

Rolul microRNA în sepsis. Noi actori în scenariul toleranței la endotoxină

D.E. Gîză¹, C. Vasilescu²

¹UMF Carol Davila, București

²Institutul de Boli Digestive și Transplant Hepatic Fundeni, București

Rezumat

MicroRNA sunt fragmente de ARN non-codant, bine caracterizate și bine conservate de-a lungul evoluției speciilor, al căror rol esențial constă în reglarea expresiei genetice. Ele își exercită acțiunea asupra ARN mesager ("target"). MicroRNA determină degradarea sau represiia translației, cu o scădere importantă a cantității și a activității proteinelor și sunt implicate în procese celulare esențiale în funcționarea normală a celulei. Niveluri anormale ale microRNA s-au întâlnit în cancer, boli autoimune, infecții virale, sepsis. Sepsisul apare ca urmare a unui răspuns inflamator inadecvat la o agresiune bacteriană sistemică. El rămâne o patologie cu o incidență și o mortalitate crescute în ciuda evoluției tehnicilor de diagnostic și tratament. La pacienții cu sepsis s-au întâlnit caracteristici asemănătoare cu cele ale fenomenului de toleranță la endotoxină. Datorită rolului important în represiia translației genelor unor citokine pro-inflamatorii, microRNA pot fi considerate un nou mecanism al toleranței la endotoxină, respectiv un nou mecanism implicat în patogeniza sepsisului. La bolnavii cu sepsis s-au găsit niveluri anormale ale următoarelor tipuri de microRNA: miR-146, miR-155, miR-150, miR-132. Actualmente se desfășoară studii pentru a identifica microRNA care pot fi utilizate ca biomarkeri în sepsis.

Cuvinte cheie: microRNA, target, toleranță la endotoxină, TNF- α , sepsis, mediatori

Abstract

MicroRNA's role in sepsis and endotoxin tolerance. More players on the stage

MicroRNAs are non-coding RNA fragments, well characterized and well preserved along the evolution of the species and whose essential role is to regulate gene expression. MicroRNAs perform its action on messenger RNA ("target"). They induce degradation or repression of target translation with a significant decrease in the quantity and the activity of proteins. MicroRNAs are involved in normal cell function. Abnormal levels of microRNA were found in several pathological conditions such as cancer, autoimmune diseases, viral infections, sepsis. Sepsis appears as a result of an improper inflammatory response after systemic bacterial infection. It remains a disease with a high incidence and mortality despite the evolution of diagnostic and treatment techniques. Sepsis patients have similar features to those found in the endotoxin tolerance phenomenon. Endotoxin tolerance is a state of hyporesponsiveness to endotoxin challenge induced by a prior exposure. Due to its important role in repression of the pro-inflammatory cytokines translation, microRNA can be considered a new mechanism of endotoxin tolerance and a new mechanism involved in sepsis pathogenesis. In sepsis patients abnormal levels of the following types of microRNA were found: miR-146, miR-155, miR-150, miR-132. Further studies are carried out to demonstrate the potential role of microRNA as biomarkers in sepsis.

Key words: microRNA, target, endotoxin tolerance, TNF- α , sepsis, mediators

Correspondență: Conf. Dr. Cătălin Vasilescu
Clinica Chirurgie Generală, Institutul de Boli
Digestive și Transplant Hepatic Fundeni,
București
E-mail: catvasilescu@gmail.com

MicroRNA - aspecte generale

Sepsisul constituie o preocupare pentru chirurghi din două motive. Pe de o parte, chirurgia poate genera prin complicațiile sale sepsis. Pe de altă parte, multe forme de sepsis, mai ales cel abdominal au chirurgia ca piesă centrală a arsenalului terapeutic. De progresele biologiei moleculare și geneticii sunt legate speranțe de ameliorare a prognosticului vital al pacienților septici. O apariție recentă în complexa rețea a sepsisului este o formă specială de material genetic non-codant, așa numitele microRNA.

MicroRNA sunt fragmente de ARN non-codant, recent descoperite, cu o lungime de 20- 22 de nucleotide. Rolul lor constă în reglarea post-transcripțională a expresiei genelor prin degradarea sau represiia translației unor tipuri specifice de ARNmesager ("target"). Importanța microRNA-urilor în reglarea funcțiilor celulare normale a devenit mai clară odată cu descoperirea și studierea mai multor tipuri de microRNA, respectiv a targetului lor, ARN mesager. Rolul exact al rețelei de microRNA precum și rolul individual al fiecărui microRNA în cadrul proceselor celulare se află în continuare în studiu (1).

