

Streszczenie

Monocyty i makrofagi jako przedstawiciele profesjonalnych komórek fagocytujących, zdolnych do produkcji cytokin, reaktywnych form tlenu i azotu i uczestniczące w aktywacji systemu odporności nabytej, stanowią kluczowy element systemu odporności wrodzonej. Celem badań była analiza aktywności systemu NF- κ B, analiza odpowiedzi na stres oksydacyjny w ludzkich komórkach typu monocytarnego i makrofagowego, a także sprawdzenie, jak zjawiska te modulowane są podczas rozpoznania patogenu.

Pomimo zalety systemu *ex vivo*, jaką jest jego naturalne pochodzenie, praca z wykorzystaniem komórek izolowanych z krwi generuje szereg problemów: wysokie koszty i pracochłonne procedury, mała liczba dostępnych komórek, zanieczyszczenia w postaci innych składników krwi, duże różnice pomiędzy dawcami, problemy prawno-etyczne oraz konieczność pracy z zachowaniem wzmożonych zasad bezpieczeństwa biologicznego. Użycie systemu modelowego, ludzkich linii komórkowych wywodzących się z komórek nowotworowych, daje możliwość ominięcia tych problemów i dostarcza ważnego narzędzia do badania funkcji, mechanizmów i odpowiedzi w komórkach.

W badaniach zastosowano dwa typy linii komórkowych: THP-1 i Mono Mac 6. Reprezentują one komórki typu monocytarnego o różnym stopniu dojrzałości. Obie linie komórkowe mogą być różnicowane w komórki typu makrofagowego przy użyciu 12-mirystylo-13-octanu forbolu czy też witaminy D3. W przypadku komórek THP-1 najbardziej efektywnym czynnikiem różnicującym jest PMA, pod względem wpływu na indukcję adhezji, zahamowanie proliferacji, aktywność fagocytarną, ekspresję markerów różnicowania na poziomie RNA i białka: CD14, CD11a, CD11b, produkcję cytokin: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10. Pokazano, że THP-1 stanowi dobry model w badaniach profilu ekspresji genów po stymulacji komórek ligandami bakteryjnymi. Komórki Mono Mac 6 fenotypowo i funkcjonalnie reprezentują dojrzałe monocyty krwi, pod względem ekspresji CD14 i produkcji cytokin IL-1 β , TNF- α , IL-6 w odpowiedzi na ligandy bakteryjne. Mono Mac 6 mogą być dalej różnicowane w bardziej dojrzałe komórki typu makrofagowego przy użyciu witaminy D3 i TGF- β 1. Różnicowanie skutkuje tworzeniem agregatów komórkowych, ekspresją 5-lipooksygenazy oraz CD69, a także towarzyszy mu wzrost ekspresji CD14, CD11a, CD11b, CD11c, MMP9 na poziomie mRNA.

Analizowano, jak różnicowanie i rozpoznanie patogenu wpływa na modulację funkcji komórkowych: fagocytozę, produkcję reaktywnych form tlenu i cytokin. Dla pam3CSK4

wykazano, jak we wcześniejszych badaniach dla innych ligandów bakteryjnych: FSL-1 i peptydoglikanu, rolę w modulacji procesu fagocytozy patogenów przez komórki typu monocytarnego i makrofagowego. Stymulacja receptora TLR2 w niezróżnicowanych THP-1 i zróżnicowanych MM6 skutkowała wzrostem zdolności do fagocytozy bakterii *E. coli*. Monocyty charakteryzowały się większą zdolnością do fagocytozy, dodatkowo zwiększaną w wyniku różnicowania. Aktywacja receptora TLR2 nie wpływała natomiast na ilość produkowanego anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach THP-1 i MM6, prawdopodobnie ze względu na wysoką aktywność systemu antyoksydacyjnego w tych komórkach, w przeciwieństwie do komórek monocytów, w których dochodzi do zwiększenia produkcji RFT w wyniku stymulacji ligandem bakteryjnym. W wyniku aktywacji TLR2 przez pam3CSK4 dochodzi do indukcji wydzielania znacznych ilości cytokin w obu liniach komórkowych, zróżnicowanych i niezróżnicowanych, przy czym proces różnicowania predysponuje komórki do szybszej i zwiększonej odpowiedzi na czynnik stymulujący.

