

## PATOGENIA ASTMULUI BRONȘIC – NOI PERSPECTIVE DE ABORDARE?

S. Iurian\*, B. Neamțu\*

### REZUMAT

Limfocitele Th2 joacă un rol important în inițierea și progresia bolilor alergice inclusiv astmul bronșic. Conceptul dezechilibrului dintre celulele Th1/Th2 acceptat până în prezent ca determinant în patogenia astmului bronșic nu poate totuși explica multe dintre observațiile experimentale. Recent au fost descrise subpopulații de celule T reglatorii, respectiv celule T CD4+ reglatorii, celule T CD8+ reglatorii și celule NK. Dintre acestea, celulele T CD4+ se subîmpart în celule T natural reglatoare CD25+ și celule T adaptative reglatoare. Ultima categorie se subdivide în celule T reglatoare tip 1 și celule T helper tip 3, celule ce intervin în supresia imună, putând explica o parte din mecanismele patogene din astmul bronșic.

În prezent, expresia chemokinelor (citokine cu rol chemotactic ce intervin în recrutarea celulară din astm) în cursul afecțiunilor cronice inflamatorii este intens studiată. Multe date sugerează rolul important al reglării post-transcripționale în expresia genelor chemokinelor. Se pare că mecanismele ce controlează stabilitatea mRNA-lui specific chemokinelor sunt importante în determinarea și menținerea unui nivel crescut de chemokine și pot constitui „ținta” pentru noi strategii terapeutice.

**Cuvinte cheie:** alergii, astm, celule T reglatoare, chemokine, stabilitate mRNA.

Cunoașterea și înțelegerea mecanismelor fiziopatogene ce intervin în declanșarea și evoluția bolii sunt necesare, în vederea optimizării asistenței astmului. Modelul patogenetic corelabil cu conflictul și inflamația alergică este cel mai bine cunoscut.

Din punct de vedere fiziopatogenic, astmul poate fi definit ca o alterare cronică a căilor aeriene în care intervin numeroase elemente celulare, în special mastocite, eozinofile, celule prezentatoare de antigen, limfocite T, neutrofile și celule epiteliale.

### Fiziopatogenie

În conformitate cu definiția, inflamația căilor aeriene reprezintă mecanismul fiziopatogenic central în astm, întrucât aceasta induce declanșarea alterărilor caracteristice bolii (hiperreactivitate bronșică exprimată clinic prin bronhospasm, obstrucționarea fluxului de aer, edemul mucoasei căilor aeriene, hipersecreția de mucus, remodelarea pereților căilor respiratorii și, secundar, creșterea rezistenței căilor respiratorii la fluxul de aer). Remodelarea bronșică este consecința inflamației cronice de la nivelul căilor aeriene și presupune îngroșarea și fibrozarea membranei bazale a

### ABSTRACT

#### Asthma pathogenesis - new tackling prospects?

The lymphocyte Th2 plays a pivotal role in initiation and progression of allergic disease, including asthma. The concept of imbalance Th1/Th2 isn't able to explain many experimental observations. Recently, many different T regulatory cells subsets have been described, including CD4+ T regulatory cells, CD8+ T regulatory cells and natural killer (NK) cells. Among them, CD4+ T regulatory cells consist of naturally occurring CD25+ T regulatory cells and, also, adaptive T regulatory cells that are further subdivided into T-regulatory cells type 1 and T-helper cell type 3 that mediate suppression and could explain few mechanisms in asthma pathogenesis.

At present, the chemokine expression during chronic inflammatory diseases is more understood as compare to previous years. Many data suggest that post-transcriptional regulation plays an important role in chemokine gene expression. Some recent data indicates that mechanisms controlling mRNA stability may be important in determining and maintaining the increased levels of chemokine gene expression. These pathways may be targets of novel anti-inflammatory strategies.

**Key words:** allergy, asthma, regulatory T cells, chemokines, RNA stability.

epiteliului respirator, hipertrofia și hiperplazia musculaturii netede, apariția vaselor de neoformație, modificări ce justifică, pe plan clinic, apariția sindromului obstructiv cu reversibilitate limitată sau lipsa reversibilității la acțiunea bronhodilatatoarelor. Remodelarea bronșică este, deci, expresia unei evoluții nefavorabile a astmului persistent.

Patogenia astmului bronșic se derulează în mai multe etape:

1. Sensibilizarea primară;
2. Reacția inflamatorie – faza precoce;
3. Reacția inflamatorie – faza tardivă ;
4. Remodelarea bronșică.

Cu toate progresele înregistrate în înțelegerea patogeniei astmului bronșic, mecanismele imuno-reglatoare ce condiționează severitatea, susceptibilitatea și persistența astmului bronșic sunt insuficient cunoscute. Așa cum au arătat cercetări recente, se conturează tot mai mult intervenția unor subpopulații de celule numite celule reglatorii în patogenia afecțiunilor autoimune, infecțioase și alergice (incluzând astmul bronșic), celule asupra cărora vom insista în continuare, precum și asupra modalităților de intervenție care au fost în parte descifrate.

Au intrat în atenția cercetătorilor diverse subpopulații

\*Dr. Sorin Iurian\*, Prof. univ. dr. Bogdan Neamțu, Șef Clinică - Clinica Pediatrie Sibiu

de celule reglatorii (celule Natural Killer, limfocite reglatorii CD8+, limfocite reglatorii CD4+ etc), dintre care de departe cele mai studiate și „mediatizate” au fost limfocitele reglatorii CD4+(9).

## Ce se știa până în prezent referitor la patogenia astmului bronșic?

Dacă ne referim doar la etapa sensibilizării primare, pneumalergenii odată pătrunși în organism sunt preluați de către celulele prezentatoare de antigen (CPA) ce intervin în procesul de procesare antigenică. Secundar procesării, anumite peptide alergice vor fi cuplate cu complexul major de histocompatibilitate clasa II (CMH - II), condiție esențială pentru colaborarea cu receptorul limfocitului Th (TCR – „T cell receptor”) în urma căreia se vor activa limfocitele Th naive (Th<sub>0</sub>). Acestea migrează la nivelul ganglionilor regionali unde, sub influența microambientului citokinic, se vor putea diferenția spre două subcategorii celulare distincte:

- limfocitele Th<sub>1</sub> și limfocitele Th<sub>2</sub>.

