

Mechanizmy PAMP i DAMP w chorobach i uszkodzeniach tkanek

Agnieszka Kijewska

Gdański Uniwersytet Medyczny

Czym są PAMP i DAMP

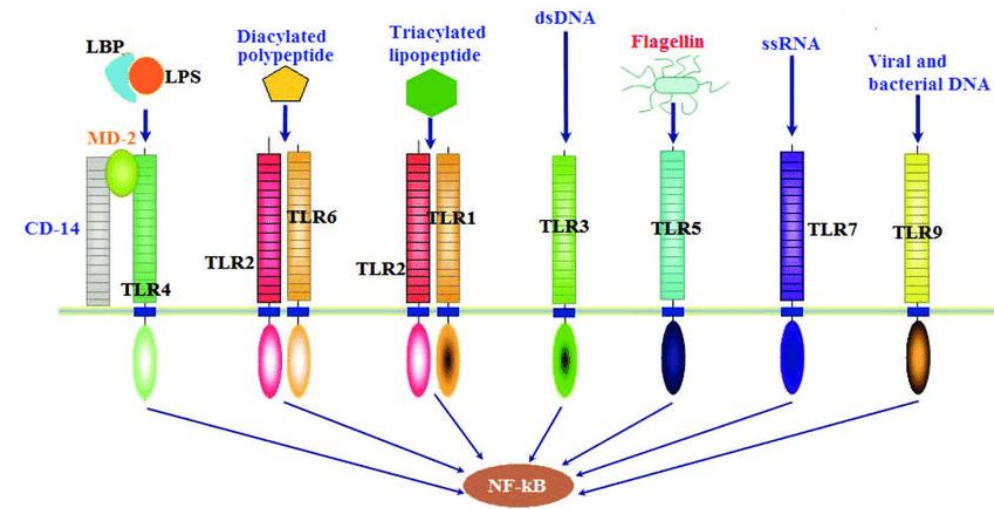
- Zapalenie wynika z bodźców sygnalizujących uszkodzenie lub infekcję.
- Odpowiedź zapalna może być korzystna lub szkodliwa w zależności od rodzaju i czasu trwania bodźców.
- Źródło, struktura i obfitość tych bodźców znacznie się różnią. Jedną z głównych kategorii stymulacji zapalnych są:
 - Wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP) które dostają się do komórki przez fagocytozę lub pory.
 - Wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMP) związane ze stresem komórkowym. Te wzorce znajdują się na ścianach komórkowych bakterii, DNA, lipoproteinach, węglowodanach lub innych strukturach
- Chociaż zidentyfikowano wiele DAMP i PAMP, stymulują one reakcje zapalne w sposób specyficzny dla kontekstu, pozostawiając miejsce na znacznie więcej badań nad ich mechanizmami sygnalizacji.

Różnice pomiędzy PAMP i DAMP

- PAMP są pozyskiwane z mikroorganizmów, a tym samym wywołują stan zapalny w odpowiedzi na infekcje
 - Jednymi z dobrze znanych PAMP są lipopolisacharydy (LPS), kwasy nukleinowe, polisacharydy (mannany) itp.
 - Profilina - substancja produkowana przez *Toxoplasma gondii* i rozpoznawana przez mysie TLRy - wpływa na zanik uczucia strachu przed drapieżnikiem
- DAMP pochodzą z komórek gospodarza, w tym komórek nowotworowych, martwych lub umierających komórek lub od produktów uwalnianych z komórek w odpowiedzi na sygnały, takie jak niedotlenienie.
 - Ponieważ pojawiają się one wskutek reakcji indukowanych przez sam organizm, DAMP wywołują tak zwane jałowe reakcje zapalne.
 - DAMP pojawiają się często wskutek urazu (np. złamania, zawału mięśnia sercowego, nowotworu, choroby autoimmunologicznej czy miażdżycy) generalnie wskutek uszkodzenia tkanek a nie infekcji patogenami

Receptory rozpoznawania wzorców: sygnalizacja PAMP i DAMP

- ▶ PAMP i DAMP wiążą się z receptorami rozpoznającymi określone wzorce. Receptory te to np.:
 - ▶ receptory Toll-like (TLR) - rodzina białek odgrywająca kluczową rolę w odpowiedzi odpornościowej nieswoistej (wrodzonej). Są to receptory błonowe należące do rodziny receptorów rozpoznających wzorce (PRR – **P**atterns **R**ecognition **R**eceptors).
 - ▶ Mimo ogólnego przyporządkowania do reakcji nieswoistych występują także na limfocytach T i B.
 - ▶ Występują a błonach komórkowych nabłonka, kardiomiocytów, keranocytów, śródbłonka naczyń i fibroblastów.
 - ▶ rozpoznają specyficzne struktury molekularne niewystępujące u kręgowców, a będące komponentami patogennych mikroorganizmów.
 - ▶ Aktywują NF- κ B i aktywują produkcję interferonów.
 - ▶ Stymulują reakcję nieswoistą przeciw patogenom i inicjują odpowiedź nabytą.



