badaniem ekspresji mRNA. Ponadto stężenie białka HSP70 w popłuczynach oskrzelowo-płucnych było znacznie wyższe u myszy HSF^{-/-} i HSF^{+/+} zakażonych *M. pneumoniae* w porównaniu z niezakażonymi zwierzętami kontrolnymi. Egzogenne HSP70 w badaniach wykorzystujących makrofagi myszy HSF^{+/+} i HSF^{-/-} wraz z *M. pneumoniae* powodował aktywację NF- κ B porównywalną z zakażonymi myszami HSF^{+/+}. Autorzy zaproponowali również rolę HSF-1 oraz HSP70 we wrodzonej odpowiedzi przeciwko zakażeniom dróg oddechowych wywoływanym przez *M. pneumoniae*. Na skutek zakażenia aktywacji ulega HSF-1, co prowadzi do transkrypcji i wytwarzania HSP70. Białko to wiąże TLR2, stymulując w ten sposób wytwarzanie chemokiny pochodzącej z keratynocytów (KC/CXCL1) w komórkach płuc (np. makrofagach), przez indukcję jądrowej translokacji NF- κ B, wywołując w ten sposób rekrutację neutrofilów i eliminację bakterii [15].

Obecność HSP70 wykazano w egzosomach, które są uwalniane z komórek zakażonych mikobakteriami i mają właściwości prozapalne. Dowiedziano, iż makrofagi zakażone *Mycobacterium smegmatis* i *M. avium* uwalniały więcej egzosomów niż komórki niezakażone, a HSP70 na ich powierzchni było więcej niż w egzosomach komórek kontrolnych. Dowiedziano też, że egzosomalny i egzo-

geny HSP70 miały wpływ na aktywację NF- κ B i uwalnianie TNF- α w niezakażonych makrofagach. Komórki zakażone *M. avium* uwalniały więcej egzosomów prozapalnych niż zakażone *M. smegmatis*. Ponadto, dodane do makrofagów egzosomy pochodzące od makrofagów zakażonych *M. smegmatis* czy *M. avium*, stymulowały translokację podjednostki p65 do jądra komórkowego. Dodanie egzogenego HSP70 do komórek zakażonych *M. smegmatis* skutkowało aktywacją NF- κ B na zbliżonym poziomie, jak po stymulacji LPS. HSP70 może więc synergistycznie działać w kierunku wzmocnienia odpowiedzi zapalnej podczas zakażenia mikobakteriami [3].

INTERAKCJE BAKTERYJNYCH BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO Z NF- κ B

Białka szoku cieplnego mogą występować również u bakterii czy grzybów i przyczyniać się do rozwoju chorób związanych z nadmierną aktywacją NF- κ B. Przykładem są przewlekłe zakażenia *Chlamydia pneumoniae*, podczas których następuje aktywacja ludzkich komórek naczyniowych i makrofagów, kiedy dochodzi do formowania się zmian miażdżycowych. Takie przewlekłe zakażenie może wywołać ekspresję ludzkiego i bakteryjnego białka szoku cieplnego HSP60 w ścianie tętnicy i przyczynić się do rozwoju procesu zapalnego. Zarówno ludzkie, jak



Ryc. 2. Interakcje między bakteryjnymi HSP a aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (opis w tekście; opracowanie własne)

i pochodzące od chlamydii białko HSP60 aktywuje NF- κ B i indukuje ekspresję regulowanych przez ten czynnik genów molekuł adhezyjnych: E-selektyny, cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1), cząsteczki adhezji komórkowej naczyń 1 (VCAM-1) i IL-6 w ludzkich komórkach nabłonka, co powoduje tworzenie się zmian miażdżycowych (ryc. 2). Ponadto obydwa białka indukują zależną od NF- κ B ekspresję IL-6 w makrofagach, komórkach nabłonka i mięśni gładkich. IL-6 uczestniczy w reakcji ostrej fazy i może spowodować wzrost stężenia fibrynogenu, białka C-reaktywnego (CRP) czy osoczonego białka amyloidowego (SAA) w osoczu i przyczyniać się do rozwoju poważnych komplikacji [25].