Această diferențiere celulară este, în același timp, și rezultatul intervenției unor factori de transcripție specifici pentru fiecare subpopulație celulară: STAT 4 pentru Th<sub>1</sub> și STAT 6 și GATA 3 pentru Th<sub>2</sub>.

Pornind de la această premiză și corelat cu studiile efectuate pe șoareci care au arătat efectele inhibitorii reciproce ale limfocitelor Th<sub>1</sub> versus limfocite Th<sub>2</sub>, s-a emis ipoteza conform căreia dezechilibrul celor 2 categorii celulare (cu predominanța limfocitelor Th<sub>2</sub>) ar condiționa direcționarea fenomenelor patologice spre inițierea, agravarea sau persistența astmului bronșic.

Studii recente (9) au arătat că raportul dintre celulele Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> nu este suficient pentru a explica multe dintre observațiile experimentale. În primul rând, celulele Th<sub>1</sub> nu aduc întotdeauna beneficii pe modelele de șoareci cu astm alergic, constatându-se uneori chiar exacerbarea manifestărilor bolii asmatică. În al-2-lea rând, infestațiile parazitare helmintice Th<sub>2</sub>-condiționate nu au părut să fie asociate cu exacerbarea manifestărilor de alergii și astm, ba chiar contrar acestei opinii se pare că ar oferi protecție față de aceste boli. Trebuie menționat că aceste date nu exclud efectele inhibitorii reciproce între Th<sub>1</sub> și Th<sub>2</sub>.

Astfel, s-au ridicat semne de întrebare în ceea ce privește rolul protector în astmul bronșic al celulelor Th<sub>1</sub> sau rolul determinant al dezechilibrului dintre Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> (în favoarea Th<sub>2</sub>) în apariția astmului bronșic.

## Care sunt noile abordări pe plan patogenetic în astmul bronșic?

Descoperirea rolului și funcțiilor limfocitelor T reglatorii au schimbat, în conformitate cu datele recente din literatura de specialitate, perspectiva abordării patogeniei astmului bronșic.

În continuare, vom prezenta analiza a 2 subclase de celule T reglatorii CD4+: celule naturale T reglatorii CD<sub>25</sub><sup>+</sup> („naturally occurring T regulatory cell”) și celulele T reglatorii adaptative („adaptive T regulatory cell”) ce previn răspunsurile autoimune și, respectiv, răspunsurile imune adaptative. Celulele T reglatorii adaptative sunt mai departe subîmpărțite în celule T reglatorii tip 1 (Tr1) și celule T helper tip 3 (Th<sub>3</sub>) ce mediază supresia prin intermediul

IL-10 și β-TGF (transforming grow factor-β) (9).

Pe scurt, etapele patologice ar fi următoarele:

- limfocitul T natural reglator (sintetizat în timus sau din limfocitul T naiv prin stimulare antigenică) interacționează cu celula dendritică (tipul tolerogen), interacțiune mediată de receptorii de suprafață (molecula CTLA - 4 exprimată pe suprafața limfocitului vine în contact cu moleculele tip B7 ale celulei prezentatoare de antigen care sunt legate de complexul major de histocompatibilitate CMH clasa II). Această interacțiune va condiționa transmiterea de semnale endocelulare ce activează enzima indoleamina deoxigenaza (IDO). Această enzimă determină transformarea triptofanului în kynurenină și metabolizii acesteia ce își exercită efectul imunosupresiv datorită efectelor pro-apoptotice și antiproliferative;
- molecule specifice de proveniență microbiană numite PAMPs, datorită afinității pentru receptorii specifici ai celulei dendritice („Toll like receptors” -TLRs sau „C lectin-like receptors” - CLRs), se cuplează cu aceștia și activează celula dendritică (celulă prezentatoare de antigen) – vezi figura 3; prin activare, aceasta exprimă la suprafață complexul de histocompatibilitate clasa II și moleculele B7 și astfel devine „pregătită” pentru colaborarea cu limfocitul T natural reglator;
- limfocitul T natural reglator poate inhiba limfocitul Th<sub>2</sub> fie în mod direct, fie indirect prin intermediul unui alt tip de limfocit T reglator (limfocitul T adaptativ) care, odată diferențiat spre limfocit Th<sub>3</sub> sau limfocit T reglator tip 1, inhibă limfocitele Th<sub>1</sub> și Th<sub>2</sub>;
- cu celula dendritică tolerogenă interacționează, nu numai limfocitul T natural reglator, ci și limfocitul T naiv (vezi figura 1); prin intermediul propriului receptor (TCR – „T cell receptor”), limfocitul T naiv colaborează cu celula prezentatoare de antigen prin intermediul aceluiași molecule de tip B7 și produce de asemenea IL-10 și TGF-β ce activează secundar limfocitele T adaptative și inhibă Th<sub>1</sub> și Th<sub>2</sub> (vezi mecanismul descris anterior);
- în afara mecanismelor de reglare descrise în care intervin numeroase celule, există și mecanisme de contrareglare (exemplu: limfocitul Th<sub>2</sub> inhibă enzima IDO datorită interacțiunii antigenului său de suprafață CD28 cu moleculele de la suprafața celulei dendritice);
- astfel, prin inhibarea celulelor Th<sub>1</sub> și Th<sub>2</sub> (efect imunosupresiv) se reduce substanțial și sinteza de citokine și chemokine proinflamatorii, diminuează recrutarea de celule răspunzătoare de inflamație la nivelul căilor respiratorii, reducându-se astfel intensitatea procesului inflamator alergic din căile respiratorii cu efecte benefice clinice.