Receptory rozpoznawania wzorców: sygnalizacja PAMP i DAMP

- ▶ cytoplazmatyczne receptory podobne do NOD (NLRs - Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like receptors)
 - ▶ NLRy to wewnątrzkomórkowe czujniki wzorców molekularnych związanych z patogenami i z uszkodzeniami.
 - ▶ NLRy kooperują z TLRami i regulują reakcje zapalne oraz procesy apoptozy komórek
 - ▶ Są znajduwane na limfocytach, makrofagach czy komórkach dendrytycznych oraz na komórkach epitelialnych
 - ▶ Aktywują NF- κ B i w efekcie ekspresję cytokin zapalnych
 - ▶ Mutacje w NOD2 są powiązane z chorobą Leśniowskiego-Crohna

Receptory rozpoznawania wzorców: sygnalizacja PAMP i DAMP

- ▶ receptory indukowane kwasem retinowym podobne do genu I (RLRs - **RIG-Like Receptors**)
 - ▶ RLRy to helikazy rozpoznające sRNA i dsRNA, które znajdują się w cytoplazmie komórki - zwalczają paramyksowirusy (odra), ortomyskowirusy (grypa), pikornawirusy (polio, wzWA, rinowirusy - przeziębienia)
 - ▶ Inicjują nieswoistą obronę antywirusową
 - ▶ RLR inicjują uwalnianie interferonu typu I (IFN I) oraz III (cytokiny antywirusowe)
 - ▶ Aktywują JAK-STAT
 - ▶ łańcuch interakcji między białkami w komórce
 - ▶ bierze udział w procesach, takich jak odporność, podział komórki, śmierć komórki i tworzenie guza
- ▶ Wirusy grypy czy odry wyewoluowały mechanizmy obronne przeciw RLRom i blokują aktywację RIG-I

Receptory rozpoznawania wzorców: sygnalizacja PAMP i DAMP

▶ Alarminy

- ▶ struktury molekularne związane z uszkodzeniem
- ▶ endogenne cząsteczki uwalniane w następstwie uszkodzenia lub śmierci komórek
- ▶ cząsteczki te sygnalizując zagrożenie aktywują mechanizmy odporności nieswoistej za pomocą interakcji z receptorami rozpoznającymi wzorce (PRR).
- ▶ obecność cząsteczek DAMP inicjuje również mechanizmy naprawy uszkodzonych tkanek.

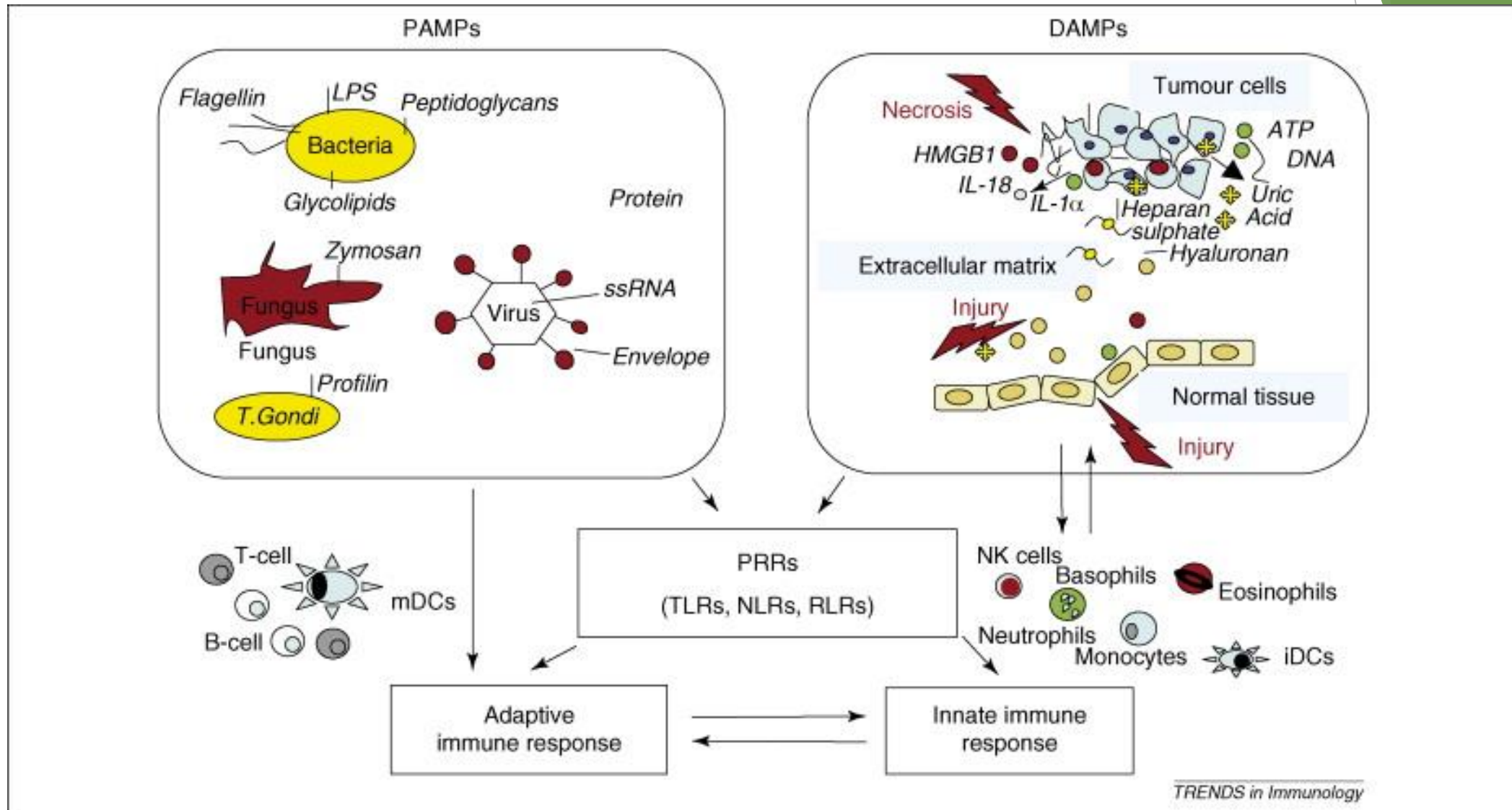
▶ Najlepiej poznane cząsteczki DAMP to:

- ▶ pozakomórkowe kwasy nukleinowe
- ▶ ATP
- ▶ białko HMGB1 (high-mobility group box 1)
- ▶ kryształy kwasu moczowego
- ▶ białka szoku cieplnego (HSP)
- ▶ mitochondria

Reakcje receptorów rozpoznawania wzorców są zależne od kontekstu

- ▶ Receptory rozpoznające wzorce są zdolne do rozpoznawania różnych wzorców molekularnych, które z kolei indukują odpowiedź zależną od receptora.
- ▶ Pojedynczy receptor rozpoznający wzorce może rozpoznawać wiele PAMP i DAMP, a mechanizmy strukturalne i molekularne pośredniczące w tym procesie są nadal badane.
- ▶ Jednoczesna sygnalizacja w tej samej komórce może modulować dalsze reakcje - w tym aktywność receptora rozpoznającego wzorce.
- ▶ Na przykład, cytokiny mogą stymulować przekazywanie sygnałów, które mogą być komplementarne, lub wzmacniać albo hamować szlaki sygnałowe receptora rozpoznającego wzorce.

Klasy cząsteczek, które inicjują wrodzoną i adaptacyjną odpowiedź immunologiczną.



Związki pomiędzy PAM i DAMP

- ▶ Istnieje coraz więcej dowodów na ścisły związek między stanem zapalnym a rakiem
- ▶ U podstaw zapalenia znajdują się zarówno wzorce molekularne związane z patogenem (PAMP), jak i wzorce molekularne związane z zagrożeniem (lub uszkodzeniem) (DAMP).
- ▶ Zakres partnerstwa PAMP-DAMP określa przebieg stanu zapalnego w przewidywalny sposób w „stylu zapalnym”:
 - ▶ PAMP i DAMP tworzą zestawy, które oddziałują ze sobą: w ten sposób LPS z bakterii Gram-ujemnych (PAMP) może wiązać się z dowolnym z kilku różnych DAMP, takich jak HMGB1, hsp70, hsp90, białko A i α -defensyn. Podobnie kwas lipotejchowy (PAMP) może wiązać się z fibronektyną osocza (DAMP).
 - ▶ Oczekuje się, że te interakcje wpływają na próg aktywacji, a także na przebieg odpowiedzi zapalnej.

Gdy ostry nadmiar TNF przekształca się w chroniczny śródmózgowy nadmiar TNF

When an acute excess of TNF extends to chronic intracerebral TNF

PAMP-initiated examples

- Long COVID-19
- Persistent Lyme Disease
- Influenza encephalopathy

Distinctive acute events

TNF-induced
Influenza-like acute
illness

Chronic neurological common events

In contrast to macrophages,
activated microglia are kept in
this TNF-generating state by
the excess TNF they produce.

