

Zaburzenia tolerancji endotoksycznej w PBL-B na przykładzie IL-6

Impaired endotoxin tolerance on example of IL6 in B-CLL

Halina Antosz¹, Joanna Sajewicz¹, Barbara Marzec-Kotarska¹, Dorota Choroszyńska¹, Anna Dmoszyńska²

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (2b): 222–228

STRESZCZENIE

IL-6 uznaje się za kluczową cytokinę zaangażowaną w mechanizmy obronne organizmu, w procesach krwiotworzenia i reakcjach zapalnych, o wielokierunkowym działaniu auto- i parakrynnym. Jej produkcja jest zazwyczaj przemijająca i ściśle regulowana. Stosując metodę RT-PCR w czasie rzeczywistym (*real time PCR*), zbadano ekspresję IL-6 na poziomie mRNA, w prawidłowych i białaczkowych limfocytach B spoczynkowych i stymulowanych LPS przez 30' i 24 h. Poziom ekspresji IL-6 wyrażony wartością RQ w puli limfocytów PBL-B, w porównaniu z subpopulacją limfocytów B zdrowych dawców, był istotnie statystycznie niższy, wartość $p=0,00348$. Po 24 h w prawidłowych limfocytach B poziom RQ mRNA IL-6 istotnie statystycznie obniżał się ($p=0,012970$), natomiast w subpopulacji PBL-B istotnie statystycznie nadal wzrastał ($p=0,000001$). Uzyskane dane wydają się wskazywać na zaburzenie tolerancji endotoksycznej w PBL-B.

Słowa kluczowe: B-PBL, IL-6, TLR4, LPS

SUMMARY

IL-6 is considered a key cytokine involved in immune organism response, hematopoietic processes and inflammatory reactions, based on multidirectional auto and paracrine action. Its production is usually transient and tightly regulated.

By the means of Real Time PCR we studied IL-6 expression on mRNA level (RQ) in B-CLL lymphocytes and in CD19+ subpopulation of normal B lymphocytes before and after 30 min and 24h LPS stimulation. The IL-6 expression level (RQ) in B-CLL cells was significantly lower ($p=0.00348$) compared with the subpopulation of CD19+ normal lymphocytes. 30 min LPS stimulation resulted in increase of IL6 mRNA expression, both in normal and B-CLL lymphocytes. IL6 mRNA expression level decreased after 24h LPS stimulation ($p=0.012970$) in normal lymphocytes, whereas B-CLL cells showed constant increase ($p=0.000001$). These data seem to indicate an aberrant endotoxin tolerance in B-CLL.

Key words: B-CLL, IL-6, TLR4, LPS

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 16.04.2012
Zaakceptowano: 24.04.2012

¹ Zakład Genetyki Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Kierownik: Dr hab. Janusz Kocki prof. UM
² Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji
Szpitalu Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Kierownik: Prof. dr hab. Anna Dmoszyńska

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Adres autora korespondencyjnego:
Dr hab. n. med. Halina Antosz
Zakład Genetyki Klinicznej UM w Lublinie
ul. Radziwiłłowska 11
20-950 Lublin

Praca była finansowana z grantu KBN nr NN 402440639
Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Wstęp

Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (PBL-B) jest nowotworem o heterogennym przebiegu klinicznym. W krwi obwodowej, narządach limfatycznych i szpiku kostnym chorych gromadzą się małe dojrzałe komórki B [1, 2]. Zdecydowana większość to limfocyty B zatrzymane w fazie G0/G1 cyklu komórkowego. Z powodu błędnego mechanizmu apoptozy komórki białaczkowe nie są eliminowane [3], tylko uzupełniane przez proliferację komórek prekursorowych [1]. Istnieją nowe sugestie, że stymulacja antygenowa razem z interakcją z komórkami mikrośrodowiska i cytokinami są czynnikami promocyjnymi, które stymulują proliferację komórek PBL, pozwalając

im unikać apoptozy. Jednocześnie podkreśla się, że stymulacja antygenowa może mieć wpływ na przebieg choroby, który może być różny w odrębnych podgrupach PBL-B i tym samym prowadzić do różnic w przebiegu klinicznym wśród indywidualnych przypadków [4–6]. Sugeruje się również, że antygenami tymi mogą być czynniki zakaźne o nieznanym jeszcze charakterze tj. latentne wirusy lub bakterie (komensale) [7].