Dovezi recente indică faptul că reglarea expresiei genetice prin intermediul microRNA joacă un rol foarte important în procese celulare precum apoptoza, diferențierea și ciclul celular. MicroRNA sunt implicate în reglarea funcțiilor imunologice, a răspunsului imun înăscut ("innate immunity") și a răspunsului imun dobândit ("acquired immunity"), în dezvoltarea și diferențierea celulelor imune și în prevenirea autoimunității (2,3).

MicroRNA sunt una din cele mai bine caracterizate categorii de ARN non-codante (ncRNA), adică ARN care nu pot fi transformate în proteine. Ele sunt implicate în dezvoltarea organismelor (plante, insecte, nematode, fungi, virusuri, inclusiv organismul uman unde modulează până la o treime din genele ce alcătuiesc genomul uman).

Primul microRNA, microRNA lin-4, a fost descoperit în 1993 de către Victor Ambros, Rosalind Lee și Rhonda Feinbaum în timpul unui studiu efectuat pe *Caenorhabditis elegans*. Rolul său este acela de a controla tranziția de la stadiul de larvă la stadiul de adult prin inhibiția specifică a translației ARN mesager lin-14 în proteina lin-14, esențială în acest proces de dezvoltare (4). Curând după acest eveniment, au fost descoperite mii de microRNA, foarte bine conservate de-a lungul evoluției speciilor eucariote și care îndeplinesc un rol important în reglarea negativă a expresiei genetice.

Biogeneza și maturarea moleculelor de microRNA

MicroRNA sunt inițial transcrise din genom cu ajutorul unei RNA polimeraze II care se leagă de promoterul¹ genei microRNA. Promoterul se află în proximitatea secvenței de ADN ce urmează a fi de-codată. Transcriptul rezultat conține sute sau mii de nucleotide și se numește microRNA primar sau

pri-microRNA (Fig. 1).

Maturarea pri-microRNA presupune acțiunea a două ribonucleaze III: Drosha și Dicer. Prima ribonuclează, Drosha împreună cu partenerul său, proteina Pasha sau DGCR8 (diGeorge critical syndrome gene-region 8) sunt localizate la nivelul nucleului. Ele procesează microRNA primar într-un precursor de aproximativ 70 de nucleotide al microRNA denumit pre-microRNA. Acest pre-micro-RNA este apoi transportat din nucleu în citoplasmă cu ajutorul unei proteine membre a familiei karyopherin, proteina Exportin 5/RanGTP, care recunoaște specific moleculele de pre-microRNA. Transportul în citoplasmă mediat de proteina Exportin5 este dependent de energie și se realizează prin legarea unei grupări de GTP. Ajuns în citoplasmă, pre-microRNA este apoi clivat de către cea de a doua endoribonuclează, Dicer împreună cu partenerul său, proteina TRBP (trans-activator RNA binding protein) într-o secvență de aproximativ 20 de nucleotide, un dublu helix ce reprezintă practic forma finală a microRNA. Doar una din componentele acestui dublu helix, componenta numită "guide strand" va fi selecționată pentru a parcurge mai departe procesul. Celalaltă componentă poartă denumirea de componentă pasager și este ulterior degradată (5).

Următoarea etapă este reprezentată de introducerea componentei "guide strand" în RISC (RNA-induced silencing complex), un complex de multiproteine care ajută la recunoașterea secvenței de ARN mesager complementară secvenței de microRNA și ulterior degradarea sau represiia translației. Recunoașterea și complementaritatea imperfectă dintre cele două molecule (ARN-ul mesager și microRNA) are loc între regiunea 3'UTR ("untranslated region") a ARN mesager și o secvență de 7 nucleotide a microRNA denumită regiune sămânță ("seed region"). Un ARN mesager prezintă mai multe site-uri de legare a microRNA. Studiile dezvoltate pentru precizarea secvențelor de ARN mesager complementar microRNA implicate în acest proces de reglare a expresiei genetice, au relevat faptul că 20-30% din proteinele codificate de gene reprezintă targeturi pentru microRNA (5).