DAMP-initiated examples

- Post-stroke syndromes
- Traumatic brain injury

DAMP effects of
hypoxia and trauma-
induced HMGB1 etc.
induce TNF release

Loss of ability to
taste and smell

Fatigue

Neurogenic
pain

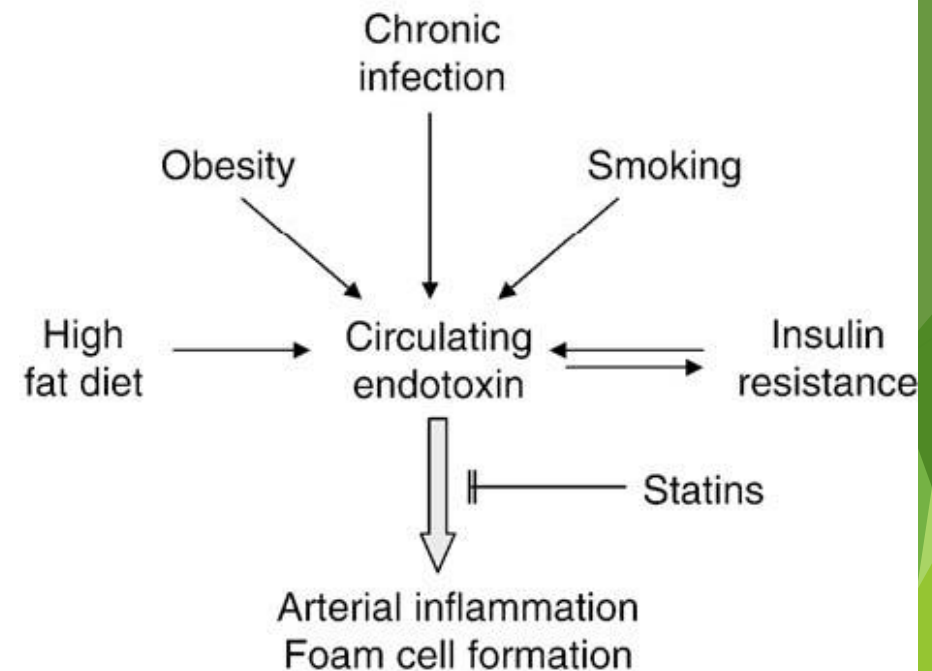
Aggressiveness and
suicidal tendencies

Delirium

Związki pomiędzy PAMP a chorobami

► Działanie PAMP ma wpływ na miażdżycę (Erridge 2007 doi:[10.1016/j.tcm.2007.12.003](https://doi.org/10.1016/j.tcm.2007.12.003))

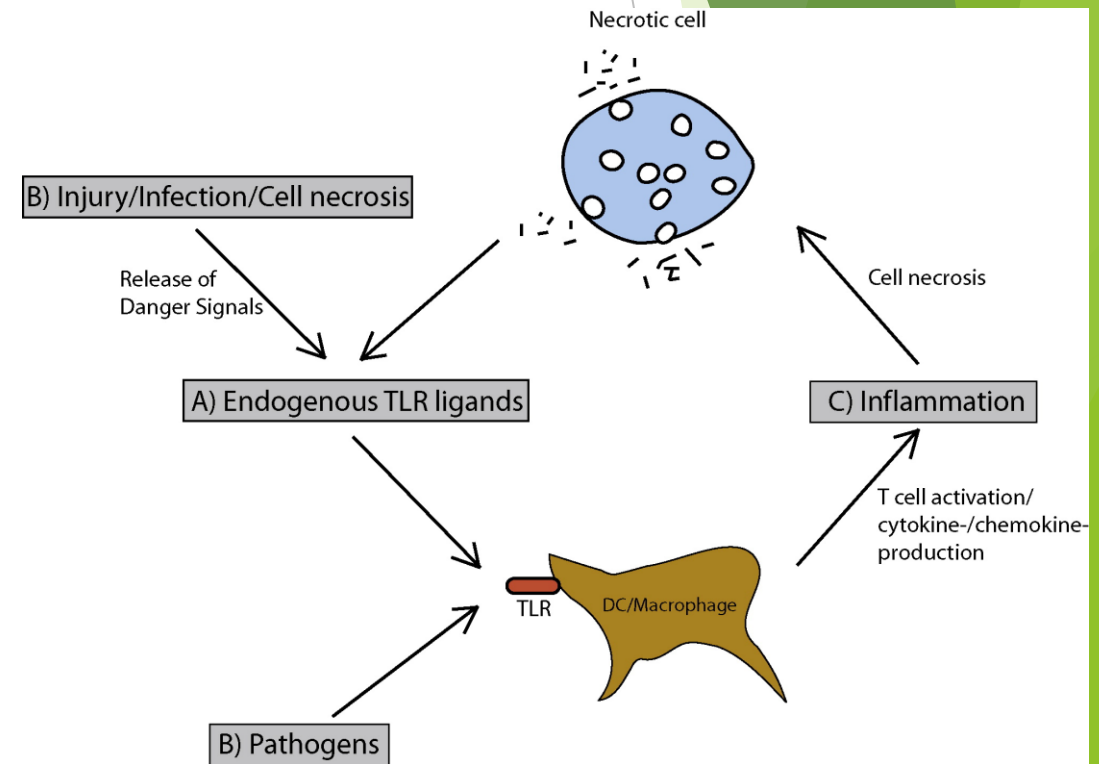
- Endotoksyna bakteryjna może przedostać się do krążenia w wyniku przewlekłej infekcji lub w wyniku upośledzenia funkcji bariery jelitowej spowodowanej otyłością, insulinoopornością lub dietą wysokotłuszczową.
- Wykazano, że indukowane endotoksyną zapalenie tętnic i tworzenie komórek piankowatych jest mediowane przez TLR4, ekspresję i przekazywanie sygnałów które, jak wykazano, są hamowane przez statyny.