Namnażające się limfocyty PBL-B są głównie wykrywane w tzw. pseudogrudkach zlokalizowanych w węzłach chłonnych i szpiku kostnym [8], gdzie pozostają w ścisłym, międzykomórkowym kontakcie. Istnieją dowody, że komórkowe interakcje w pseudogrudkach są niezbędne do przetrwania PBL-B i pro-

liferacji [9]. Wpływ na przeżycie limfocytów PBL-B mają dodatkowo różne szlaki sygnalizacyjne, między innymi NF- κ B, [10] oraz spójna i silna ekspresja antyapoptotycznych białek, takich jak Bcl-2 i MCL-1 [11].

W porównaniu z innymi przewlekłymi zaburzeniami limfoproliferacyjnymi, stałą cechą limfocytów B pacjentów z PBL są poważne zaburzenia układu odpornościowego, immunologiczne nieprawidłowości, tj. hipogammaglobulinemia, zaburzenia przełączania klas immunoglobulin [12]. Ten stan depresji układu odpornościowego sprawia, że pacjenci z PBL-B są bardzo podatni na infekcje, które przyczyniają się do zachorowalności i śmiertelności w tej chorobie. Wprawdzie badania genetyczne wykazały na powierzchni limfocytów B ekspresję stereotypowych receptorów odpowiedzialnych za integrację wrodzonej i nabytej odporności, jednak sygnalizacja z BCR w PBL może być uszkodzona. Jest to związane z niską ekspresją receptora BCR [4], niefunkcjonalnym montażem BCR [13, 14] i mutacją w genach białek pomocniczych [15].

W warunkach prawidłowych sygnalizacja z BCR jest wspierana funkcją receptorów Toll-podobnych (TLR), stanowiących istotny element odporności wrodzonej/nieswoistej. Receptory te są również w stanie prowadzić do wzbudzenia odpowiedzi swoistej i pośredniczyć w jej regulacji. TLR integrują te dwa typy odpowiedzi immunologicznej [16]. Interakcja molekularnych wzorców związanych z patogenami (PAMP; *pathogen-associated molecular patterns*) z TLR aktywuje komórki rozpoznające obce antygeny i indukuje w nich ekspresję genów dla cytokin prozapalnych, chemokin i defensyn oraz dojrzewanie, proliferację i produkcję przeciwciał po rozpoznaniu patogenu [17]. Ekspresję TLR stwierdzono również na limfocytach białaczkowych PBL. TLR-y łącznie z BCR współstymulują komórki PBL-B. Muzio i wsp. [18] stwierdzili, że repertuar TLR w PBL-B przypomina ściśle wzorzec ekspresji komórek B doświadczonych antygenowo. Jednocześnie cytowani autorzy wykazali, że różne lipopeptydy bakteryjne, za pośrednictwem TLR, aktywują komórki białaczkowe i zapobiegają ich spontanicznej apoptozie.

Pierwszym zidentyfikowanym receptorem TLR był receptor TLR4 rozpoznający lipopolisacharyd (LPS), główny składnik ściany bakterii Gram-ujemnych. Ekspresję TLR4 wykazano na komórkach układu odpornościowego, w tym na limfocytach B. LPS poprzez TLR4 rekrutuje cząsteczki adaptorowe m.in. MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) i TIRAP (*TIR domain-containing adapter protein*), uruchamiając kaskadową aktywację serii kinaz (m.in. rodzinę kinaz IRAK; *IL-1 receptor-associated kinase*), powodując aktywację czynnika jądrowego NF- κ B oraz genów cytokin prozapalnych, takich jak interleukina-1 (IL1), interleukina-6 (IL-6) oraz czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α) [19].

Analiza *Northern blot* wykazała, że komórki białaczkowe w PBL-B mogą produkować i wydzielać interleukinę 6 (IL-6), która funkcjonuje jako czynnik stymulujący i regulujący różnicowanie limfocytów B w nowotworowych komórkach limfoidalnych. Wykazano ponadto, że IL-6 hamuje proliferację limfocytów PBL-B indukowaną przez TNF- α [20]. Lai i wsp. [21] zasugerowali, aby IL-6 traktować jako prognostyczny marker PBL-B, ze względu na to, że poziom IL-6 w surowicy krwi chorych koreluje z leukocytozą oraz ze stadium choroby wg Rai'a.