Proteinele Argonaute sunt elemente cheie ale complexului RISC și au activitate de endonucleaze îndreptate împotriva complexului format din ARN-ului mesager cuplat cu secvență de microARN. Rezultă practic o scădere substanțială de proteine translatate și o scădere a activității lor (5).

Un alt mecanism prin care microRNA pot determina scăderea calitativă și cantitativă a sintezei unei proteine este reprezentat de distrugerea rapidă a targetului de ARN mesager prin de-adenilare. Prin promovarea de-adenilării se întrerupe interacțiunea dintre capetele 5' -3' a moleculei de ARN, ceea ce duce la represiia inițierii translației. De-adenilarea și represiia translației sunt două mecanisme care acționează însă independent și pot funcționa ca mecanism alternativ de siguranță în condițiile în care unul din ele nu inhibă eficient translația (6,7).

Numeroase procedee tehnice s-au dovedit a fi utile în detectarea microRNA. Cele mai des utilizate sunt Northern Blotting (care însă poate să nu fie foarte sensibilă în detectarea unor concentrații reduse de microRNA), PCR cantitativ în timp real și microarray (2).

¹Promoter - o regiune de reglare a ADN-ului situată înaintea unei gene, oferind un punct de control pentru transcrierea genei

Figura 1. Etapele biogenezei și maturării moleculelor de microRNA

Pri-microRNA: microRNA primar, rezultatul transcripției microRNA-urilor din genom cu ajutorul RNAPolimerazei II;

Pre-microRNA: precursor al microRNA-ului, rezultat în urma procesării pri-microRNA-ului de către endonucleaza Drosha;

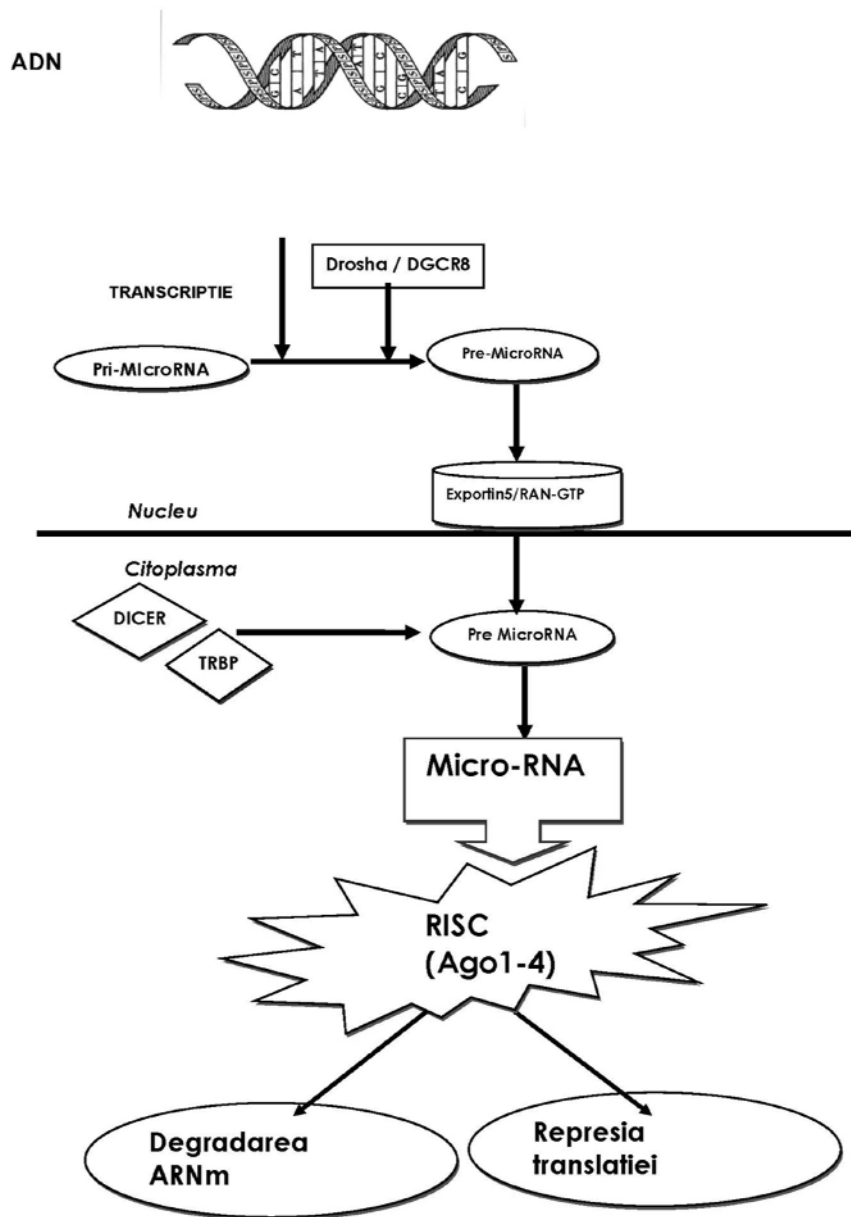
Drosha/DGCR8: ribonucleaza III care împreună cu proteina Pasha sau DGCR8 (diGeorge critical syndrome gene-region 8) procesează microRNA-ul primar în pre-microRNA;