Związki pomiędzy PAMP a chorobami

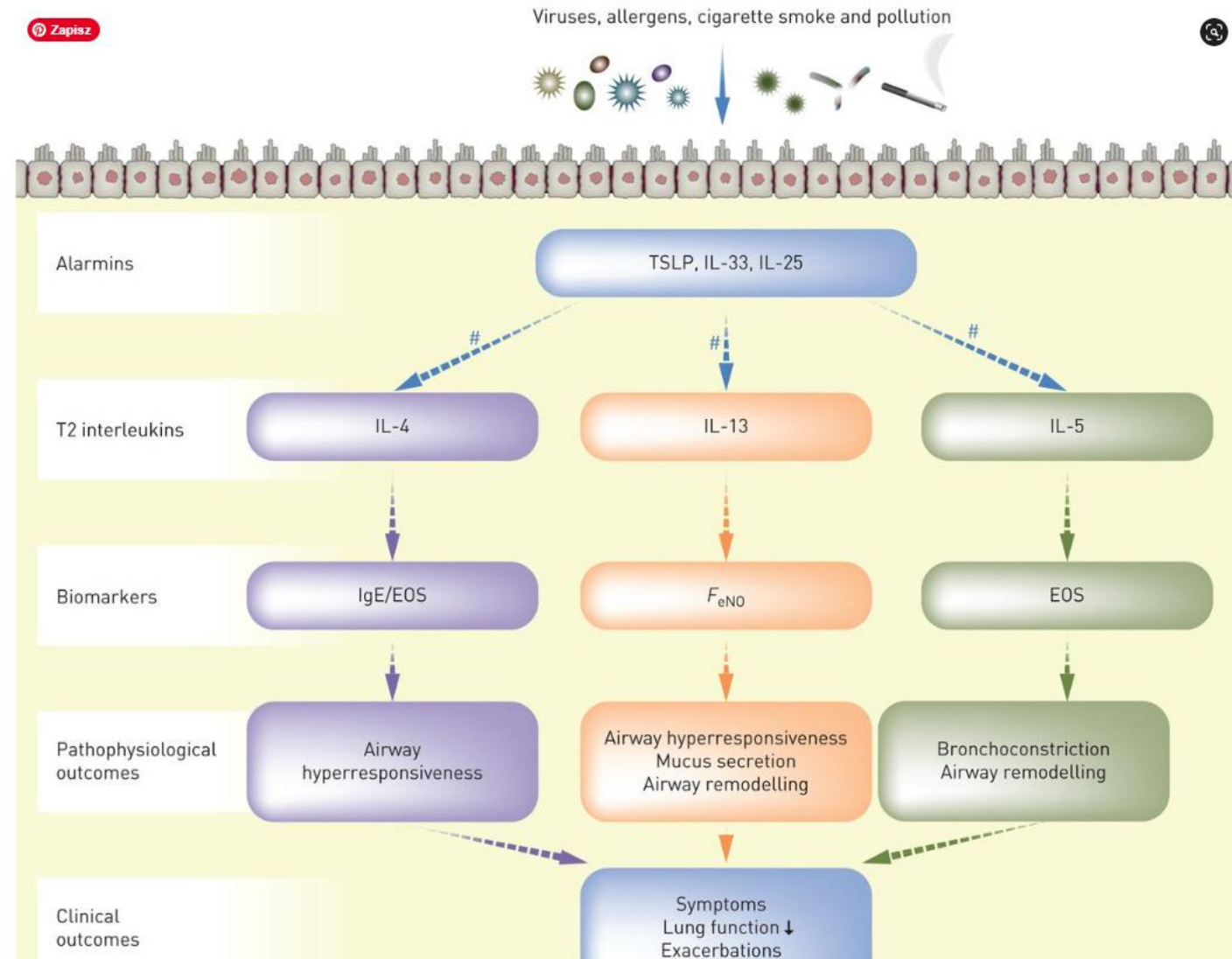
► Działanie mediatorów zapalnych na rozwój i progresję nowotworów

- Istnieją dowody na to, że zaangażowanie receptorów TLR jest jednym z mechanizmów, przez które komórki odpornościowe są stale aktywowane
- jest to podstawą wystąpienia szerokiej gamy chorób zapalnych, takich jak:
 - Toczeń
 - Astma
 - cukrzyca typu I
 - stwardnienie rozsiane
 - reumatyzm
- Co ciekawe, u tych pacjentów stwierdzono również podwyższone stężenia DAMP co sugeruje wzajemne oddziaływanie PAMP-DAMP.