## Celulele T reglatorii naturale (celulele n. T reg.)

Aceste celule se caracterizează imunofenotipic prin prezența de antigene de suprafață CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>25</sub><sup>+</sup> și se sintetizează în timus, stabilindu-se apoi în țesuturile limfoide periferice și sângele periferic, unde reprezintă 5-10% dintre

toate celulele CD4+ (în măduva osoasă > 20% dintre celulele CD4+). În studiile efectuate pe rozătoare, transferul pasiv de celule n.T.reg ar suprima diabetul, boala inflamatorie intestinală și rejețul de transplant. Celulele n.T. reg exprimă pe suprafață un TCR tip  $\alpha/\beta$  și au mare afinitate pentru peptidele „self” din periferie, explicând astfel expresia markerului de activare limfocitară T (CD25). Deși încă incerte, unele date susțin că celulele n.T. reg pot fi sintetizate și în periferie de către limfocitele CD4+ convenționale în condițiile expunerii la antigene patogene, la doze mici de peptide antigenice administrate prin perfuzie subcutanată continuă, la  $\beta$ -TGF sau glucocorticoizi. Celulele n.T. reg. au pe suprafață molecule CTLA-4, NOTCH-3 și LAG-3 ce intervin în diverse reacții de cooperare intercelulară. Astfel, limfocitele natural reglatoare, prin intermediul moleculei CTLA-4 interacționează cu moleculele complementare B7-1 sau B7-2 ce aparțin celulelor dendritice (celule prezentatoare de antigen), inducând expresia enzimei indoleamine 2,3 dioxigenaza (IDO) în celula dendritică. Enzima IDO va bloca conversia triptofanului în kynurenină și a altor metaboliți din „aval” favorizând imunosupresia, fie prin „înfometarea” celulelor T (datorită depleției triptofanului), fie prin validarea efectelor antiproliferative și pro-apoptice ale metaboliților din aval. În schimb, enzima IDO poate fi blocată de către IL-6 sintetizată în urma interacțiunii dintre molecula de suprafață CD28 a limfocitului Th<sub>2</sub> și moleculele B7 exprimate de celulele dendritice. Celulele n.T. reg. pot suprima celulele T efectoare (Th<sub>1</sub> și/sau Th<sub>2</sub>) prin diferite mecanisme: fie direct, prin blocarea limfocitului Th<sub>2</sub>, fie indirect, prin intermediul limfocitelor adaptative T reglatoare (așa cum se va vedea în continuare) care, odată cu diferențierea în celule Th<sub>3</sub> și Tr1, vor elibera IL-10 și  $\beta$ -TGF cu inhibarea consecutivă a limfocitelor Th<sub>1</sub> și Th<sub>2</sub> (9).

Markerul CD<sub>25</sub> este exprimat de limfocitul natural T reglator pe suprafața sa, dar această moleculă este, de asemenea, exprimată și alte subpopulații de celule T activate (este un marker de activitate limfocitară T). S-a încercat identificarea și altor molecule de suprafață care să caracterizeze limfocitul natural T reglator, identificându-se astfel și alți markeri (fără însă a fi foarte specifiți): CD45RBlow/CD45RO, CD38, CD62L, GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) și neuropilina-1. Mai mult, celulele n. T. reg. pot fi caracterizate și în funcție de exprimarea pe suprafață a integrinelor. Dintre acestea, se menționează:

- $\alpha$ E $\beta$ 7 (CD103) care pare să caracterizeze o subpopulație de celule n.T. reg extrem de potente în supresie (exprimă nivele crescute de molecule de adeziune și receptori pentru chemokine);
- $\alpha$ 4 $\beta$ 7+ și  $\alpha$ 4 $\beta$ 1+ stimulează producția de celule regulatorii tip 1 (Tr1) sau celule Th<sub>3</sub>.

S-a demonstrat recent că un factor de transcripție FOXP3 este exprimat în mod selectiv de către celulele n.T.reg. Nivelul de FOXP3 în celulele n. T. reg. aflate în repaus este de 100 ori mai mare raportat la celulele T convenționale activate (FOXP3 este un marker mult mai specific pentru celulele n.T. reg. Dezavantajul major este legat de faptul că dozarea FOXP3 nu se face prin flow-citometrie ci prin reacția de polimerizare în lanț (PCR) cantitativă. Datele mai sugerează că FOXP3 este o importantă genă reglatoare privind dezvoltarea și funcționarea celulelor n.T. reg. și, deci, rol în supresia bolilor autoimune. Yagi și colaboratorii a demonstrat că celulele convenționale T CD4+CD25- pot fi transformate în celule n.T. reg. prin transfer ex vivo a genei FOXP3. Faptul că FOXP3 este esențial în funcționarea celulelor n.T. reg. deschide posibilitatea unor strategii terapeutice care să aibă ca scop direcționarea celulelor convenționale CD4+ spre sinteza de celule n.T. reg.

În concluzie, celulele n.T. reg exercită efecte imunosupresive puternice.

### Celulele adaptative T regulatorii (celule a.T reg.)

Aceste celule a.T. reg. sunt generate în periferie din celule T naive după contactul cu antigenele prezentate de celulele dendritice tolerogenice care sunt distincte d.p.d.v. funcțional de celulele dendritice imunogenice (acestea din urmă promovează sinteza de celule Th<sub>1</sub> și Th<sub>2</sub>). Așa cum s-a menționat deja, celule a.T. reg se diferențiază în Tr1 și Th<sub>3</sub> ce vor media supresia prin intermediul IL-10 și TGF- $\beta$ : TGF inhibă proliferarea și secreția citokinelor de către celulele T, iar IL-10 potențează activitatea TGF prin stimularea exprimării receptorului pentru TGF. Vice versa, TGF stimulează expresia IL-10 cu rol imunosupresiv asupra celulelor T. Astfel, IL-10 și TGF dețin efecte sinergice și supresive asupra celulelor T (vezi figura 1).