IL-6 uznaje się za jeden z kluczowych czynników zaangażowanych w mechanizmy obronne organizmu w procesach krwiotworzenia i reakcjach zapalnych [22, 23]. Jest silnie działającą niskocząsteczkową cytokiną o wielokierunkowym działaniu auto- i parakrynnym. Jej produkcja jest zazwyczaj przemijająca i ściśle regulowana w zrównoważonym układzie odpornościowym.

Ze względu na to, że w PBL-B obserwuje się zaburzenia układu odpornościowego [24], w hodowlach *in vitro* sprawdzaliśmy ekspresję IL-6 na poziomie mRNA po 30 min. i 24 godzinach indukcji LPS i porównywaliśmy z ekspresją w prawidłowej izolowanej subpopulacji B CD19⁺.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły limfocyty krwi obwodowej 32 chorych na przewlekłą białaczkę B limfocytową (PBL-B). Diagnostykę przeprowadzono w Klinice Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku Kostnego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W okresie poprzedzającym badanie żaden z chorych nie był leczony. Grupa badawcza obejmowała 12 kobiet i 20 mężczyzn w wieku od 39–83 lat (mediana: 68). Stopień zaawansowania choroby był różny u poszczególnych chorych i obejmował stadia 0, 1, 2, 4 wg charakterystyki Rai'a. W stadium 0 było 7 chorych, w stadium pierwszym – 8, w drugim – 10 i w czwartym – 7 chorych. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych dorosłych dawców w wieku od 43 do 72 lat.

Hodowle komórkowe

Krew pobierano na 3,8% cytrynian sodu, a następnie izolowano limfocyty przez wirowanie w gradiencie gęstości limfoprepu, zmodyfikowaną metodą Böyuma [25]. Zawiesinę limfocytów PBL-B i całkowitą populację prawidłowych limfocytów krwi obwodowej o gęstości 1×10^6 /ml hodowano w pożywce RPMI-1640 (Gibco) zawierającej FCS (*Fetal Calf Serum*) (10%), HEPES (10 mM), glutamine 2 mM, streptomycyn (100 μ g/ml), penicilinę (100 U/ml) (Polfa, Poland). Stymulacja z 1 μ g/ml LPS (Lipopolisacharyd *Escherichia coli*, Sigma) odpowiednio przez 30' i 24 h. Warunki hodowli: temperatura 37°C, nawilżanie, atmosfera 5% CO₂. Po

odpowiednim czasie hodowli subpopulację CD19⁺ izolowano na kolumnach magnetycznych (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Manualna technika selekcji pozytywnej

Do zawiesiny komórek (10^7 /ml) w roztworze soli fizjologicznej z EDTA (PBE) dodawano przeciwciało CD19 MultiSort MicroBeads sprzężone z cząstkami paramagnetycznymi MACS w ilości 20 μ l na 10^7 badanych komórek. Zawiesinę komórek i przeciwciał inkubowano w temperaturze 4–8°C przez 15 min. Następnie komórki przepłukiwano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) i odwirowywano (300xg; 10 min, 18°C). Po usunięciu nadsącza osad zawieszono ponownie w roztworze PBE do końcowej objętości 500 μ l. Mieszaninę wyznakowanych przeciwciałami komórek sprzężonych z koloidowymi cząstkami paramagnetycznymi MACS przenoszono do kolumny izolacyjnych MS o pojemności 1,5 ml, które umieszczano w separatorze magnetycznym (MiniMACS Separator). Komórki nieopłaszczone przeciwciałem wymywano z kolumny 1,5 ml roztworu PBE. Po usunięciu kolumny MS z pola magnetycznego opłaszczone cząsteczkami koloidowymi MACS limfocyty wypłukiwano 1 ml PBS. Pomiaru liczby komórek oraz czystości preparatu (procent komórek dodatnich w znakowanej frakcji) dokonywano za pomocą cytometrii przepływowej (FACS Calibur, Becton Dickinson).