Exportin5/RanGTP: proteină din familia karyopherin ce intervine în transportul pre-microRNA-ului din nucleu în citoplasmă;

Dicer/TRBP: endoribonuclează care împreună cu partenerul său TRBP (trans-activator RNA binding protein) acționează asupra pre-microRNA-ului, rezultatul constituie forma finală a microRNA-ului

RISC (RNA-induced silencing complex): un complex de multiproteine, ce conține proteinele Argonaute (AGO1-4) implicate în recunoașterea și degradarea secvenței de ARN mesager;

ARNm: ARN-ul mesager supus degradării sau represiei translației



Rolurile microRNA

În sistemul imun, microRNA intervin în diferențierea celulelor limfocitare B și în inducția, funcția și menținerea reglării liniei celulare limfocitare T. La nivelul celulelor dendritice și macrofagelor intervin prin intermediul receptorilor Toll-like și au rolul de a supresa funcția lor efectorie înainte de activarea lor sau de a urmări funcția lor după stimulare (1).

Studii recente au dovedit implicarea acestei clase de RNA non-codant în infecțiile virale. Unele microRNA protejează împotriva infecțiilor virale sau ajută sistemul imun în combaterea acestor infecții (exemplu: mir-32), altele microRNA sunt utilizate sau sintetizate de către virusuri pentru a contribui la menținerea latentă a infecției virale (virusul Epstein-Barr, citomegalovirusul - HCMV)(2).

Expresii modificate ale microRNA s-au întâlnit în unele tipuri de proliferare malignă, unde pot avea atât rol de oncogene (miR-21, miR-106 și miR-155), cât și de supresoare tumorale (let-7, miR15a/16, miR-34a și miR-143/145). Prima dovadă în acest sens a fost reprezentată de două tipuri de microRNA, miR15a/miR-16-1 ce reglează post-transcripțional factorul anti-apoptotic Bcl2. O expresie crescută a acestora este corelată cu moartea celulară programată întâlnită în cadrul leucemiilor limfocitare cronice.

Expresii crescute ale miR155 s-au găsit în cazul unor tumori solide precum tumorile de sân, de colon, de plămân dar și în limfoame Hodgkin sau limfoame cu celule B. Un alt microRNA, let-7 reglează negativ expresia oncogenei Ras, iar o exprimare scăzută a acestui microRNA este corelată cu un prognostic prost în cazul cancerului de plămân (2).

Unele microRNA sunt deja utilizate ca biomarkeri în cancere, iar altele sunt candidate pentru terapia genică a cancerului (8).

Recent a fost studiată implicarea microRNA în elaborarea răspunsului imun înăscut. În urma stimulării cu LPS a celulelor participante la elaborarea răspunsului imun înăscut, a monocitelor și macrofagelor, s-a înregistrat o creștere a expresiei unor tipuri de microRNA cum ar fi: miR-146a, miR-155, miR-125a, miR-9, miR-132 (9).