Celulele a.T. reg. exprimă variabil pe suprafață CD<sub>25</sub> în

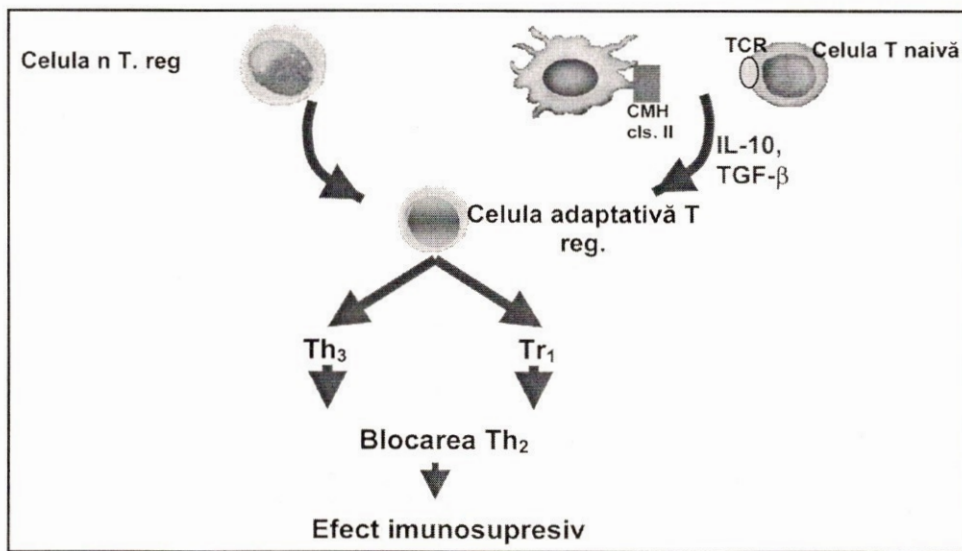


Fig. 1

funcție de nivelul de activare. și nu pot fi diferențiate numai prin expresia IL-10 și TGF(9).

## Rolul celulelor dendritice (DC) în generarea celulelor adaptative a.T reg.

Celulele dendritice joacă un rol esențial în generarea tuturor subpopulațiilor de celule a.T reg. Celulele dendritice imature (numite și tolerogene) din periferie vin în contact cu microbi și antigene din vecinătate. Agenții microbieni conțin molecule numite PAMPs („patogen associated molecular patterns”) recunoscute prin intermediul unor receptori PRRs („pattern recognition receptors”), din a căror familie fac parte TLRs („Toll like receptors”) și CLRs („C type lectin receptors”). Bacteriile sunt bogate în PAMPs ce provin din peretele celular (lipozaharide, lipoproteine, peptidoglicani etc) și care sunt recunoscute de TLRs, inducând semnale ce vor avea ca rezultat maturarea celulelor dendritice. Maturarea va fi caracterizată prin accentuarea expresiei CMH clasa II și a moleculelor de costimulare (B7-1, B7-2) și prin stimularea secreției de citokine (vezi figura 2).

DC tolerogene, așa cum s-a mai menționat, sunt în general celule imature.

Mecanismele prin care DC tolerogene determină dezvoltarea celulelor a. T reg. nu sunt cunoscute:

- a. sinteza de Tr1 și Th<sub>3</sub> este legată de producția de IL-10 și TGF de către DC imature. Mulți agenți patogeni (virusuri, paraziți, fungi și bacterii) și PAMPs induc sinteza de IL-10 și TGF favorizând inducția de celule a. T reg. Dar și bacteriile comensale (nu doar cele patogene: Clostridium difficile, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolitica, Helicobacter Pylori) prezente pe suprafața mucoasei intestinale au rol în inducția de celule a. T reglatorii prin inhibarea NF-kB (factor de transcripție nucleară), conducând la un microambiant antiinflamator și tolerogenic. Alte PAMPs promovează

dezvoltarea de celule dendritice imunogene, sugerând intervenția și a altor mecanisme, încă necunoscute, implicate în diferențierea celulelor dendritice spre tipul imunogen sau tolerogen.

- b. microambientul, de asemenea, pare să influențeze dezvoltarea de DC tolerogene și consecutiv de celule a.T reglatorii.

Direcționarea celulelor DC de către agenții bacterieni spre răspuns imunogenic sau tolerogenic poate avea o legătură importantă în ceea ce privește ipoteza igienei în bolile alergice, inclusiv astmul bronșic. Cunoașterea acestui mecanism ar fi extrem de util în dezvoltarea de noi terapii care să acționeze asupra celulelor dendritice (vezi figura 3).

## Implicarea limfocitelor T reglatorii în patologie

Tot mai multe studii atrag atenția asupra posibilei implicări a limfocitelor T reglatorii în astmul bronșic și imunoterapia alergică (1,10).

Astfel, Bellinghausen și Ling (4,6) și colaboratorii au concluzionat că celulele n.T reg. și celulele a. T reg. au rol important în prevenția sensibilizării alergice și a bolilor alergice, inclusiv astmul bronșic. Celulele a. T. reg pot oferi noi posibilități pentru dezvoltarea de noi strategii terapeutice.

De asemenea, Akdis (1,2) și colaboratorii au demonstrat pentru prima dată în 1998 rolul IL-10 și al celulelor Tr1 precum și efectele benefice ale imunoterapiei alergice la pacienții alergici la venin de albină. Mecanismul prin care limfocitele adaptative T reglatorii sunt stimulate de imunoterapie nu este suficient cunoscut în prezent (10).