Związki pomiędzy PAMP a chorobami

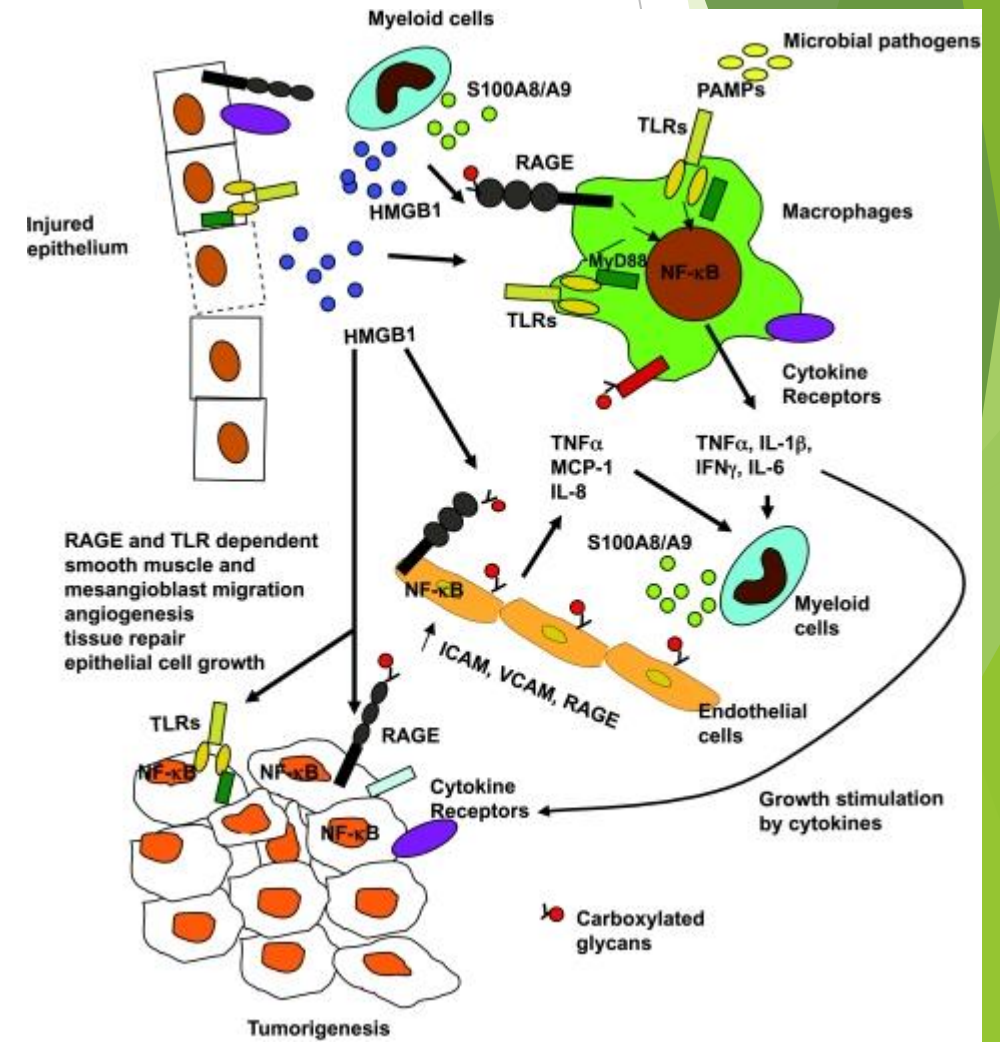
- ▶ Wykazano, że nabłonek pośredniczy w złożonych procesach zapalnych w odpowiedzi na te alergiczne i niealergiczne wyzwalacze, w tym uwalnianie trio cytokin nabłonkowych.
- ▶ Alarminy: podścielisko grasicy (TSLP), IL-33 i IL-25 inicjują odpowiedź zapalną poprzez liczne dalsze szlaki, w tym typ 2 (IL-4, IL-13 i IL-5) i inne, powodując różne skutki patofizjologiczne
 - ▶ Objawy astmy
 - ▶ Zaostrzenia astmy
- ▶ Nie tylko cytokiny nabłonkowe
- ▶ Środki przeciwzapalne są generatorami DAMP, a DAMP tworzą stan prozapalny