Toleranța la endotoxină - rolul său în sepsis

Imunitatea înăscută joacă un rol important în prima linie de apărare a organismului prin identificarea microorganismelor patogene de către receptorii de recunoaștere specifică de pe suprafața monocitelor, macrofagelor și celulelor dendritice. O clasă de receptori implicați în imunitatea înăscută, bine caracterizată și bine conservată de-a lungul evoluției speciilor este reprezentată de Receptorii TOLL-like (TLR). Semnalul indus de LPS prin intermediul receptorilor TLR4 duce la activare factorului de transcripție NF- κ B² și la producția de citokine inflamatorii precum TNF- α , IL-1 β și antiinflamatorii cum ar fi IL-10 (10).

Acest proces necesită o reglare fină pentru a preveni inflamația excesivă ce poate conduce la șoc endotoxinic, insuficiență de organ și în final la deces. Un mecanism de adaptare fiziopatologică și de apărare împotriva acestor inflamații excesive este reprezentată de toleranța la endotoxină. Celulele expuse repetat la concentrații scăzute de endotoxină intră într-o stare tranzitorie în care nu mai răspund la următoarele stimulări cu endotoxină, respectiv devin tolerante la endotoxină. Fenomenul a fost observat in vitro și in vivo atât la animalele de experiență cât și la oameni. Prima experiență a fost efectuată în 1946 de către Paul Beeson (11) care a observat că în urma injectării repetate zilnic cu LPS la iepuri s-a produs o scădere progresivă a răspunsului febril. Rolul principal al TNF- α în acest fenomen a fost apreciat abia în 1980, când a fost considerat cel mai bun marker al toleranței la endotoxină. Expresia acestui mediator a scăzut drastic la a doua stimulare cu LPS la animale, spre deosebire de răspunsul la prima stimulare (12).

Astfel, putem considera toleranța la endotoxină un fenomen exclusiv experimental care cuprinde trei etape:

1. prima etapă: stimularea cu LPS la care monocitele/macrofagele răspund prin eliberarea unor mari cantități de citokine pro-inflamatorii, spre exemplu TNF- α ;
2. a doua etapă: intervalul de timp până la cea de-a doua stimulare;
3. a treia etapă: stimularea repetată, la care răspunsul monocitelor/macrofagelor este cu o eliberare scăzută de citokine pro-inflamatorii, respectiv TNF- α .

Apariția acestui fenomen a fost raportată în diverse situații patologice ca sepsisul, pancreatita acută, intervențiile chirurgi-

cale majore, trauma.

Un exemplu relevant de toleranță la endotoxină s-a observat la nivelul leucocitelor pacienților cu sepsis. Sepsisul este consecința unui răspuns inflamator inadecvat al celulelor cu rol în imunitatea înăscută în urma unei infecții bacteriene sistemice. Sepsisul sever apare atunci când se produce insuficiența a cel puțin unui organ sau sistem iar șocul septic este asociat cu hipoperfuzia tisulară ce are drept consecințe clinice hipotensiunea refractară la resuscitarea volemică și insuficiență multiplă de organ. Fiziopatologia acestei boli nu este pe deplin înțeleasă, de aici și imposibilitatea cunoașterii și utilizării unui tratament eficace (13).

Complexitatea acestei boli constă în natura sa bi-fazică, caracterizată inițial de inflamație exagerată, urmată apoi de o fază de "imunosupresie", în care celulele se află într-o stare refractară, asemănătoare celei prezente în cadrul fenomenului de toleranță la endotoxină. Mai mult, monocitele izolate de la pacienții cu sepsis prezintă aceleași caracteristici întâlnite în cadrul fenomenului de toleranță la endotoxină: scăderea expresiei genelor citokinelor inflamatorii (TNF- α , IL-6, IL-2, IL-1 β), creșterea expresiei genelor citokinelor anti-inflamatorii (IL-10, TGF β), reducerea capacității de a prezenta antigenul datorită scăderii expresiei unor molecule MHC de clasa II, scăderea expresiei HLA-DR la monocite, cuplată cu o proliferare deficitară a liniei celulare limfocitare T precum și o scădere a producției de IFN γ (14).

Starea de toleranță la endotoxină în cadrul sepsisului se consideră a fi un mecanism de protecție împotriva șocului endotoxinic și ischemiei. Apariția sa este asociată cu un risc crescut de a dezvolta infecții secundare. Mortalitatea în sepsis datorată acestor infecții secundare este strâns corelată cu starea de imunosupresie dezvoltată în timpul toleranței la endotoxină (14).