Oznaczanie immunofenotypu wyizolowanych limfocytów

Ekspresja antygenów powierzchniowych limfocytów B-PBL została oznaczona przy użyciu mysich antyludzkich przeciwciał monoklonalnych (anty-CD19/FITC i anty-CD5/PE-Cy5), natomiast prawidłowe limfocyty B oznaczano przy użyciu mysich antyludzkich przeciwciał monoklonalnych anty-CD19/FITC. Dla każdej badanej próby wykonywano kontrolę negatywną, stosując ten sam izotyp sprzężony z tym samym fluorochromem (IgG1/FITC i IgG1/PE-Cy5). Próby wykonano zgodnie z zaleceniem producenta (Becton Dickinson).

Izolacja RNA

Izolacji RNA z wyizolowanych subpopulacji limfocytów dokonywano zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego [26].

Synteza cDNA

Syntezę cDNA przeprowadzano przy użyciu zestawu odczynników *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. W skrócie: do syntezy cDNA użyto 1 μ g RNA, którego ilość oceniano metodą spektrofotometryczną przy użyciu aparatu NanoDrop 2000 firmy Thermo SCIENTIFIC. Reakcje

syntezy cDNA przeprowadzano 10X RT Buffer, dNTP Mix (100mM), odwrotnej transkryptazy 50 U/ μ l (MultiScribe RT), sześci nukleotydowych starterów (10X RT Random Primers), inhibitora RN-az. Mieszaninę reakcyjną uzupełniano wodą wolną od RN-az do 20 μ l. Warunki reakcji zdefiniowano następująco: etap I: 25°C, 10 minut; etap II: 37°C, 120 minut; etap III: 85°C, 5 sekund.

Badanie ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym

Uzyskane po odwrotnej transkrypcji próby cDNA amplifikowano w czasie rzeczywistym przy użyciu techniki ilościowej analizy ekspresji w czasie rzeczywistym (*Real Time PCR*). Procedurę PCR wykonano w aparacie 7300 Real-Time System firmy Applied Biosystems, z wykorzystaniem oprogramowania SDS. Mieszanina reakcyjna zawierała: 1,25 μ l mieszaniny sondy i starterów specyficznych dla badanych genów (Applied Biosystems), 12,5 μ l buforu dla TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10,25 μ l H₂O oraz 1 μ l cDNA. Reakcję prowadzono na płycie optycznej w objętości 25 μ l. Zastosowano następujące zestawy sond typu TaqMan znakowanych FAM-NFQ i starterów dla genu *IL-6* oraz *GAPDH* jako genu referencyjnego kontroli (Applied Biosystems). Warunki reakcji: denaturacja wstępna 95°C 10 minut, 40 cykli: 95°C 15 s, 60°C 60 s. Ilość kopii cząsteczek badanych genów kwasu nukleinowego była monitorowana w każdym cyklu reakcji amplifikacji. Ilość cykli reakcji PCR, po których poziom fluorescencji przekroczył zdefiniowany próg (t_{C_p}) była stosowana do obliczenia ilości badanych cząsteczek obecnych w mieszaninie na początku reakcji – analiza przy użyciu oprogramowania RQ Study (*relative quantification*) Applied Biosystems. Dla każdej próby wartość CT dla genu referencyjnego GAPDH była użyta do poziomu normalizacji ekspresji badanych genów. Poziomy ekspresji badanych genów (ΔC_p) wyznaczono według wzoru:

$$\Delta C_{T \text{ genu}} = C_{T \text{ genu}} - C_{T \text{ GAPDH}}$$

Ekspresję względną (RQ) badanych genów oznaczono wg wzoru:

$$RQ = 2^{-(\Delta C_{T \text{ genu}} - \Delta C_{T \text{ kalibratora}})}$$

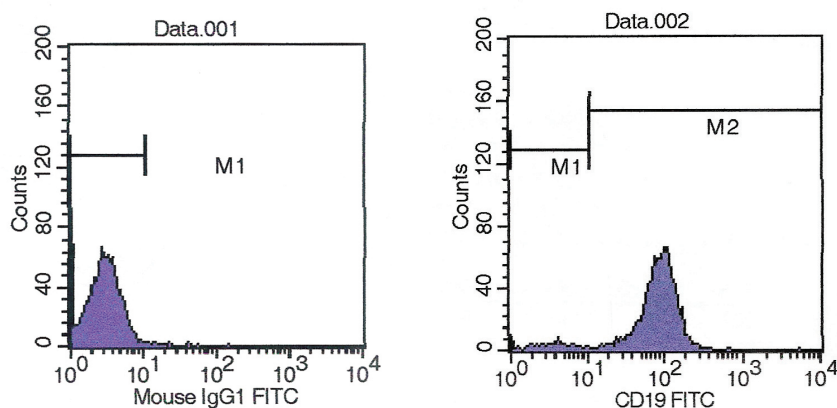
gdzie:

$$\Delta C_{T \text{ kalibratora}} = C_{T \text{ genu kalibratora}} - C_{T \text{ GAPDH kalibratora}}$$