În concluzie, este clar că celulele T reglatoare pot oferi explicații pentru multe din observațiile clinice și experimentale ce nu pot fi explicate în contextul imbalanței dintre celulele Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>. Deși încă nu au fost analizate extensiv, datele arată că celulele T reglatoare interferă cu astmul bronșic și

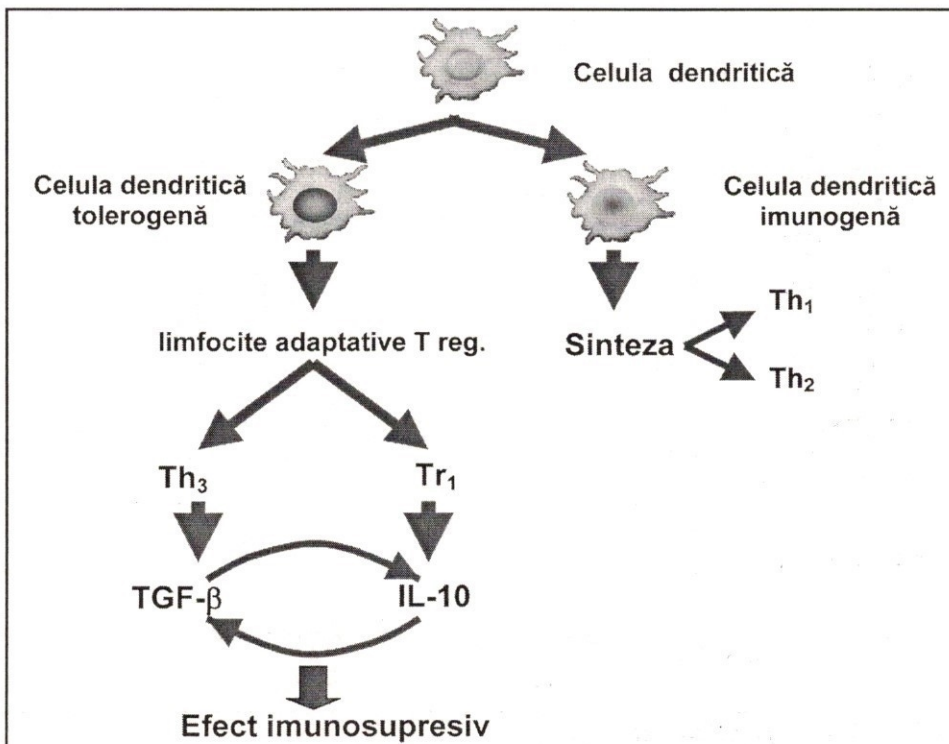


Fig. 2

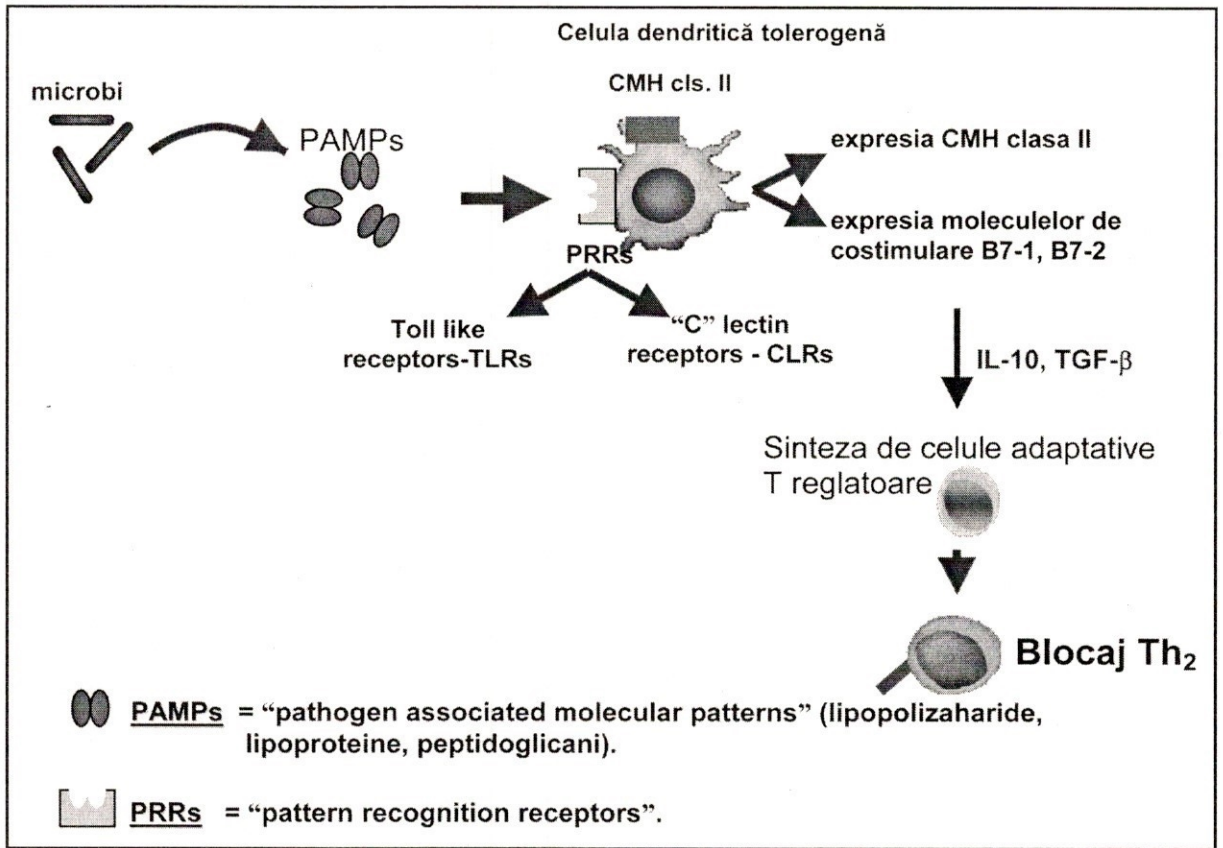


Fig. 3

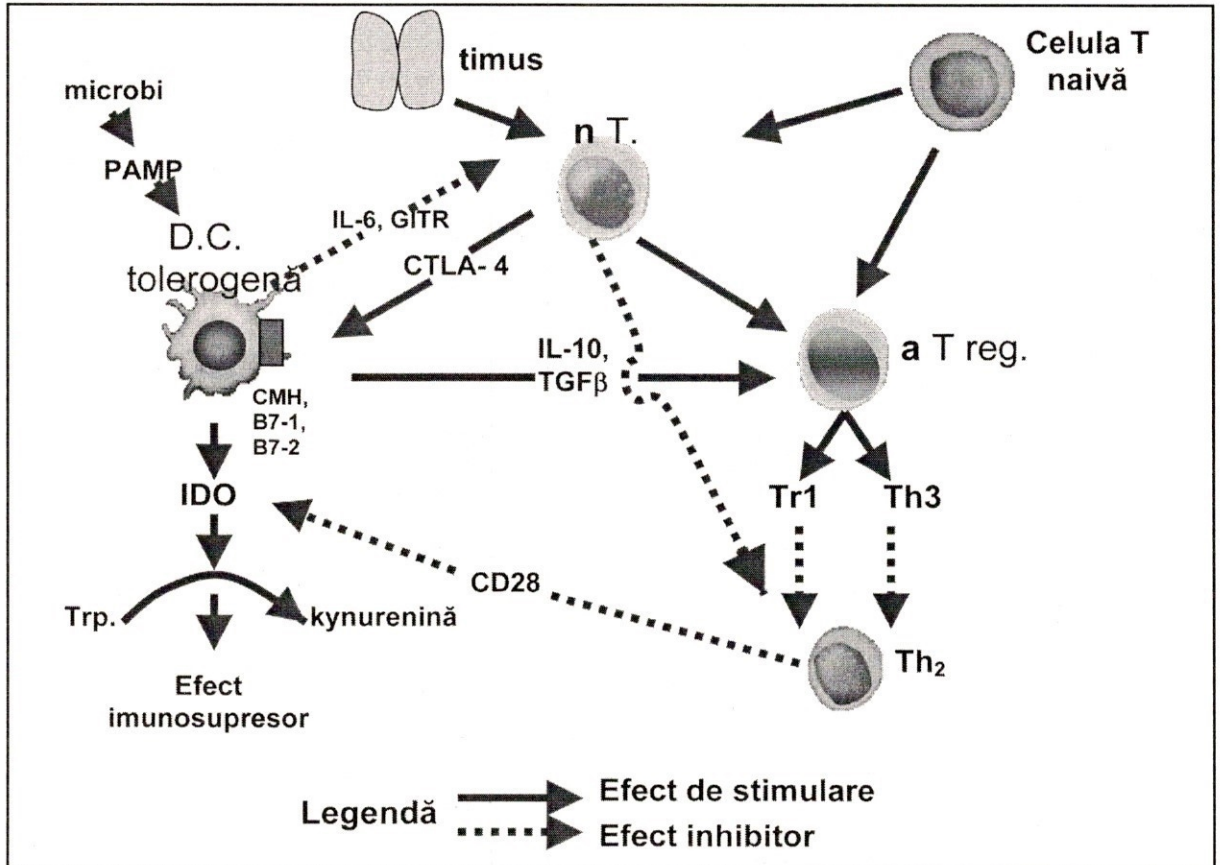


Fig. 4 - Schemă recapitulativă

alte boli alergice în diverse etape, cum ar fi sensibilizarea alergică, persistența și severitatea bolii. Producții microbiene pot „învăța” celulele dendritice să devină tolerogene sau imunogene și astfel, să inducă celule T reglatoare protective sau celule  $Th_1/Th_2$  inductoare de boală. La baza acestor mecanisme complexe între răspunsurile imune adaptative și înnăscute stă background-ul genetic (vezi figura 4 - schema recapitulativă).

Sinteza *ex vivo* și expansiunea de celule T reglatoare urmate de transferul autolog sunt metode aflate în prezent în studiu pentru terapia bolilor autoimune sau a rejetului de transplant. Când aceste terapii vor conduce la rezultate benefice pe termen lung, atunci va fi utilă aplicarea lor și în terapia astmului alergic, în special pentru acei pacienți la care terapia standard este ineficientă (9).

Noi strategii terapeutice se dezvoltă în paralel cu completarea cunoștințelor despre mecanismele patogenice ce intervin în astmul bronșic.

Cercetătorii încearcă să descopere noi ținte terapeutice pe baza cărora să fie inițiate noi strategii terapeutice. Astfel, odată cu realizarea sensibilizării primare a mastocitelor și bazofilelor, în inflamația alergică mai intervin și alte etape, respectiv reacția inflamatorie precoce și tardivă și, în final, remodelarea bronșică. Deoarece în această ultimă etapă reversibilitatea la terapia bronhodilatatoare