În ciuda evoluției tehnicilor de diagnostic și tratament, incidența și mortalitatea prin sepsis au rămas crescute în ultimii 20 de ani. Diagnosticul și intervenția tardivă în această patologie sunt asociate cu un prognostic prost, cu insuficiență de organ și deces. Au fost efectuate multe studii pentru a identifica și a evalua biomarkerii ce apar în faze inițiale ale sepsisului. S-au studiat: proteinele de fază acută cum ar fi proteina C reactivă, citokine (IL-1, IL-6, IL-10 și TNF- α), chemokine (IL-8, MCP și G-CSF), procalcitonina. Determinarea lor nu s-a dovedit însă a fi specifică. Ele nu pot face diferența între sepsis și un alt răspuns inflamator sistemic cauzat de o patologie non-infecțioasă (13).

Implicația microRNA în sepsis

Este demonstrată implicarea microRNA în sepsis. În urma stimulării cu LPS a monocitelor, macrofagelor și celulelor dendritice s-au identificat următoarele tipuri de microRNA cu expresia modificată: miR-132, miR-146a, miR-223, miR-155, miR-150. S-au efectuat studii clinice ce au comparat expresia acestor microRNA la pacienții cu sepsis cu expresia lor la pacienții cu SIRS (răspuns inflamator sistemic la diverse agresiuni clinice severe), sau cu expresia lor la subiecți sănătoși (13).

²NK-KB: (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) este un complex de proteine care controlează transcripția AND-ului

Prin utilizarea tehnicii de PCR cantitativă în timp real s-au înregistrat niveluri semnificativ scăzute de miR-146a și miR-223 la pacienții cu sepsis comparativ cu celelate două categorii. Nivelul miR-146a este mult mai scăzut în sepsis comparativ cu nivelul normal al miR-146a la lotul de control. Dimpotrivă nivelul miR-223 este scăzut la pacienții cu sepsis dar nu la cei cu SIRS. MiR-223 poate deci distinge între sepsis și SIRS (13).

Expresia miR-146a este NF- κ B dependentă și reglează producția de citokine implicate în răspunsul imun înăscut precum IL-1 β și TNF- α . Receptorul asociat kinazei IL-1 (IRAK 1) și Receptorul TNF asociat factorului-6 (TRAF6), elemente cheie implicate în calea de semnalizare TLR4, au fost identificate ca target-uri ale miR-146a (9).

MiR-146a reglează negativ expresia TRAF6 și IRAK-1 și contribuie la controlul producției de TNF- α . Pentru a observa producția de TNF- α în vitro, A Nahid a stimulat cu LPS o linie celulară monocitară THP-1 și a urmărit kinetica producției de TNF- α (9). Stimularea s-a făcut cu doze progresiv mai mari de LPS (0, 10, 100, 1000ng/ml), înregistrarea producției de TNF- α s-a realizat cu ajutorul tehnicii ELISA iar determinarea cantitativă a expresiei miR-146a s-a realizat cu ajutorul tehnicii PCR cantitativ în timp real. TNF- α a început să crească la 2 ore după injectare, a atins un nivel maxim la 4 ore după stimulare, iar la 8 ore nivelul său a început să scadă gradual. Autorii au comparat modificarea cantitativă a expresiei miR-146a înregistrată la celulele stimulate cu LPS cu cea a celulelor nestimate. Expresia miR-146a în celulele stimulate cu LPS începe să crească după 4 ore și crește de aproximativ 7 ori în 8 ore, iar expresia sa continuă să crească de până la 35 de ori în 24 de ore, respectiv de 45 de ori în 48 de ore. Dimpotrivă, expresia TNF- α scade după 4 ore, realizând astfel o corelație negativă cu miR-146a. Expresia miR-155 și miR-132 au crescut doar de 4, respectiv de 10 ori în 12 ore de la stimularea cu LPS și după 24 de ore nu s-a mai înregistrat nici o altă creștere. De asemenea, s-a analizat cantitativ expresia target-urilor miR-146, a moleculelor IRAK-1 și TRAF6 și s-a înregistrat o creștere a expresiei lor în primele 2-4 ore, urmată de o scădere importantă la 8 ore, sincronizându-se astfel cu expresia crescută a miR-146 la 8 ore. Aceste date au confirmat ideea că IRAK-1 și TRAF6 sunt reglate negativ de miR-146 în răspunsul inflamator la stimularea cu LPS (9).