Wyniki

Ocena immunofenotypu badanych limfocytów

U 32 chorych z rozpoznaniem przewlekłej białaczki limfocytowej wykonano badanie immunofenotypowe antygenów powierzchni komórki, charakterystycz-



Ryc. 1. Ocena czystości prawidłowej subpopulacji limfocytów B (CD19⁺)
Fig. 1. Purity evaluation of normal B lymphocytes subpopulation (CD19⁺)

nych dla limfocytów B-PBL, metodą cytometrii przepływowej. Odsetek komórek CD5⁺/CD19⁺ wynosił $80,67 \pm 12,04\%$. Subpopulację tę przyjęto traktować jako białczkową.

Po 30' i po 24 h hodowli limfocyty prawidłowe separowano na kolumnach magnetycznych (MiniMACS Separator) w celu uzyskania czystych subpopulacji limfocytów. Za kryterium czystości przyjęto ekspresję antygenu CD19 na powierzchni limfocytów B. Kontrolę czystości przeprowadzono w cytometrze przepływowym. Odsetek subpopulacji B w każdej z badanych, kontrolnych prób przekraczał 94% (Ryc.1).

Ekspresja mRNA IL-6 w limfocytach prawidłowych i PBL-B

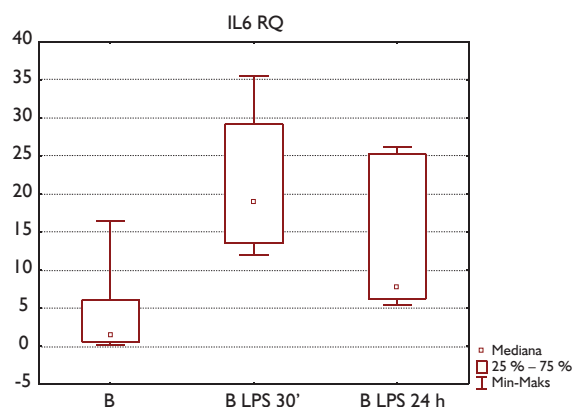
Z czystych subpopulacji prawidłowych limfocytów B CD19⁺ i białczkowych CD5⁺CD19⁺ niestymulowanych i stymulowanych LPS 30' i 24 h izolowano RNA, a następnie wykonano metodą RT-PCR w czasie rze-

czywistym badanie ekspresji mRNA IL-6. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Analiza ekspresji względnej (RQ) mRNA IL-6 w niestymulowanych limfocytach prawidłowych wykazała wielokrotnie wyższą wartość w porównaniu z niestymulowanymi limfocytami PBL-B. Różnica ta była istotna statystycznie ($p=0,00348$).

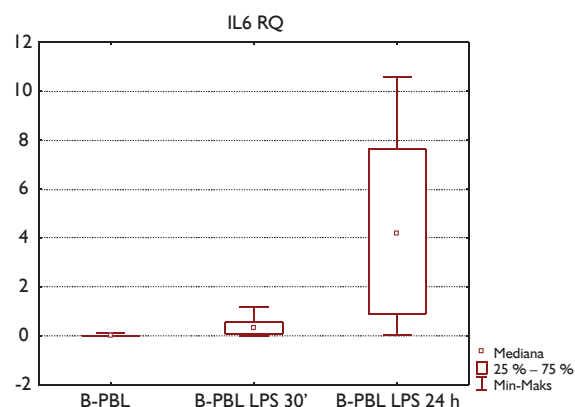
Poziom ekspresji mRNA IL-6 po 30' stymulacji LPS zarówno w prawidłowej jak i w białczkowej subpopulacji istotnie statystycznie wzrastał (odpowiednio $p=0,000523$ i $p=0,000003$).

