

Branduolio faktorius kappa B ir eozinofilai astmos patogenezėje

Ieva Janulaitytė, Simona Lavinskienė

LSMU MA Pulmonologijos ir imunologijos klinika

Reikšminiai žodžiai: branduolio faktorius kappa B, NF-κB, eozinofilai, transkripcijos faktoriai, astma.

Santrauka. Astma yra kompleksinė uždegimo liga, kuriai būdingas kvėpavimo takų uždegimas bei remodeliavimasis ir bronchų reaktyvumas. Eozinofilai – tai kraujyje cirkuliuojantys granulocitai, dalyvaujantys astmos patogenezėje. Eozinofilų gyvavimas sergant alergine astma užsitęsia, kas gali sąlygoti kvėpavimo takų gleivinės pažeidimą ir remodeliavimąsi. Branduolio faktoriaus kappa B kelias buvo laikomas prototipiniu uždegimo signaliniu keliu, kurio pagrindas – uždegimo citokinių, chemokinių ir adhezijos molekulių genų raiška, reguliuojama NF-κB transkripcijos faktoriaus. NF-κB ilgai buvo laikomas „šventuoju graliu“ ar uždegimą slopinančių vaistų taikiniu, tačiau tyrimai parodė, kad lėtinės uždegimo ligos yra itin kompleksiškas mechanizmas, įtraukiantis ląsteles ir jų baltymus. Šis transkripcijos faktorius atsakingas už daugelio uždegimo molekulių, tokių kaip citokinių, chemokinių bei adhezijos molekulių, gamybą ir jų genų raišką. NF-κB taip pat gali būti atsakingas už susilpnėjusią eozinofilų apoptozę.

BRANDUOLIO FAKTORIUS KAPPA B (NF-κB) IR JO AKTYVACIJOS KELIAI

Branduolio faktorius kappa B (NF-κB) – tai pirmasis atrastas ir aprašytas genų raišką imuninėje sistemoje reguliuojantis faktorius, dalyvaujantis įgimtame ir įgytame imuniniame atsake [1]. Šis transkripcijos faktorius dalyvauja ir organogenezėje, nelimfocitinėje bei limfocitinėje hemopoezėje, tiesioginiame antimikrobinio atsako mechanizmuose, uždegimo procesuose, CD4+ T limfocitų diferenciacijoje ir inicijuojant bei reguliuojant imuninių atsaką. Visi NF-κB šeimos baltymai turi bendrą visiems Rel homologinį domeną jų N terminaliniame gale. Šiai transkripcijos faktorių šeimai priklauso RelA, RelB, c-Rel arba p50, p52. NF-κB pošeimio baltymai, įskaitant RelA, RelB ir c-Rel, turi transaktyvacijos domeną savo C terminaliniame gale. NF-κB yra svarbus ląstelinio atsako reguliatorius, kuris priklauso greitai reaguojančių pirminių transkripcijos faktorių kategorijai. Šie transkripcijos faktoriai yra neaktyvios formos, o jų suaktyvėjimas nepriklauso nuo baltymų sintezės ląstelėje. Tai leidžia NF-κB pirmam reaguoti į žalingą ląstelės stimuliavimą, kaip antai: reaktyvias deguonies formas (RDF), tumoro

nekrozės faktorių (TNF-α), interleukiną 1-β (IL-1β), bakterinius lipopolisacharidus (LPS), izoproterenolį, kokainą ir jonizuojančiąją spinduliuotę [2]. NF-κB neaktyvūs dimerai yra nesujautintose ląstelėse.