W organizmach tlenowych reaktywne formy tlenu produkowane są w normalnych warunkach jako produkt uboczny aktywności enzymów uczestniczących w metabolizmie tlenowym. Dodatkowo RFT powstają w procesach rozpoznania i fagocytozy patogenów, jako główne produkty aktywności enzymów, np. oksydazy NADPH. Ma to duże znaczenie dla wyspecjalizowanych komórek fagocytujących, jak monocyty i makrofagi, dla których reaktywne formy tlenu stanowią część mechanizmu obrony przed patogenami. Oprócz pełnienia pozytywnej roli jako cząsteczki sygnałowe i broń przeciwko patogenom, RFT są także zaangażowane w sytuacje patologiczne, prowadząc do uszkodzeń i dysfunkcji DNA, białek, lipidów. W celu uniknięcia szkodliwego działania reaktywnych form tlenu komórki wykształciły różnorodne mechanizmy antyoksydacyjne. Enzymy i cząsteczki zaangażowane w obronie antyoksydacyjnej można sklasyfikować w trzy główne systemy: system dysmutazy ponadtlenkowej/katalazy, system glutationu i system tioredoksyny.

W badaniach warunki stresu oksydacyjnego generowano bezpośrednio przez dodanie nadtlenu wodoru lub pośrednio poprzez ekspozycję komórek na systemy generujące rodniki tlenowe: parakwat lub mieszaninę chlorku żelaza (II) i kwasu askorbinowego (Fe/Asc).

Analiza żywotności komórek i powstawania uszkodzeń oksydacyjnych białek wykazała, że bardziej dojrzałe komórki MM6, w porównaniu z THP-1, charakteryzowały się znacznie wyższą opornością na działanie H_2O_2 . Większa oporność MM6 na H_2O_2 wiązała się także z mniejszą ilością generowanych uszkodzeń oksydacyjnych w tych komórkach. Natomiast w komórkach THP-1 do wzrostu oporności na nadtlenek wodoru przyczyniały się: różnicowanie w kierunku komórek typu makrofagowego i aktywacja receptora TLR2, oba te

procesy skutkowały także spadkiem ilości generowanych uszkodzeń oksydacyjnych białek. Komórki MM6 były również bardziej odporne na działanie parakwatu, natomiast nie zaobserwowano różnic w oporności pomiędzy komórkami mniej dojrzałymi (THP-1) i bardziej dojrzałymi (MM6) w przypadku ich ekspozycji na system Fe/Asc generujący wysoce toksyczne dla składników komórek reaktywne formy tlenu. W komórkach MM6 wykazujących większą oporność na działanie łagodniejszych systemów prooksydacyjnych (nadtlenek wodoru, parakwat), aktywacja receptora TLR2 była wystarczająca do pojawienia się oporności na system generujący silnie reaktywne formy tlenu (Fe/Asc).

W regulacji ekspresji szeregu czynników antyoksydacyjnych pokazano udział czynnika NF- κ B, dlatego też analizowano aktywność tego czynnika w komórkach typu monocytarnego i makrofagowego stymulowanych ligandem bakteryjnym.