și eficiența terapiei sunt limitate, strategiile terapeutice s-au concentrat asupra fazelor precoce și tardivă a reacției inflamatorii. În inițierea și promovarea inflamației intervine un număr semnificativ de celule aflate într-o strânsă interdependență, iar recrutarea acestor celule depinde de intervenția unor molecule (citokine) cu rol chemotactic (chemokine). Astfel, eforturile cercetătorilor au fost direcționate în vederea anulării efectelor chemokinelor, intervenindu-se la multiple niveluri: blocajul receptorilor și, nu în ultimul rând, blocarea sintezei chemokinelor. Cum citokinele sunt proteine a căror sinteză este codificată de gene specifice, studiile au fost dirijate, prin tehnici cito-genetice și de biologie moleculară, în direcția blocării transcripției, translației și a stabilității m-ARN-ului specific chemokinelor (5).

O genă structurală (ce codifică sinteza de proteine) este constituită din nucleotide organizate sub forma intronilor (material genetic necodant) și a exonilor (aceștia conțin material genetic codant). Gena propriu-zisă este flancată de

alte 2 secvențe de control și reglare ce nu vor participa la procesul de transcripție: un „promoter” la capătul 5' al genei și un „terminator” la extremitatea 3' a genei. La nivelul promotorului se va fixa transcriptaza ce va iniția transcripția. Stoparea transcripției va fi semnalizată de terminator plasat în aval de genă. Expresia genei este controlată de secvențe amplificatoare sau repressoare (numite „silencers”). Secvențele amplificatoare numite „enhancer” pot activa transcripția, enhancerul reprezentând în același timp locusul pe care acționează suplimentar și factorii de transcripție. Transcripția se derulează în direcția 5' - 3' și rezultă mARN-ul primar ce conține pentru început atât secvențele codante cât și cele noncodante. Mai departe, intronii vor fi excizați, exonii restanți se sudează și rezultă mARN-ul matur.