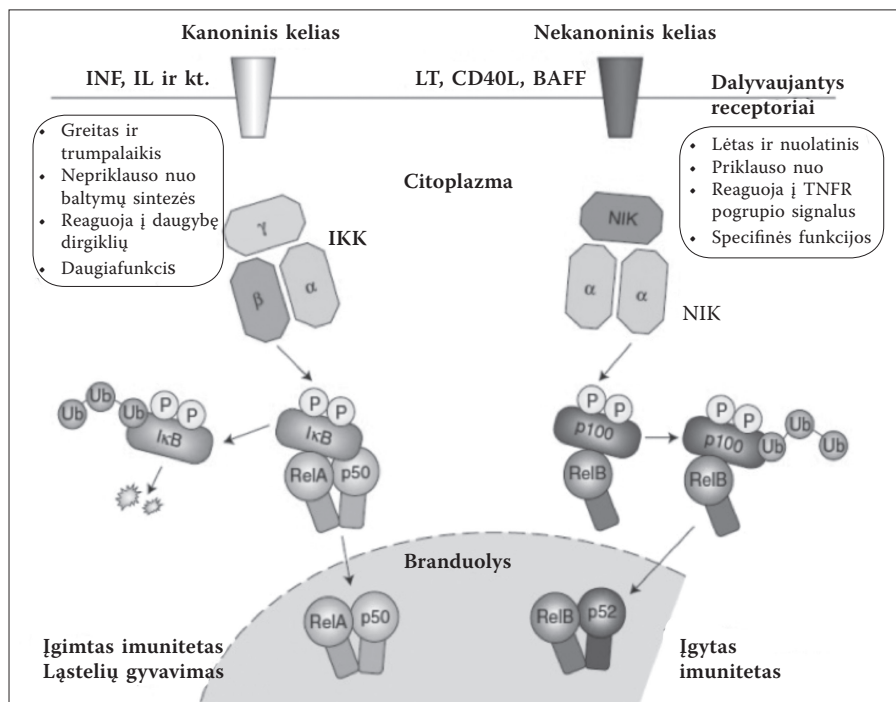
NF-κB yra izuoliuotas branduolio faktoriaus κ B inhibitorių, kurių šeima vadinama κ B inhibitoriais (IκB). Šių baltymų sekoje yra daug pasikartojančių ankirino sekų. Būtent šios sekos apsaugo nuo NF-κB aktyvinimo [3]. IκB šeimai priklauso IκBα, IκBβ, IκBε ir Bcl-3. NFκB aktyvinimas sužadinamas per IκB baltymo degradaciją. Šioje reakcijoje dalyvauja IκB kinazė (IKK). IKK sudaryta iš IKKα ir IKKβ heterodimerinių subvienetų ir pagrindinio reguliacinio baltymo, vadinimo NEMO (angl. *NF-κB essential modulator*) arba IKK gama. Kai perduodamas signalas į ląstelę, IκB kinazė fosforilina dvi serino liekanas, esančias ant IκB reguliacinio domeno, tada vyksta IκB inhibitoriaus molekulių modifikacija, vadinama ubikvintiliniu, dėl to proteosomos suardo šiuos baltymus.

IκB suirus, NF-κB kompleksas išsilaisvina ir patenka į branduolį, kur įjungia tam tikrų genų raišką. NF-κB sukelta genų raiška yra atsakinga už fiziologinį ląstelės atsaką į dirginimą – išskiriami citokinai, chemokinai, ląstelė proliferuoja arba pailgėja jos gyvavimo laikas. Tuo pat metu vyksta raiška ir

IκBα, kuris stabdo NF-κB veikimą, taip susidaro „kilpa“, kai iš neaktyvios formos paverstas į aktyvią NF-κB aktyvina savo paties inhibitoriaus raišką [4].

NF-κB aktyvinimas

Uždegimo atsakas – koordinuotas daugelio signalinių kelių suaktyvėjimas, kuris reguliuoja tiek uždegimą skatinančių, tiek slopinančių citokinių raišką būdinguose audiniuose ir leukocituose. Daugiausia duomenų turima apie IL-1 ir TNF-α bei *Toll-like* mikrobinio atpažinimo receptorius, kurie priklauso IL-1 receptorių šeimai. IL-1 ir TNF-α yra pagrindiniai uždegimo citokinai, kurie greitai išskiriami esant audinių pažeidimui ar infekcijai. TLR atpažįsta mikrobines molekules ir pateikia germinacines savęs neatpažinimo užkoduotas sistemas, kurios greitai atpažįsta uždegimo sukėlėją [5]. Tačiau yra duomenų, kad ne tik išoriniai, bet ir endogeniniai ligandai gali veikti TLR esant audinių pažeidimui ir tam tikroms ligos stadijoms, kurios veikia kaip uždegimą skatinantys veiksniai, nors uždegimo nėra [6]. Nors yra struktūriškai skirtingi, šie receptoriai naudoja panašų signalų perdavimo mechanizmą, kuriame dalyvauja IκB kinazė (IKK) ir NF-κB aktyvacija [7]. Daugelyje ląstelių NF-κB kompleksas yra neaktyvus, nes citoplazmoje sudaro