Analizy blaszek miażdżycowych uzyskanych od pacjentów z chorobą wieńcową pod kątem oceny ekspresji genów metodą real-time PCR oraz analiza ekspresji kinaz ERK1/2, JNK1/2, IKK β , a także NF- κ B, i MCP-1 z wykorzystaniem metody Western blot wykazały różnice w ekspresji badanych białek. Znacząco wyższy wzrost ekspresji RNA odnotowano dla genów kodujących IL-8, TLR2, TLR4, transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), ICAM1, VCAM1 i kinazy MAPK, a znacząco niższy poziom ekspresji RNA zanotowano dla SMAD4, IKK β , BRCA1 oraz IL-10 u pacjentów, u których wykazano obecność chlamydiałnego HSP60 (cHSP60). Na poziomie białka ekspresja ufosforylowanej postaci kinazy ERK1/2 (pERK1/2), NF- κ B, MCP-1 była wyższa, zaś IKK β - niższa u pacjentów z blaszkami, w których występowało cHSP60 [18].

HSP60 jest również białkiem wytwarzanym przez *H. pylori* i może, w wyniku interakcji z TLR, zwłaszcza TLR2 komórek nabłonka żołądka, aktywować NF- κ B i wytwarzanie IL-8, co doprowadza do rozwoju stanu zapalnego (ryc. 2) [35].

Badania wykazały również obecność bakteryjnych białek szoku cieplnego u *Mycobacterium tuberculosis*. Rekombinowane i oczyszczone białka HSP65 i HSP70 *M. tuberculosis* indukują NF- κ B w ludzkich komórkach nabłonka: HSP65 za pośrednictwem TLR4, zaś HSP70 z udziałem TLR4 i TLR2 (ryc. 2) [8]. Inne bakteryjne białko szoku cieplnego, DnaK *Francisella tularensis*, jest również ligan- dem TLR4 i aktywuje NF- κ B, kinazy MAPK oraz cytokiny prozapalne: IL-6, TNF- α , IL-12p40 w mysich komórkach dendrytycznych (ryc. 2) [7].

Inny homolog HSP60, GroEL występuje u *Porphyromonas gingivalis*. Podobnie jak ludzkie HSP60, które jest stymulatorem wytwarzania cytokin prozapalnych, GroEL *P. gingivalis* stymuluje ekspresję cytokin prozapalnych, co zostało stwierdzone w makrofagach. Dowiedziono, iż rekombinowane białko GroEL jest stymulatorem aktywności transkrypcyjnej NF- κ B w ludzkich monocytach linii THP-1. W aktywacji NF- κ B przez to białko wydają się uczestniczyć receptory TLR2 lub TLR4 lub przypuszczalnie obydwa jednocześnie (ryc. 2) [5].