W wyniku aktywacji receptora TLR2 może dochodzić do aktywacji szlaku NF- κ B zależnej od kompleksu MyD88-IRAK1/IRAK2-TRAF6 lub też kompleksu Rac1-PI3K-Akt. Dochodzi do szybkiej degradacji białek inhibitorowych I κ B α oraz wolniejszej degradacji I κ B β i I κ B ε . Aktywowane kompleksy mogą zawierać wszystkie białka z rodziny NF- κ B. Aktywność czynnika NF- κ B kontrolowana jest przez szereg sprzężeń zwrotnych, a sprzężenie zwrotne dodatnie, np. autokrynne i parakrynne działanie cytokin (TNF- α , IL-1 β), pełni ważną rolę w amplifikacji i wydłużeniu czasu trwania wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. W obu liniach komórkowych po stymulacji receptora TLR2 zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji składników systemu NF- κ B i jego aktywację. Różnicowanie odgrywa istotną rolę w aktywacji czynnika NF- κ B, w szczególności w komórkach THP-1 różnicowanych przy użyciu PMA, dla większości składników systemu wpływa na wzrost ich ekspresji i predysponuje komórki do szybszej i wzmożonej reakcji na rozpoznanie liganda bakteryjnego, co widać np. we wzroście poziomu uwalnianego TNF- α . Stymulacja pam3CSK4 skutkowała indukcją translokacji NF- κ B p65 z cytoplazmy do jądra, przy czym proces ten przebiegał szybciej w komórkach zróżnicowanych niż w niezróżnicowanych. Zaobserwowano synergistyczny efekt różnicowania i aktywacji receptora TLR2 na aktywność transkrypcyjną czynnika NF- κ B. Poziom ekspresji *RELB* i *NFKB2* wzrastał w niezróżnicowanych i zróżnicowanych komórkach THP-1 i MM6 po stymulacji ligandem bakteryjnym, a zatem możliwe jest uruchomienie sygnałowego szlaku alternatywnego, co może wpływać na wydłużenie odpowiedzi odpornościowej. Różnicowanie komórek typu monocytarnego jak i stymulacja komórek niezróżnicowanych przy użyciu pam3CSK4 skutkowały wzrostem ekspresji przedstawicieli różnych rodzin receptorów rozpoznających

wzorze, przy czym wzrost ekspresji TLR2 po stymulacji pam3CSK4 w obu analizowanych liniach komórkowych zależy od aktywności czynnika NF- κ B.

W celu oceny zaangażowania wybranych składników systemu antyoksydacyjnego we wzrost oporności komórek na stres oksydacyjny podczas różnicowania i aktywacji receptora TLR2, analizowano ich ekspresję i aktywność.

Zaobserwowano, że profil ekspresji i aktywności enzymów antyoksydacyjnych zależy od stopnia dojrzałości komórek i rozpoznania ligandów. Wzrost ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej towarzyszący wzrostowi oporności i spadek oporności komórek po zahamowaniu aktywności SOD wskazują na znaczący udział tego enzymu w oporności komórek na stres oksydacyjny. Z drugiej strony SOD może przyczyniać się do produkcji H_2O_2 , innej reaktywnej formy tlenu zdolnej w wysokich stężeniach do indukcji uszkodzeń w komórkach. Regulacja stężenia i usuwania nadtlenu wodoru stanowi istotny element ochrony przed formowaniem pochodnych reaktywnych form tlenu. Dlatego też analizowano ekspresję i aktywność enzymów antyoksydacyjnych dla których H_2O_2 stanowi substrat. Znacznie wyższy podstawowy poziom aktywności katalazy i peroksydazy glutationowej w komórkach MM6 może być odpowiedzialny za ich wysoką oporność na działanie nadtlenu wodoru. Znaczenie katalazy w komórkach THP-1 zademonstrowano przez zastosowanie inhibitora, azydku sodu. Prowadziło to do wzrostu wrażliwości na H_2O_2 komórek niezróżnicowanych i zróżnicowanych, aktywowanych pam3CSK4. W komórkach THP-1 i MM6 zaobserwowano największe znaczenie peroksydazy glutationowej 1 i 4, których poziom ekspresji był najwyższy spośród analizowanych form. Komórki MM6 charakteryzowały się wyższą podstawową aktywnością enzymu, była ona następnie indukowana w wyniku różnicowania w obu liniach komórkowych, oraz w wyniku aktywacji receptora TLR2 w niezróżnicowanych komórkach THP-1. Dodatkowo GPx-4 może stanowić ważny składnik ochrony przed stresem oksydacyjnym wywoływanym przez składniki powodujące uszkodzenia błony komórkowej, tj. H_2O_2 , system Fe/Asc, ze względu na jej zdolność do redukcji wodoronadtlenków fosfolipidów, dzięki czemu przyczynia się do zahamowania procesu peroksydacji lipidów i ochrony przed uszkodzeniami oksydacyjnymi błony komórkowej. Dla GPx-1 pokazano rolę w ochronie przed stresem oksydacyjnym wywoływanym przez wysokie stężenia parakwatu.