1 pav. Kanoninis ir nekanoninis NF-κB signalinis kelias [8]

kompleksus su inhibitoriais baltymais IκB. Skiriami du NF-κB aktyvacijos keliai: kanoninis ir nekanoninis (1 pav.).

Kanoninis NF-κB signalinis kelias suaktyvėja, kai IκB baltymai yra suardomi IκB kinazių komplekso (IKK) β ir α subvienetų, NF-κB dimerai įeina į branduolį [9] ir pradeda moduluoti genų raišką. Manoma, kad kanoninis kelias yra svarbus alerginės astmos patogenezeje. Šį kelią aktyvina uždegimą slopinantys tarpininkai. Nekanoninis kelias suaktyvėja tarpininkaujant IKK-α, kuris fosforilina IκB, ir tuo metu proteosomos pradeda irti [10]. IKK komplekso α ir β subvienetai yra katalitiniai, o reguliacinis, kitaip dar vadinamas NEMO subvienetu. Šis kelias reguliuoja limfinių organų vystymąsi bei B limfocitų aktyvumą.

Kanoninis NF-κB kelias pirmiausia buvo apibūdintas kaip atsakas į TNF-α ir IL-1 signalus, prototipiškai šie uždegimo citokinai vaidina svarbų vaidmenį patogenezeje tokių lėtinių ligų kaip reumatoidinis artritas, astma ir lėtinė obstrukcinė plaučių liga (LOPL) [11–13]. NF-κB aktyvumas uždegimo metu yra susijęs su kanoninio kelio ir RelA- ar cRel sudarančių kompleksų suaktyvėjimu. Atliktos studijos su reumatoidinio artrito pacientais atskleidė, kad pažeistas audinys gamina daugiau nei įprastai uždegimo citokinių ir chemokinių, o ši reakcija yra priklausoma nuo NF-κB [14, 15]. Panašūs ir žmogaus aterosklerozinio uždegimo bei uždegimo citoki-

nų gamybos, taip pat priklausomos nuo NF-κB, studijų rezultatai [16]. Nustatyta koreliacija tarp NF-κB aktyvacijos ir uždegimo ligų tiriant gyvūnų artrito [17] ir alerginių kvėpavimo takų ligų modelius [18]. Tačiau ryšį tarp NF-κB aktyvumo ir uždegimo ligų nėra lengva interpretuoti, nes išskiriami tiek uždegimą skatinantys, tiek slopinantys mediatoriai, todėl tikėtina, kad ligos progresavimas priklauso nuo jų santykio [19].

Alternatyvus NF-κB aktyvinimo kelias – p100 fosforilimas IKK-α, dėl to suaktyvėja RelB/p52 heterodimerai. Tyrimai su gyvūnų modeliais rodo, kad šis kelias svarbus organogenezei ir B limfocitų funkcionavimui [20, 21], tačiau jo reikšmė uždegimo ligų atveju nėra tiksliai žinoma [22, 23].

EOZINOFILAI IR JŲ APOPTOZĖ ASTMOS PATOGENEZEJE

Astma yra kompleksinė kvėpavimo takų uždegimo liga, kuriai būdinga kvėpavimo takų remodeliavimas [24], bronchų hiperreaktyvumas [25, 26]. Eozinofilai yra vienos iš pagrindinių ląstelių, dalyvaujančių alerginės astmos patogenezeje ir uždegimo procesuose [27–30]. Eozinofilai – iš kaulų čiulpų ląstelių kilę kraujyje cirkuliuojantys granulocitai, kurie sudaro 1–3 proc. visų leukocitų [31]. Eozinofilai vystosi iš CD34+ pluriotentinių progenitorinių ląstelių, kai jas stimuliuoja inter-