Zdecydowanie różne wyniki uzyskano po 24 h pobudzania LPS. W prawidłowej subpopulacji limfocytów odnotowaliśmy znamienne statystycznie spadek wartości względnej RQ mRNA IL-6 w porównaniu z niestymulowaną kontrolą ($p=0,012970$). Pomiedzy prawidłową subpopulacją pobudzaną LPS 30' i przez 24 h spadek wartości RQ mRNA IL-6 okazał się być również istotny statystycznie, $p=0,029876$.



Ryc. 2 Porównanie ekspresji mRNA IL-6 pomiędzy niestymulowanymi LPS prawidłowymi limfocytami B CD19⁺ a stymulowanymi 30' i przez 24 h

Fig. 2 Comparison of IL-6 mRNA expression between unstimulated normal CD19⁺ B cells and LPS stimulated 30' and 24 h



Ryc. 3 Porównanie ekspresji mRNA IL-6 pomiędzy niestymulowanymi LPS limfocytami CD5⁺CD19⁺ PBL-B a stymulowanymi 30' i 24 h

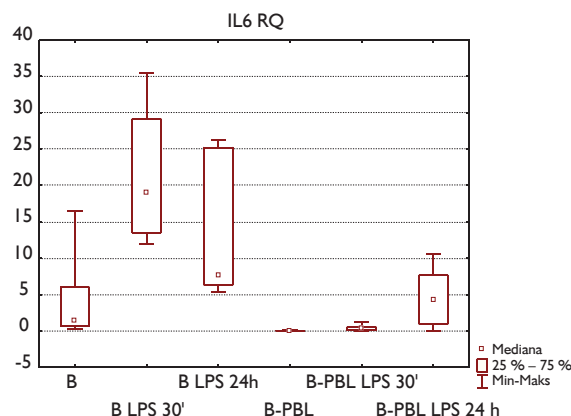
Fig. 3 Comparison of IL-6 mRNA expression between unstimulated CD5⁺CD19⁺ B-CLL and LPS stimulated 30' and 24 h

Subpopulacja białaczkowych limfocytów B CD5⁺CD19⁺ po 24 h stymulacji LPS nadal reagowała wzrostem ekspresji mRNA IL-6. Różnica między poziomem RQ mRNA IL-6 po 24 h w porównaniu z limfocytami niestymulowanymi była istotna statystycznie, $p=0,000001$. Podobnie istotne statystycznie różnice wykazano pomiędzy uzyskanymi wartościami ekspresji RQ mRNA IL-6 w limfocytach stymulowanych 30' i 24 h, $p=0,000073$. Ilustrację graficzną uzyskanych wyników odzwierciedlają ryciny 2, 3, 4.

Omówienie

LPS jest jednym z najsilniejszych stymulatorów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Układ odpornościowy wykrywa i odpowiada na LPS poprzez TLR4 i aktywuje różne czynniki transkrypcyjne, prowadząc do silnej produkcji prozapalnych cytokin, takich jak IL-6, a następnie, jeśli to konieczne, powoduje zahamowanie odpowiedzi immunologicznej [27]. Ten mechanizm, określane jako tolerancja endotoksyczna, jest czynnikiem adaptacyjnym, który ogranicza zakres i czas trwania produkcji cytokin zapalnych poprzez zapobieganie ponownej aktywacji komórek przez te same lub podobne sygnały ostrzegawcze (patogeny bakteryjne i/lub ich produkty). Nadmierną reakcję zapalną obserwuje się w przypadku deregulacji komponentów sygnalizacji lub czynników transkrypcyjnych, co może prowadzić do uszkodzenia tkanek, choroby autoimmunologicznej, a nawet raka [28]. W zrównoważonym układzie odpornościowym produkcja cytokin jest ściśle regulowana. W eksperymentalnych modelach zwierzęcych stwierdzono, że komórki poddane kolejnym ekspozycjom na LPS nie produkują porównywalnych poziomów mediatorów zapalnych [29].