PODSUMOWANIE

NF- κ B, centralny regulator odpowiedzi na zakażenia, jest czynnikiem podlegającym modulacji przez białka szoku cieplnego. Zarówno modulatory odpowiedzi na szok cieplny, jak i patogeny bakteryjne oddziałujące z białkami szoku cieplnego lub same je wytwarzające, mają wpływ na aktywację NF- κ B. Wiedza na temat wpływu HSP na aktywację NF- κ B jest niezbędna w leczeniu wielu chorób i konstrukcji efektywnych adiuwantów i szczepionek, w tym również przeciwo- wotworowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahn K.S., Aggarwal B.B.: Transcription factor NF- κ B: a sensor for smoke and stress signals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005; 1056: 218-233
- [2] Ammirante M., Rosati A., Gentilella A., Festa M., Petrella A., Marzullo L., Pascale M., Belisario M.A., Leone A., Turco M.C.: The activity of *hsp90 α* promoter is regulated by NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 2008; 27: 1175-1178
- [3] Anand P.K., Anand E., Bleck C.K., Anes E., Griffiths G.: Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria. *PLoS One*, 2010; 5: e10136
- [4] Ankar J., Sistonen L.: Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007; 594: 78-88
- [5] Argueta J.G., Shiota S., Yamaguchi N., Masuhiro Y., Hanazawa S.: Induction of *Porphyromonas gingivalis* GroEL signaling via binding to Toll-like receptors 2 and 4. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2006; 21: 245-251
- [6] Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J.A., Bare O., Auron P.E., Stevenson M.A., Calderwood S.K.: Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 15028-15034
- [7] Ashtekar A.R., Zhang P., Katz J., Deivanayagam C.C., Rallabhandi P., Vogel S.N., Michalek S.M.: TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.*, 2008; 84: 1434-1446
- [8] Bulut Y., Michelsen K.S., Hayrapetian L., Naiki Y., Spallek R., Singh M., Arditi M.: *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 20961-20967
- [9] Chen D., Pan J., Du B., Sun D.: Induction of the heat shock response *in vivo* inhibits NF- κ B activity and protects murine liver from endotoxemia-induced injury. *J. Clin. Immunol.*, 2005; 25: 452-461
- [10] Chen H.W., Kuo H.T., Wang S.J., Lu T.S., Yang R.C.: *In vivo* heat shock protein assembles with septic liver NF- κ B/I- κ B complex regulating NF- κ B activity. *Shock*, 2005; 24: 232-238
- [11] Christmas P.: Toll-like receptors: sensors that detect infection. *Nature Education*, 2010; 3: 85
- [12] Dokladny K., Lobb R., Wharton W., Ma T.Y., Moseley P.L.: LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP70 in rats: possible role of NF- κ B. *Cell Stress Chaperones*, 2010; 15: 153-163
- [13] Dunsmore K.E., Denenberg A.G., Page K., Wong H.R.: Mechanism and function of heat shock-dependent I κ B α expression. *Inflamm. Res.*, 2006; 55: 254-259