leukinas 5 (IL-5), interleukinas 3 (IL-3) ir granulocitų bei makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (GM-CSF) [32]. Šių progenitorinių ląstelių paviršinė membrana turi daug IL-5 receptorių, todėl interleukino signalai lemia eozinofilų vystymąsi. Kita alerginiame uždegime dalyvaujanti ląstelė – 2 tipo T limfocitai pagalbininkai (Th2) – išskiria IL-5, kuris veikia kaulų čiulpuose esančias CD34+ progenitorines ląsteles [33]. Plaučiuose eozinofilai atlieka daugelį funkcijų, kurios gali būti atsakingos už ligos eigą. Eozinofilai yra atsakingi už reaktyviųjų deguonies formų (RDF) susidarymą ir išskiria toksines granules bei citokinus (IL-13, IL-5, TGF-β), chemokinus (CCL-11, CCL22, matricos metaloproteinazės, granulių mediatorius ir kt.) [34, 35], be to, jie gali pateikti antigeną ląstelėms. Eozinofilai kraujyje išgyvena 5 val., o audiniuose – net iki 8–12 dienų.

Apoptozė – tai genetiškai užprogramuota ląstelės žūtis, kuriai prasidėjus ląstelėje suaktyvėja pačios ląstelės fermentai ir imamos skaldyti ląstelę sudarančios medžiagos [36]. Tai biologiškai svarbus procesas, reikalingas palaikyti audinių hemostazę, reguliuoti ląstelių augimą ir diferenciaciją. Vykstant apoptozei, negrįžtamai suaktyvinama proteolizinių baltymų kaspazių (cisteino proteazių) kaskada (2 pav.). Suaktyvėjusios kaspazės proteoliziškai aktyvina kitas prokaspazes. Kai kurios kaspazės ardo struktūrinius ląstelės baltymus, pavyzdžiui, branduolio apvalkalo, citoskeleto bei tarpląstelinį jungčių baltymus ir aktyvina endonukleazę, kuri suskaldo branduolio DNR. Svarbiausi apoptozės požymiai: DNR sutrūkinėja į fragmentus, branduolys susitraukia ir susiraukšlėja, pakinta pačios ląstelės forma. Eozinofilų apoptozę gali sukelti daugelis veiksnių: Fas ligazės, dauguma farmakologinių medžiagų ar TNF receptorių ligazės. O taip pat gali veikti vidinis kelias, susijęs su mitochondrijų veikla.

NF KAPPA B VAIDMUO EOZINOFILŲ APOPTOZĖS METU

Alerginės astmos metu NF-κB reguliuoja antiapoptozinį Bcl-2 veikimą. Jei Bcl-2 raiška padidėjusi, eozinofilų gyvavimas pailgėja, susilpnėja ląstelių apoptozė kvėpavimo takuose. Eozinofilų apoptozę gali sukelti daugelis veiksnių: Fas ar TNF receptorių ligazės, daugelis farmakologinių medžiagų. Kvėpavimo takų ląstelės pasižymi Fas ligando raiška, T limfocituose šio ligando raiška yra sumažėjusi dėl Th2

išskiriamų citokinų GM-CSF [37–39] ir IL-5 [36, 40]. Nustatyta, kad IL-5 yra eozinofilų koloniją stimuliuojantis faktorius [41]. Tyrimų su pelėmis modeliuose buvo nustatyta, kad Fas ligando neutralizavimas gali lemti kvėpavimo takų eozinofiliją alerginės astmos metu.