Działanie peroksydazy glutationowej związane jest z systemem regeneracyjnym obejmującym glutation i reduktazę glutationową. Podstawowy poziom glutationu w komórkach MM6 był znacznie wyższy niż w komórkach THP-1. Było to związane z wyższą ekspresją podjednostek syntetazy γ -glutamylcysteinowej (γ GLCL): *GCLM*

i *GCLC*, wpływającą prawdopodobnie na wzrost aktywności γ GLCL, enzymu decydującego o szybkości reakcji syntezy glutationu. W wyniku różnicowania THP-1 dochodziło do wzrostu poziomu glutationu w komórkach. Zahamowanie aktywności syntetazy γ -glutamylcysteinowej prowadziło do spadku podstawowej oporności komórek THP-1 na nadtlenek wodoru oraz spadku żywotności w komórkach THP-1 zróżnicowanych i aktywowanych pam3CSK4. Z wyższą podstawową aktywnością peroksydazy glutationowej wiązała się wyższa aktywność reduktazy glutationowej w komórkach MM6. Wzrost aktywności zaobserwowano, podobnie jak w przypadku pozostałych składników systemu glutationu, w zróżnicowanych komórkach THP-1 i po aktywacji receptora TLR2 w niezróżnicowanych komórkach THP-1. Dodatkowo glutation wykorzystywany jest do redukcji grup tiolowych w centrum aktywnym przez peroksyredoksynę 6 i glutaredoksynę, a ekspresja *PRDX6* wzrasta w komórkach stymulowanych pam3CSK4 oraz w zróżnicowanych komórkach THP-1. Wskazuje się na szczególną rolę peroksyredoksyny 6 w ochronie antyoksydacyjnej, podobnie jak GPx-4, ze względu na ich unikatową zdolność do redukcji wodoronadtlenków fosfolipidów. System glutationu stanowi zatem ważny element w regulacji oporności komórek na stres oksydacyjny.

Ważną częścią układu antyoksydacyjnego komórek jest system tioredoksyny zawierający: tioredoksynę, reduktazę tioredoksyny oraz inne enzymy wykorzystujące tioredoksynę jako donora elektronów, np. peroksyredoksyny. Wskazuje się na ich udział w ochronie przed stresem oksydacyjnym, a peroksyredoksyna może być bardziej efektywna niż katalaza w usuwaniu nadtlenku wodoru ze względu na wysokie powinowactwo do H_2O_2 . W wyniku różnicowania i aktywacji TLR2 zaobserwowano indukcję ekspresji form cytoplazmatycznych tioredoksyny, reduktazy tioredoksyny i peroksyredoksyny. Jednakże inhibicja aktywności reduktazy tioredoksyny przy użyciu auranofiny nie wpływała na żywotność komórek narażonych na działanie H_2O_2 , co wskazuje na mniej istotny udział tego systemu dla przeżywalności komórek w analizowanych warunkach. Ponieważ ilość tioredoksyny w komórce jest mniejsza w porównaniu z innymi antyoksydantami, jej mechanizm protekcyjny może być bardziej związany z rolą w regulacji procesów przekazywania sygnału niż w bezpośrednim zaangażowaniu w reakcjach oksydacyjno-redukcyjnych.

W komórkach MM6 inhibicja pojedynczego elementu systemu antyoksydacyjnego nie wpływała na ich wrażliwość na H_2O_2 . Prawdopodobnie wszystkie systemy uczestniczą w ochronie antyoksydacyjnej i aktywne systemy są zdolne zrekompensować brak systemów

zdezaktywowanych. Dopiero równoczesna inaktywacja kilku systemów może doprowadzić do widocznych zmian we wrażliwości komórek na stres oksydacyjny.

W komórkach monocytów zaobserwowano znacznie wyższą ekspresję większości analizowanych genów systemu antyoksydacyjnego w porównaniu z liniami komórkowymi. Wzrost ekspresji zaobserwowano w makrofagach M1, w których dochodziło do silniejszej indukcji analizowanych składników systemu antyoksydacyjnego niż w makrofagach M2. W sytuacji rozpoznania liganda bakteryjnego dochodziło do indukcji ekspresji podobnego profilu genów w monocytach i makrofagach (*GCLM*, *TXN*, *TXNRD1*, *PRDX1*, *SOD2*), co może świadczyć o istotnej roli tych elementów w regulacji homeostazy redoks.