- [14] Feinstein D.L., Galea E., Reis D.J.: Suppression of glial nitric oxide synthase induction by heat shock: effects on proteolytic degradation of I κ B- α . *Nitric Oxide*, 1997; 1: 167-176
- [15] Gally F., Minor M.N., Smith S.K., Case S.R., Chu H.W.: Heat shock factor 1 protects against lung *Mycoplasma pneumoniae* infection in mice. *J. Innate Immun.*, 2012; 4: 59-68
- [16] Glushkova O.V., Novoselova T.V., Khrenov M.O., Parfenyuk S.B., Lunin S.M., Fesenko E.E., Novoselova E.G.: Role of heat shock protein hsp90 in formation of protective reactions in acute toxic stress. *Biochemistry*, 2010; 75: 702-707
- [17] Ialenti A., Di Meglio P., D'Acquisto F., Pisano B., Maffia P., Grassia G., Di Rosa M., Iannaro A.: Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by the heat shock response in J774 murine macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 2005; 509: 89-96
- [18] Jha H.C., Srivastava P., Prasad J., Mittal A.: *Chlamydia pneumoniae* heat shock protein 60 enhances expression of ERK, TLR-4 and IL-8 in atheromatous plaques of coronary artery disease patients. *Immunol. Invest.*, 2011; 40: 206-222
- [19] Jin S., Song Y.C., Emili A., Sherman P.M., Chan V.L.: JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90 α and triggers signalling pathways leading to the activation of NF- κ B and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, 2003; 5: 165-174
- [20] Joussen A.M., Poulaki V., Qin W., Kirchhof B., Mitsiades N., Wiegand S.J., Rudge J., Yancopoulos G.D., Adamis A.P.: Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion *in vivo*. *Am. J. Pathol.*, 2002; 160: 501-509
- [21] Kim J.M., Kim J.S., Kim Y.J., Oh Y.K., Kim I.Y., Chee Y.J., Han J.S., Jung H.C.: Conjugated linoleic acids produced by *Lactobacillus* dissociates IKK- γ and Hsp90 complex in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Lab. Invest.*, 2008; 88: 541-552
- [22] Kim J.M., Lee D.H., Kim J.S., Lee J.Y., Park H.G., Kim Y.J., Oh Y.K., Jung H.C., Kim S.I.: 5,7-dihydroxy-3,4,6-trimethoxyflavone inhibits the inflammatory effects induced by *Bacteroides fragilis* enterotoxin via dissociating the complex of heat shock protein 90 and I κ B α and I κ B kinase- γ in intestinal epithelial cell culture. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009; 155: 541-551
- [23] Knowlton A.A.: NF κ B, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovasc. Res.*, 2006; 69: 7-8
- [24] Ko S.H., Yoo D.Y., Kim Y.J., Choi S.M., Kang K.K., Kim H., Kim N., Kim J.S., Kim J.M.: A mechanism for the action of the compound DA-6034 on NF- κ B pathway activation in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Scand. J. Immunol.*, 2011; 74: 253-263
- [25] Kol A., Bourcier T., Lichtman A.H., Libby P.: Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J. Clin. Invest.*, 1999; 103: 571-577
- [26] Malhotra V., Wong H.R.: Interactions between the heat shock response and the nuclear factor- κ B signaling pathway. *Crit. Care Med.*, 2002; 30 (Suppl.): S89-S95
- [27] Morimoto R.I.: The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 2011; 76: 91-99
- [28] Murphy T.L., Cleveland M.G., Kulesza P., Magram, J., Murphy K.M.: Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF- κ B half-site. *Mol. Cell. Biol.*, 1995; 15: 5258-5267
- [29] Oeckinghaus A., Ghosh S.: The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2009; 1: a000034
- [30] Poulaki V., Iliaki E., Mitsiades N., Mitsiades C.S., Paulus Y.N., Bula D.V., Gragoudas E.S., Miller J.W.: Inhibition of Hsp90 attenuates inflammation in endotoxin-induced uveitis. *FASEB J.*, 2007; 21: 2113-2123
- [31] Santoro M.G.: Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 59: 55-63
- [32] Schell M.T., Spitzer A.L., Johnson J.A., Lee D., Harris H.W.: Heat shock inhibits NF- κ B activation in a dose- and time-dependent manner. *J. Surg. Res.*, 2005; 129: 90-93
- [33] Sen R., Smale S.T.: Selectivity of the NF- κ B response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010; 2: a000257
- [34] Sun D., Chen D., Du B., Pan J.: Heat shock response inhibits NF- κ B activation and cytokine production in murine Kupffer cells. *J. Surg. Res.*, 2005; 129: 114-121
- [35] Takenaka R., Yokota K., Ayada K., Mizuno M., Zhao Y., Fujinami Y., Lin S.N., Toyokawa T., Okada H., Shiratori Y., Oguma K.: *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology*, 2004; 150: 3913-3922
- [36] Teruya H., Higa F., Akamine M., Ishikawa C., Okudaira T., Tomimori K., Mukaida N., Tateyama M., Heuner K., Fujita J., Mori N.: Mechanisms of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in human lung epithelial cells. *BMC Microbiol.*, 2007; 7: 102
- [37] Wieten L., Broere F., van der Zee R., Koerkamp E.K., Wagenaar J., van Eden W.: Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: a role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immuno-modulators? *FEBS Lett.*, 2007; 581: 3716-3722
- [38] Yeo M., Park H.K., Lee K.M., Lee K.J., Kim J.H., Cho S.W., Hahm K.B.: Blockage of HSP 90 modulates *Helicobacter pylori*-induced IL-8 productions through the inactivation of transcriptional factors of AP-1 and NF- κ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 320: 816-824

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.