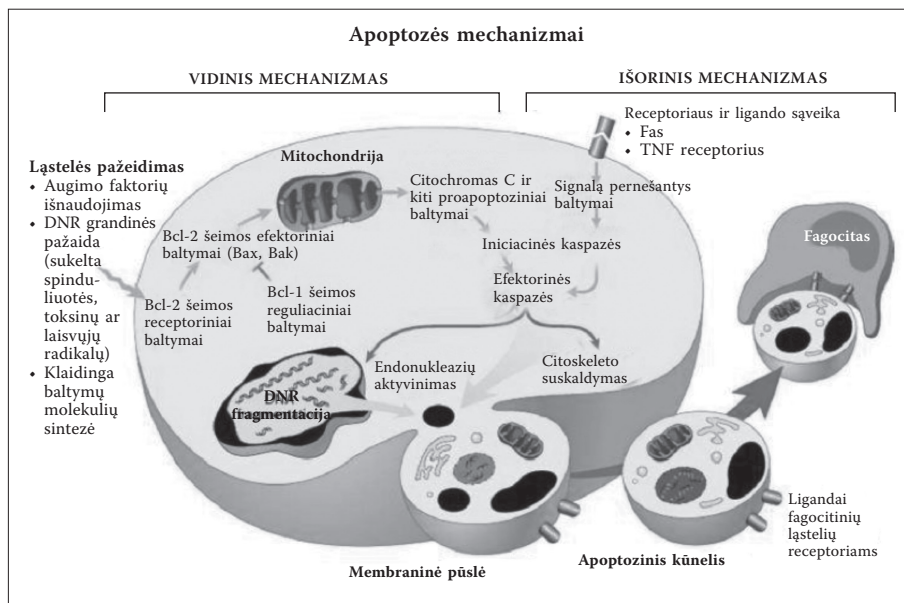
Apoptozės reguliavimui itin svarbus onkogeno p53 baltymas, kuris kontroliuoja genų, valdančių ląstelės ciklą, DNR reparaciją, angiogenezę, baltymų degradaciją ir raišką. p53 baltymas gali sužadinti apoptozę per proapoptozinius Bcl-2 šeimos narius ir slopinti antiapoptozinius Bcl-2 baltymus. Suaktyvėjus šiems procesams, ląstelės tampa itin atsparios daugeliui žūtį lemiančių poveikių.

Alerginės astmos atveju intensyvių uždegimą gali sąlygoti padidėjęs NF- κ B aktyvumas, kuris slopina eozinofilų apoptozę. Be to, ilgesnį eozinofilų gyvavimą gali lemti ir GM-CSF bei IL-5. GM-CSF yra vienas pagrindinių citokinų, sąlygojančių ilgesnį eozinofilų gyvavimą kvėpavimo takuose sergant astma. IL-5 taip pat sąlygoja ilgesnį eozinofilų gyvavimą, gali pakeisti antiapoptozinio Bcl-2 raišką eozinofiluose, reguliuoja kaspazes, vienus pagrindinių apoptozės kaskadinio kelio elementų. Kad sustabdytų eozinofilų apoptozę, IL-5 blokuoja kaspazių aktyvumą, apoptozę sutrikdoma ir eozinofilų gyvavimas pailgėja. Šie citokinai skatina ir eozinofilų migraciją bei jų kaupimąsi kvėpavimo takuose. Kai NF- κ B slopinamas, eozinofilai reaguoja į TNF- α signalus, kurie įjungia apoptozės mechanizmą. NF- κ B transkripciskai reguliuoja antiapoptozinį Bcl-2, apoptozės inhibitorius Mcl-1 ir c-IAP [37].

Jei signalinis kelias slopinamas, sutrinka šių veiksmų reguliavimas ir skatinama eozinofilų apoptozė. Jei NF- κ B aktyvinamas, suaktyvėja Bcl-2 raiška, pailgėja eozinofilų gyvavimas ir sumažėja šių ląstelių apoptozė kvėpavimo takuose. TNF- α yra slopinamas, kai NF- κ B aktyvus ir nepažeisti jo signaliniai keliai [42, 43].

APIBENDRINIMAS

Eozinofilai – viena pagrindinių ląstelių, dalyvaujančių alerginės astmos patogenezėje, o branduolio faktorius kappa B yra svarbus veiksnys, dalyvaujantis ne tik ląstelių vystymosi, bet ir diferenciacijos bei proliferacijos procesuose. Manoma, kad alerginės astmos atveju NF- κ B aktyvacija sąlygoja lėtesnę eozinofilų apoptozę, dėl to gali būti palaikomas intensyvesnis uždegimas kvėpavimo takuose.