Pentru a înțelege rolul microRNA în cadrul fenomenului de toleranță la endotoxină, s-a realizat analiza microRNA-urilor la celulele THP-1³ normale și la celulele THP-1 tolerizate, pre-stimate cu LPS. După cum se aștepta, în celulele tolerizate nivelul miR-146a a crescut semnificativ, în timp ce expresia miR-155, miR-132 și miR-16 a crescut puțin sau deloc. Nahid și colaboratorii au comunicat (9) că celulele tolerizate își pierd din toleranță după 12 ore și răspund la stimularea cu LPS după 22 de ore. Aceste date au coincis cu analiza cantitativă a microRNA care a înregistrat o scădere a expresiei sale după 12

ore, în timp ce după 22 de ore nivelurile de miR-146a și TNF- α erau identice cu cele înregistrate dinaintea stimulării în vederea obținerii stării de toleranță la endotoxină.

Expresia miR-146a este crescută în celulele tolerizate și acționează ca un mecanism de prevenire a inflamației. Modularea nivelului de miR-146a ar putea fi folosită în intervenția terapeutică și protecția în sepsis (9).

Un alt microRNA implicat în răspunsul imun la stimulare cu LPS și în modelele de șoc endotoxinic este reprezentat de miR-155. Expresia sa poate fi indusă de stimuli bacterieni, virali, de un număr de liganzi TLR, de IFN- β și IFN- γ prin sistemul de semnalizare TNF- α autocrin/paracrin. Deoarece atât TNF- α cât și IFN- β sunt cunoscuți ca mediatori implicați în șocul endotoxinic, creșterea expresiei miR-155 poate fi întâlnită în fenomenul de toleranță la endotoxină sau sepsis. MiR-155 atenuează semnalizarea prin receptorii TLR4, având ca target IKK ϵ ⁴. La nivel transcripțional însă, miR-155 promovează translația TNF- α . Un alt microRNA, miR-125b are ca target regiunea 3' netraslată a transcriptului de TNF- α și produce astfel degradarea sa. Putem observa astfel un comportament diferit al acestor microRNA-uri în reglarea expresiei TNF- α în urma stimulării cu LPS: expresia miR-155 este crescută în urma stimulării, în timp ce expresia miR-125b este scăzută (15).

MiR-155 este implicat în reglarea răspunsului imun atât împotriva agenților bacterieni cât și a celor virali iar targeturile sale specifice sunt reprezentate de următoarele gene: FADD, Ikke, Ripk. MiR-155 are un rol important în răspunsul imun înăscut. El intervine însă și în funcționarea normală și răspunsul adecvat al limfocitelor B, al limfocitelor T și al celulelor dendritice (14).

Pe lângă miR-146 și miR-155 a fost identificat un nou set de microRNA-uri ca răspuns al monocitelor la solicitarea cu LPS: miR9, miR-187, miR-125a, miR-99b, let-7 e. Dintre aceste microRNA-uri, miR9 are ca target transcriptul⁵ NFkB1/p105/p50 și este implicat în reglarea negativă a procesului inflamator. MiR9 este exprimat atât la nivelul monocitelor cât și la nivelul neutrofilelor, iar expresia sa este indusă de citokine pro-inflamatorii cum ar fi IL-1 β , TNF- α . Gena nfkb1 codifică două tipuri de proteine (p50 și p150) ce au acțiuni diferite în urma stimulării cu LPS. P50 poate forma împreună cu alte subunități de NF- κ B heterodimeri, care pot funcționa ca activatori ai transcripției, sau homodimeri cu rol anti-inflamator prin atenuarea transcripției unor citokine pro-inflamatorii sau activarea expresiei IL-10, o citokină anti-inflamatorie. Expresii modificate ale p50 au fost întâlnite în cadrul fenomenului de toleranță la endotoxină, în diverse condiții patologice, în boli inflamatorii cronice și cancer. Analizând nivelul endogen al targetului miR9, s-a remarcat faptul că nivelul NFkB mRNA a crescut rapid și tranzitoriu în primele ore de la stimularea cu LPS, în timp ce cantitatea de proteină NFkB1/105 a rămas constantă până la 24 de ore. O supra-exprimare a miR9 la

³THP-1 - (Human acute monocytic leukemia cell line), o linie celulară promonocitară nediferențiată utilizată pentru depistarea leucemiei.