Uzyskane przez nas wyniki wydają się wskazywać na zaburzenia tolerancji endotoksycznej w PBL-B. Pomimo bardzo niskiej ekspresji mRNA IL-6 w niestymulowanych limfocytach białaczkowych, w porównaniu z subpopulacją limfocytów B CD19⁺, ekspresja IL-6 po pobudzeniu komórek LPS miała ciągłą tendencję wzrostową. Po 24 godzinach hodowli PBL-B wzrost ekspresji w porównaniu z wartościami uzyskanymi po 30 min był istotny statystycznie ($p=0,000073$). Przeciwnie, w prawidłowych limfocytach B po 24 godzinach odnotowaliśmy znamienne statystycznie spadek poziomu mRNA poniżej wartości uzyskanej po 30 min ($p=0,028976$). Jednoznaczny komentarz do uzyskanych wyników jest trudny do sformułowania. Zakładając istnienie antygenów/autoantygenów, które permanentnie powodowałyby aktywację limfocytów w PBL-B (co jest coraz częściej sugerowane [1]) i jednoczesny brak tolerancji endotoksycznej, powinno się zauważać raczej



Ryc. 4. Porównanie ekspresji mRNA IL-6 prawidłowych niestymulowanych i stymulowanych LPS subpopulacji limfocytów B CD19⁺ z białaczkowymi limfocytami B CD5⁺CD19⁺ niestymulowanymi i stymulowanymi LPS 30' i 24 h
Fig. 4. Comparison of IL-6 mRNA expression in normal unstimulated and LPS stimulated CD19⁺ lymphocyte subpopulation and unstimulated and LPS stimulated (30' and 24 h) CD5⁺CD19⁺ B-CLL cells

wysoką ekspresję IL-6 w limfocytach niestymulowanych krwi obwodowej chorych, tymczasem ekspresja mRNA IL-6 jest istotnie statystycznie niższa niż w limfocytach prawidłowych. Być może powodem tak niskiej ekspresji tej cytokiny w PBL-B jest obniżona ekspresja białek adaptorowych odpowiedzialnych za transdukcję sygnałów na szlaku od receptora TLR4. Defekt produkcji cytokin w makrofagach z niedoborem białka adapterowego TIRAP wykazali wcześniej Horng i wsp. [30] oraz Yamamoto i wsp. [31]

Niska ekspresja IL-6 w PBL-B może mieć również inne podłoże. Nomura i wsp. [32] wykazali, że stymulacja monocytów LPS-em ma związek z tolerancją endotoksyczną, która prowadzi do obniżenia ekspresji TLR4. W limfocytach B, w PBL, obserwowana jest minimalna do niewykrywalnej ekspresja TLR4, czego przyczyną może być permanentna stymulacja limfocytów PBL-B przez nieznanne antygeny, czynniki środowiska i cytokiny, co sugeruje Chiorazzi i wsp. [1]. Stąd niską ekspresję mRNA IL-6 w limfocytach niestymulowanych można by tłumaczyć niską ekspresją TLR4. Natomiast wzrost ekspresji lub przesunięty w czasie spadek poziomu mRNA IL-6 po stymulacji LPS jest trudny do wyjaśnienia w oparciu o posiadane dane.

Z najnowszych doniesień wynika, że w regulacji sygnalizacji z receptorów TLR i w tolerancji endotoksycznej mogą mieć udział cząsteczki microRNA (miRNA). Nahidi i wsp. [33] wykazali, że miR-146a ustala i utrzymuje tolerancję endotoksyczną poprzez oddziaływanie na takie kluczowe elementy drogi sygnalizacyjnej, jak MyD88, IRAK1, IRAK2, TRAF6 (*tumor-necrosis factor* – TNF; *receptor-associated factor* 6). Navarro i wsp. [34] ustalili z kolei, że docelowym dla miR-145 jest mRNA TIRAP. Natomiast Star-

czynowski i wsp. [35] w swoich badaniach wykazali, że utrata jednego allelu miR-145 i miR-146a koreluje ze zwiększoną ekspresją między innymi IL6, TIRAP i TRAF6 u chorych na MDS (*Myelodysplastic syndrome*) z del(5q). Z najnowszych doniesień Sun i wsp. [36] wynika, że mRNA IL-6 jest celem również dla miR-142-3p. Interesujące byłoby wyjaśnienie, czy w PBL-B występują aberracje w obrębie sekwencji kodujących microRNA, skutkujące defektem ekspresji IL-6.

Badania ostatnich lat [37–40] wykazały, że stymulacyjne ligandy TLR mogą zmieniać ekspresję miRNA, wpływając na deregulację funkcji tych cząsteczek. Z całą pewnością można więc stwierdzić, że odnalezienie owego ligandu/ligandów byłoby pomocne w poznaniu patogenezy B-PBL bądź pewnych jej aspektów.