2 pav. Vidinis ir išorinis apoptozės mechanizmas

Išorinis signalinis kelias įjungiamas per signalines molekules, vadinamas ligandais, kurios prisijungia prie transmembraninių „mirties“ receptorių, aktyvinančių kitus transmembraninius receptorių, sudarydami ląstelės žūtį sukeltantį signalinį kompleksą. Šis kompleksas aktyvina kaspazę 8, kuri tiesiogiai gali aktyvinti kaspazę 3. Kaspazė 3 yra efektorinis baltymas, kuris sužadina ląstelės degradaciją. Aktyvi kaspazė 8 gali Bid baltymą suskaldyti į Bid, kuris svarbus vidiniam apoptozės signaliniam keliui. Vidinis signalinis kelias įjungiamas, kai ląstelė patiria stresą. Kai gaunamas streso signalas, proapoptoziniai Bax, Bid ir Bak baltymai prisijungia prie išorinės mitochondrijos membranos. Jiems prisijungus, mitochondrija išskiria savo vidinį turinį ir citochromą C, dėl to citoplazmoje formuojasi kompleksai ir aktyvinama kaspazė 9, kuri toliau aktyvina efektorinę kaspazę 3. Tuo pat metu veikia ir Smac/Diablo baltymai, kurie slopina apoptozės inhibitorius [44].

NUCLEAR FACTOR K B AND EOSINOPHILS IN ASTHMA PATHOGENESIS

IEVA JANULAITYTĖ, SIMONA LAVINSKIENĖ
DEPARTMENT OF PULMONOLOGY AND IMMUNOLOGY,
MEDICAL ACADEMY, LITHUANIAN UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES

Keywords: nuclear factor kappa B, NF- κ B, eosinophils, transcription factors, asthma.

Summary. Asthma is a complex immunologic and inflammatory disease characterised by the presence of airway inflammation, airway remodelling, and bronchial hyperresponsiveness (BHR). Eosinophils are circulating granulocytes involved in pathogenesis of asthma. Multiple elements including interleukin (IL)-5, IL-13, chemoattractants are directly involved in recruiting eosinophils to the lung during allergic inflammation. Once recruited, eosinophils participate in the modulation of immune response, induction of airway hyperresponsiveness and remodeling, characteristic features of asthma. Airway eosinophilia has been recognized as a predominant feature of allergic asthma and elevated numbers during the inflammation are often associated with the disease severity. Increased eosinophil survival and decreased apoptotic death are believed to participate in the asthmatic airways. The nuclear factor NF- κ B pathway has long been considered a prototypical proinflammatory signaling pathway, largely based on the role of NF- κ B in the expression of proinflammatory genes including cytokines, chemokines, and adhesion molecules. The NF- κ B pathway does indeed regulate proinflammatory cytokine production, leukocyte recruitment, or cell survival, which are important contributors to the inflammatory response. But, the antiapoptotic functions of NF- κ B can both protect against inflammation, in the case of epithelial cell survival and mucosal barrier integrity, and also maintain the inflammatory response through persistent leukocyte activation.

LITERATŪRA

1. Yusuf D, Butland SL, Swanson MI, Bolotin E, Ticoll A, Chung WA, et al. The transcription factor encyclopedia. *Genome biology*. 2012;13(3):R24.
2. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *Journal of immunology*. 2000;165(2):1013-21.
3. Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell*. 1998;95(6):749-58.
4. Nelson DE, Ihekwaba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, et al. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*. 2004;306(5696):704-8.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
6. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*. 2006;124(4):823-35.
7. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002;109 Suppl:S81-96.
8. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(6):a001651.
9. Poynter ME. Airway epithelial regulation of allergic sensitization in asthma. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2012;25(6):438-46.
10. Oh H, Ghosh S. NF-kappaB: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunological reviews*. 2013;252(1):41-51.
11. Holgate ST. Cytokine and anti-cytokine therapy for the treatment of asthma and allergic disease. *Cytokine*. 2004;28(4-5):152-7.
12. Chung KF. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Current drug targets*. 2006;7(6):675-81.
13. Williams RO, Paleolog E, Feldmann M. Cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Current opinion in pharmacology*. 2007;7(4):412-7.

Kiti literatūros šaltiniai (iš viso 44) redakcijoje.