⁴Ikke - kinaza I κ B epsilon este un activator al NFkB

⁵Transcript - rezultatul procesului de creare a unei copii echivalente de ARN după o secvență de ADN

nivelul monocitelor s-a asociat cu scădere importantă a nivelului de NFkB1/p105. Pe baza acestor observații putem presupune că NFkB1 și miR9 sunt responsabili de o reglare fină a fluctuațiilor în expresia genelor, controlează sinteza factorilor transcripționali cheie și permite desfășurarea corectă a fazei proinflamatorii la stimularea cu LPS (16).

MicroRNA intervin în procesul de control al fenomenului de toleranță la endotoxină în faza târzie a inflamației. Expresii crescute ale miR155, miR146a și miR9 acționează ca o buclă negativă în faza tardivă a inflamației, inhibă calea de semnalizare TLR4 și promovează toleranța la endotoxină. Aceste microRNA-uri pot să acționeze asupra moleculelor de semnalizare TLR, reglând negativ acțiunea unor citokine proinflamatorii sau pot influența pozitiv acțiunea altor reglatori negativi (14).

Concluzii și perspective

Toleranța la endotoxină este un fenomen dinamic, determinat de o continuă modificare a nivelului de mediatori circulanți (17).

Concentrația plasmatică scăzută a TNF- α la pacienții septici este probabil consecința unui fenomen similar toleranței la endotoxină, fenomen în care microRNA-urile pot juca un rol central. Fiziopatologia sepsisului constituie încă o temă de discuție. Incompleta înțelegere a fenomenelor fiziopatologice au drept consecință o mortalitate încă ridicată în sepsis. Dacă s-ar putea identifica unii markeri de diagnostic specifici ai patogenzei acestuia ar fi posibile noi abordări terapeutice. Se efectuează în continuare studii pentru a demonstra rolul acestor fragmente mici de ARN non-codant, microRNA, în diferențierea pacienților cu sepsis de pacienții sănătoși și pentru a determina dacă nivelurile plasmatiche de microRNA sunt corelate cu severitatea bolii.

Bibliografie

- Lu LF, Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology*. 2009;127(3):291-8.
- Pauley KM, Chan EK. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1143:226-39.
- Xie ZR, Yang HT, Liu WC, Hwang MJ. The role of microRNA in the delayed negative feedback regulation of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(3):722-6. Epub 2007 May 11.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
- Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*. 2009;284(27):17897-901. Epub 2009 Apr 1.
- Shyu AB, Wilkinson MF, van Hoof A. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J*. 2008;27(3):471-81.
- Zinovyev A, Morozova N, Nonne N, Barillot E, Harel-Bellan A, Gorban AN. Dynamical modeling of microRNA action on the protein translation process. *BMC Syst Biol*. 2010;4:13.
- Tong AW, Nemunaitis J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther*. 2008;15(6):341-55. Epub 2008 Mar 28.
- Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: implication in innate immunity. *J Biol Chem*. 2009 Dec 11;284(50):34590-9. Epub 2009 Oct 19.
- Sheedy FJ, O'Neill LA. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* 2008;67 Suppl 3:iii50-iii55.
- Beeson PB; With the Technical Assistance of Elizabeth Roberts. Tolerance to bacterial pyrogens: I. Factors influencing its development. *J Exp Med*. 1947;86(1):29-38.
- Vasilescu C, Olteanu M, Flondor P. How relevant are in vivo and in vitro studies for clinical sepsis? A mathematical model of LPS signaling based on endotoxin tolerance. *Chirurgia (Bucur)*. 2009;104(2):195-201.
- Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(1):184-8. Epub 2010 Feb 24.
- Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009;30(10):475-87. Epub 2009 Sep 24.
- Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*. 2007;179(8):5082-9. Comment in: *Gastroenterology*. 2008;134(5):1615-7.
- Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 31;106(13):5282-7. Epub 2009 Mar 16.
- Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M et al. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One*. 2009;4(10):e7405.