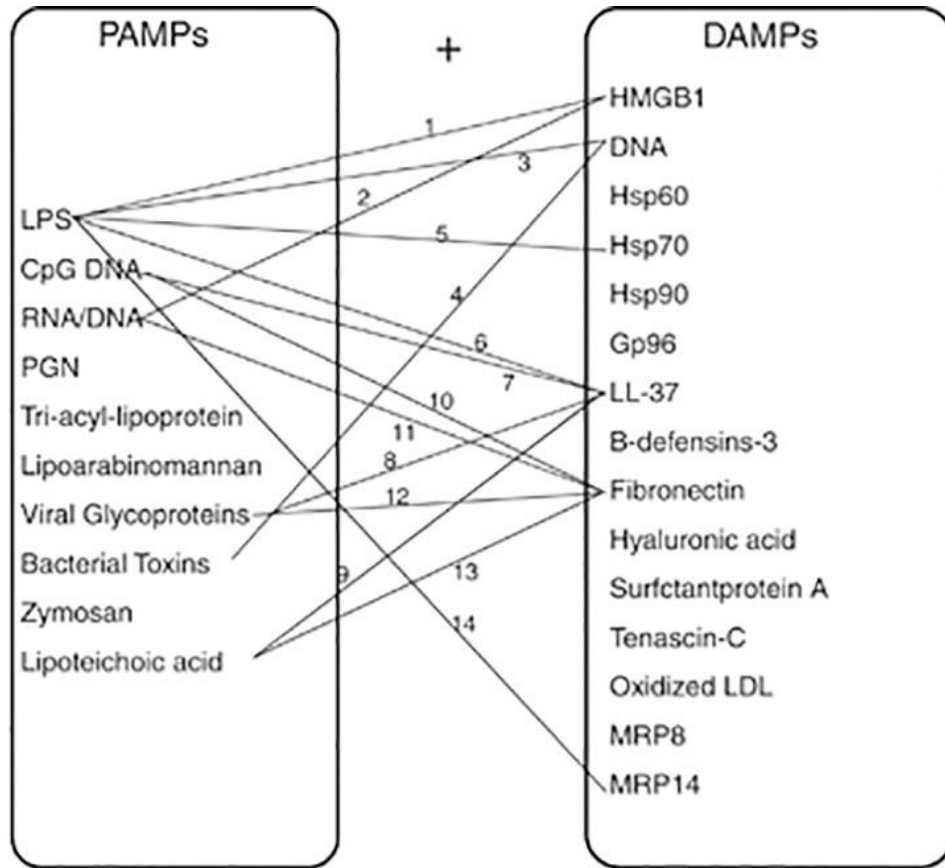


Związki pomiędzy PAMP a chorobami

► Działanie mediatorów zapalnych na rozwój i progresję nowotworów

- Nieprawidłowa trwałość (przedłużona) cząsteczek indukujących stan zapalny w przewlekłym zapaleniu i mikrośrodkowisku guza leży u podstaw karcynogenezy i progresji guza, co wskazuje, że cząsteczki DAMP i ich receptory mogą stanowić nowe cele terapii.
- W przewlekłym zapaleniu ta odpowiedź na uszkodzenia przesadzona lub trwała.
- długotrwałe zapalenie prowadzi do raka z powodu dysplastycznej degeneracji naprawionego nabłonka poprzez ciągłe uwalnianie reaktywnych form tlenu i azotu
- Tlen i azot powodują uszkodzenia DNA, co skutkuje niestabilnością genomu i zapewnia przewagę proliferacyjną dla komórek niosących mutacje.





Effect

1. Differences in IL-6 production, enhanced production of TNF, IL-6, and IL-8^{47, 48}
2. Enhances monocyte activation, promotes autoreactive B cell activation^{65, 66}
3. Synergistic activity to produce NO^{103, 104}
4. Enhances the expression of MHC-I and increases the number of specific CD8 cells¹⁰⁵
5. Hsp70 inhibits LPS-mediated response^{49, 106}
6. LL-37 inhibits LPS-mediated response¹⁰⁷
7. Plasmacytoid dendritic cells sense self DNA coupled with antimicrobial peptides¹⁰⁸
8. LL-37 and cationic peptides enhance TLR-3 signaling by viral double-stranded RNAs¹⁰⁹
9. LL-37 and its truncated derivatives potentiate pro-inflammatory cytokine induction by lipoteichoic acid in whole blood¹⁰⁸
10. Fibronectin enhances *in vitro* LPS-priming¹¹⁰
11. Interaction between fibronectin and DNA⁹⁵
12. Interaction between fibronectin and HIV-1 proteins⁹⁷
13. LTA from *Staphylococcus pyogenes* binds to fibronectin⁹⁶
14. Initiates activation of TLR4, enhanced expression of TNF- α ⁹⁹

The absence of lines between a PAMP and a DAMP imply potential PAMP-DAMP interactions that have not yet been experimentally proved

The intersections between 15 DAMPs and 10 PAMPs represent all the 150 potential interactions in a one PAMP plus one DAMP configuration. Annotated interactions (1–14) represent already experimentally identified interactions, and in some cases the immunological consequences of such interactions. The absence of lines between a PAMP and a DAMP imply potential PAMP–DAMP interactions that have not yet been experimentally proved.

W JAKI SPOSÓB PAMP I DAMPS ŁĄCZĄ PATOGENEZĘ CHOROBY ZAKAŻNEJ I NIEZAKAŻNEJ

- ▶ Nie tylko wzorce molekularne na/w patogenach (PAMP), ale także wzorce indukowane przez uszkodzenie tkanki gospodarza lub niedotlenienie (DAMP), działają w celu uwolnienia TNF i powiązanych cytokin.
- ▶ Te właśnie wzorce wpływają na uwalnianie TNF i cytokin poprzez receptory, takie jak receptory Toll-podobne (TLR) które znajdują się na/w wielu komórkach, ale najsilniej ulegają ekspresji na makrofagach i mikrogleju, dla których działają jako agoniści.
- ▶ Przykładem są:
 - ▶ Borelioza (bakteria)
 - ▶ Covid-19 (wirus)
 - ▶ Zespoły poudarowe
 - ▶ Urazy mózgu
 - ▶ Malaria mózgowa
 - ▶ Choroby autoimmunologiczne - u chorych z łuszczycowym zapaleniem stawów stwierdza się zwiększone stężenie TNF w błonie maziówkowej i blaszkach łuszczycowych, a u chorych z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa – w surowicy i tkance maziówkowej.