Transcripția este urmată de procesul de translație în cursul căruia mARN-ul ajunge în citoplasmă la nivelul ribozomilor unde se derulează sinteza proteică (în derularea translației intervin moleculele de t-ARN, r-ARN și m-ARN). Orice proteină se sintetizează după acest model. Practic, transcripția asigură corespondența strictă dintre secvența de nucleotide aparținând genei și înșiruirea aminoacizilor din proteina codificată de genă.

Revenind la chemokine (CK), este limpede că alterarea expresiei sau funcției acestora poate conduce la persistența inflamației mult peste durata firească, creându-se premiza inflamației cronice.

Până în prezent au fost identificate și clonate peste 20 de receptori și peste 40 chemokine (5), grupate în 4 subclase: subclasa CC ( $\beta$ ), CXC ( $\alpha$ ), subclasa C ( $\gamma$ ) și CX3C. De exemplu, în astmul bronșic unde există un influx masiv de eozinofile, bazofile și celule  $Th_2$ , se observă o intensificare a funcției CK din subclasa  $\beta$ : CCL-2, CCL-13, CCL-5, CCL-11 (eotaxina 1), CCL-24 (eotaxina 2), CCL-26 (eotaxina 3) etc. În particular (3), stimularea expresiei eotaxinei-1 (CCL-11) eliberate de la nivelul epiteliului respirator lezat induce la nivelul căilor respiratorii infiltrația eozinofilică, proces mediat prin intermediul receptorului specific (CCR3) de la nivelul eozinofilelor. Se realizează un aflux masiv de eozinofile la nivelul căilor respiratorii (vezi figura 5).

De fapt, în astm se crează multiple circuite cu eliberare de citokine și chemokine ce se autoîntrețin și contribuie la perpetuarea inflamației bronșice.

Reglarea post-transcripțională a expresiei genice este un

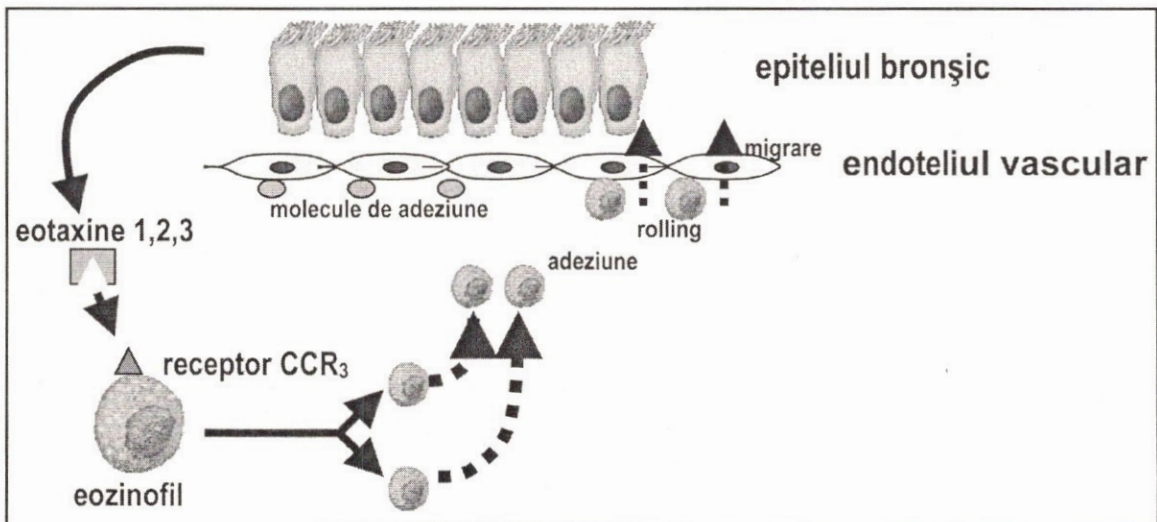


Fig. 5

mecanism celular adaptativ eficient pentru celulă ca răspuns la o varietate de perturbări celulare (stress, proliferare sau activare imună). Rolul important al reglării post-transcripționale în expresia genică a fost demonstrat de un studiu recent care a arătat că ~ 50% din genele induse de stress au fost reglate în special prin intervenția asupra stabilității m-ARN-lui (9,10). Stabilitatea / labilitatea m-ARN-lui vor influența, deci, semnificativ sinteza proteică. Molecula de m-ARN trece prin diverse stadii după sinteza sa: transport, localizare subcelulară, stabilitate și translație, etape reglate de o serie de molecule, dintre care menționăm așa-numitele AREs („adenylate-uridylylate-rich elements”) (5). Acestea conțin secvențe UTR (untranslated region) de m-ARN și au fost mult studiate, deoarece intervin în procesul de transcripție a citokinelor și chemokinelor. Mai mult, moleculele AREs intervin în reglarea translației și în controlul stabilității m-ARN-lui, influențând degradarea acestuia. Astfel, studii efectuate pe rozătoare au confirmat că deleția moleculei AREs specifice genei  $\alpha$ TNF va induce creșterea sintezei de TNF secundar diminuării ratei de degradare a m-ARN-lui specific TNF. Au fost identificate proteine ce leagă moleculele AREs și intervin în exportul nuclear, în localizarea subcelulară, în degradarea și translația m-ARN-lui matur. În consecință, alterarea expresiei și funcției AREs ar condiționa anumite afecțiuni (inclusiv neoplazii), deoarece AREs intervin în expresia genelor ce codifică factori de creștere, protooncogene, citokine sau chemokine, menținându-le în stare inactivă (prin accelerarea degradării m-ARN-lui specific acestor molecule sau inhibarea translației, conducând la blocarea transcripției). Așa se explică asocierea bolii canceroase și altor afecțiuni cu neutralizarea mecanismelor coordonate de AREs de blocare a transcripției. În bolile inflamatorii și alergice este dovedită alterarea degradării m-ARN-lui proteinelor (inclusiv a chemokinelor), conducând la stabilizarea aberantă a acestuia cu producție susținută de proteine inflamatorii și inflamație cronică. În același context, au fost descoperiți stimuli ce cresc stabilitatea sau cresc rata degradării m-ARN-lui (vezi tabelul 1) (5,8,11).