Piśmiennictwo

- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 352: 804–15.
- Zenz T, Mertens D, Küppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 37–50.
- Patel DV, Rai KR. Chronic lymphocytic leukemia. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al., eds. *Hematology, principles and practice*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005:1437–1454.
- Akira SS, Uematsu, O. Takeuchi. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124: 783–801.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007; 449: 819–826.
- Rosen A, Murray F, Evaldsson C, Rosenquist R. Antigens in chronic lymphocytic leukemia – Implications for cell origin and leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2010; 20: 400–409.
- Anderson LA, Landgren O, Engels EA. Common community acquired infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009; 147: 444–449.
- Schmid C, Isaacson PG. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopath*. 1994; 24: 445–451.
- Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*. 2008; 264 :549–562.
- Munk Pedersen I, Reed J. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 2365–72.
- Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N, et al. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* 2002; 100: 1795–801.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquire immunity. *Nat Immunol*. 2001; 2: 75–680.
- Payelle-Brogard B, Magnac C, Alcover A, Roux P, Dighiero G. Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002; 118: 976–85.
- Vuillier F, Dumas G, Magnac C, Prevost MC, Lalanne AI, Oppezzo P, et al. Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains. *Blood* 2005; 105: 2933–40.
- Gordon MS, Kato RM, Lansigan F, Thompson AA, Wall R, Rawlings DJ. Aberrant B cell receptor signaling from B29 (Igbeta, CD79b) gene mutations of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2000; 97: 5504–5509.
- Albigier B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med*. 2007; 261: 511–528.
- Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection* 2004; 6: 1382–1387.
- Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio MT, Frenquelli M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2009; 144: 507–516.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011; 30:16–34.
- Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 2007; 110: 1911–28.
- Lai R, O'Brien S, Maushouri T, Rogers A, Kantarjian H, Keating M, Albitar M. Prognostic Value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic Leukemia. *Cancer* 2002; 95: 1071–1075.
- Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem*. 2005; 95: 497–505.
- Salado R, Junius S, Benoy I, Van Marck E, Huget P, Dirix LY. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 2003; 103: 642–646.
- Maki G, Hayes GM, Naji A, Tyler T, Carosella ED, Rouas-Freiss N, et al. NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia*. 2008; 22: 998–1006.
- Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968; 97, 77–89.
- Chomczyński P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162, 156–159.
- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 446–458.
- Schishodla S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol*. 2002; 35: 28–40.

29. McCall CE, Grosso-Wilmoth LM, LaRue K, Guzman RN, Cousart SL. Tolerance to Endotoxin-induced Expression of the Interleukin-1/ β Gene in Blood Neutrophils of Humans with the Sepsis Syndrome. *J Clin Invest.* 1993; 91: 853–861.
30. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* 2002; 420: 329–333.
31. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role of TIRAP/Mal for activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 2002; 420: 324.
32. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, et al. Cutting Edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface Toll-Like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2000; 164: 3476–3479.
33. Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol.* 2011; 8: 388–403.
34. Navarro F, Lieberman J. Small RNAs guide hematopoietic cell differentiation and function. *J Immunol.* 2010; 184: 5939–5947.
35. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q-syndrome phenotype. *Nature Medicine* 2010; 16: 49–59.
36. Sun Y, Varambally S, Maher CA, Cao Q, Chockley P, Tubai T, et al. Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood* 2011; 117: 6172–6183.
37. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2006; 103: 12481–12486.
38. Nahid MA, Satoh M, Chan EK, Mechanistic L. Role of MicroRNA-146a in Endotoxin-Induced Differential Cross-Regulation of TLR Signaling. *J Immunol.* 2011; 186: 1723–1734.
39. Nahid MA, Rivera M, Lucas A, Chan EK, Kesavalu L. Polymicrobial infection with periodontal pathogens specifically enhances microRNA miR-146a in ApoE $^{-/-}$ mice during experimental periodontal disease. *Infect Immun.* 2011; 79: 1597–605.
40. Nahid A, Pauley KM, Satoh M, Chan EKL. miR-146a Is Critical for Endotoxin-induced Tolerance. Implication in innate immunity. *J Biol Chem.* 2009; 284: 34590–34599.