O multitudine de studii sunt în derulare și au ca scop analiza turnoverului m-ARN-lui, insistând asupra timpului de înjumătățire al m-ARN-lui și pe factorii ce influențează într-un sens sau altul degradarea acestuia.

Reglarea posttranscripțională a chemokinelor poate fi „ținta” atât a factorilor proinflamatori, cât și a moleculelor anti-inflamatorii (8). Din prima categorie au fost studiate IL-4 și  $\alpha$ -TNF care, în conformitate cu studiile efectuate privind sinteza eotaxinei, stimulează selecția intracelulară a unei proteine (ex: HuR) ce se va lega de m-ARN și va conduce la amplificarea stabilității m-ARN specific chemokinei

CCL11 (respectiv eotaxina) (3). În opoziție cu mecanismul menționat anterior, alte studii au analizat efectele moleculelor anti-inflamatorii (corticosteroizii și IL-10) în reglarea post-transcripțională. Astfel, s-a demonstrat că, prin intermediul secvențelor tip AREs, corticosteroizii reduc timpul de înjumătățire a m-ARN-lui chemokinic, diminuând stabilitatea și favorizând degradarea acestuia. Consecința va fi reducerea sintezei de eotaxină la nivelul celulelor epitelului respirator (7). Procesele imune și inflamatorii sunt diminuate, de asemenea, de anumite molecule imunomodulatoare endogene cum ar fi IL-10, care este sintetizată sub influența celulei T reglatoare CD<sub>4</sub><sup>+</sup> și care reduce expresia genică de la nivelul macrofagelor (12). Dintre efectele post-transcripționale ale IL-10 amintim reducerea stabilității m-ARN din monocite (la șoareci și oameni) și a m-ARN-lui chemokinelor derivate din macrofage (IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , chemokine stimulate de componente ale matricii extracelulare sau de lipopolizaharidele bacteriene) (5,12).

Studii recente au relevat activarea și amplificarea expresiei proteinei HuR în diferite tipuri de cancer (11). În aceste cazuri, proteina a intervenit în reglarea post-transcripțională în sensul stimulării angiogenezei și eliberării factorilor de creștere. Răspunsurile imune și inflamația sunt caracterizate, de asemenea, prin proliferare și procese de remodelare incluzând angiogeneza. Deci, stabilizarea aberantă a m-ARN-lui specific genelor proinflamatorii contribuie la sinteză susținută de proteine cu efect inflamator și implicit la cronicizarea inflamației. De fapt, proteinele legate de m-ARN ce „gouvernează” această etapă (exemplu HuR) nu mai acționează de o manieră tranzitorie, ci rămâne constant activată.

Se pare că în viitor, studiile se vor concentra asupra modalităților de alterare a expresiei proteinelor legate de m-ARN și a căilor de transmitere a semnalelor în timpul proceselor inflamatorii (inclusiv alergice). Studiile se vor axa și pe modificarea timpului de viață sau a procesului de translație a m-ARN-lui țintă.

Deci, amplitudinea reacției inflamatorii poate fi intens modificată de mecanismele reglatorii post-transcripționale ce influențează nivelul genelor considerate „cheie” în declanșarea și promovarea inflamației (inclusiv genele ce codifică sinteza chemokinelor).

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Blaser K – Role of interleukin 10 in specific immunotherapy, J.Clin. Invest 1998; 102: 98-106.

**Tabel 1**

Chemokine	Stimuli	
	Cresc stabilitatea m-ARN-lui	Cresc rata degradării m-ARN-lui
IL- 8 (11)	IL-1, , hipoxie, adenovirus	IL- 4, IL- 10, glucocorticoizi
MCP- 1 (factor chemotactic pentru monocite)	hiperoxie, IL-1, lipopolizaharide	hipoxie, glucocorticoizi
MIP- 1 $\alpha$ (proteina inflamatorie macrofagică)	lipopolizaharide	IL- 10
MIP- 1 $\beta$	lipopolizaharide	IL- 10
RANTES	virus sincițial respirator	
Eotaxina	$\alpha$ - TNF, $\gamma$ - IFN, IL- 4	glucocorticoizi
MCP- 4		glucocorticoizi

2. **Akdis CA, Blaser K.** Mechanisms of interleukin 10 mediated immune suppression, *Immunology* 2001; 103: 131-136.

3. **Atasoy U, Curry SL, Lopez de Silanes I,** Regulation of eotaxin gene expression by TNF and IL-4 through messenger RNA stabilization: involvement of RNA-binding protein HuR; *J. Immunology* 2003; 171: 4369-4378.

4. **Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J** Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and Th2 cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111: 862-868.

5. **Fan J, Heller NM, Gorospe M, Atasoy U, Stelatto C** – The role of post-transcriptional regulation in chemokine gene expression in inflammation and allergy; *Eur. Resp. J* 2005; 26: 933 – 947.

6. **Ling EM, Smith T, Nguyen XD,** Relation of the CD4+CD25+ regulatory T-cells suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363: 608-615.

7. **Stelatto C** – Post-transcriptional and non-genomic

effects of glucocorticoids, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004; 1: 255-263.

8. **Stoeckle MY, Guan L** – High resolution analysis of *gro alpha* mRNA shortening: regulation by interleukin 1 beta; *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1613-1617.

9. **Van Oosterhout AJM, Bloksma** – Regulatory T-lymphocytes in asthma, *N Eur. Resp. Journal* 2005; 26: 918-932.

10. **Van Oosterhout AJM, Vanesch B, Hofman G.** – Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a murine model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998; 19: 622-628.

11. **Xu L, Xie K, Mukaida N, Matsushima K, Fidler IJ** – Hypoxia-induced elevation in IL-8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 1999; 59: 5822-5829.

12. **Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM** – Interleukin 10 inhibits interleukin 8 production in human neutrophils; *Blood* 1994; 83: 537-542.