W JAKI SPOSÓB PAMP I DAMPS ŁĄCZĄ PATOGENEZĘ CHOROBY ZAKAŹNEJ I NIEZAKAŹNEJ

▶ Efekty współdziałania obu mechanizmów:

- ▶ **Utrata węchu i smaku** - w przypadku covid-19 oraz udaru; (leczenie etanerceptem?) - Tobinick E, Kim NM, Reyzin G, Rodriguez-Romanacce H, DePuy V. Selective TNF inhibition for chronic stroke and traumatic brain injury: an observational study involving 629 consecutive patients treated with perispinal etanercept. *CNS Drugs*. 2012;26:1051-1070.
- ▶ **Zmęczenie** - w przypadku pacjentów którzy przyjęli duże dawki rekombinowanego TNF w celu spowodowania regresji guzów nowotworowych było tak bezsilnych że po leczeniu nastąpiło opóźnienie ich zwolnienia do domu. Okazało się, że TNF tłumił czasowo aktywność kontrolowanych genów które biorą udział w kontrolowaniu rytmu okołodobowego.
- ▶ Spriggs DR, Sherman ML, Michie H, et al. Recombinant human tumor necrosis factor administered as a 24-hour intravenous infusion. A phase 1 and pharmacologic study. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80:1039-1044.
- ▶ **Ból neurogeny**, obejmujący zarówno ból neuropatyczny (uszkodzenie nerwów), jak i ból ośrodkowy (pochodzący z OUN), jest powszechnie obserwowany zarówno w przewlekłej chorobie COVID-19, jak i przewlekłej chorobie z Lyme, a także w zespołach poudarowych. Jest on indukowany przez nadmiar TNF.
- ▶ Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*. 2004;361:184-187.

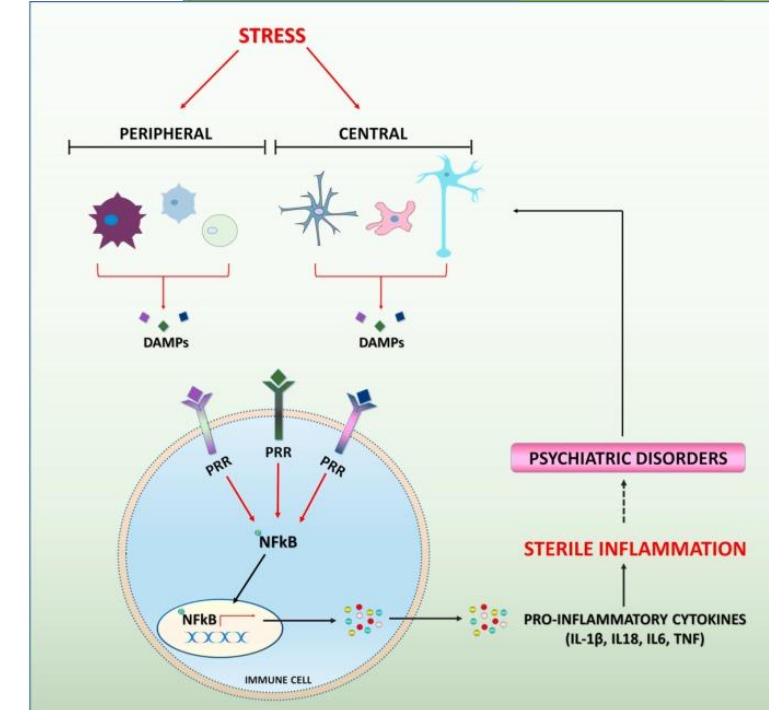
W JAKI SPOSÓB PAMP I DAMPS ŁĄCZĄ PATOGENEZĘ CHOROBY ZAKAŻNEJ I NIEZAKAŻNEJ

▶ Efekty współdziałania obu mechanizmów:

- ▶ **Delirium** opisano w boreliozie, COVID-19, malarii mózgowej i grypie, oraz niezakaźnych encefalopatiach. Przykładami są zespoły poudarowe, urazowe uszkodzenie mózgu i pooperacyjny deficyt poznawczy, gdzie PAMP są nieobecne, ale cytokiny indukowane w PAMP - w tym przypadku indukowane przez DAMP - są obfite.
- ▶ Chen C, Qian Y. Protective role of dexmedetomidine in unmethylated CpG-induced inflammation responses in BV2 microglia cells. *Folia Neuropathol.* 2016;54:382-391
- ▶ **Agresja i zmiany behawioralne:** wykazano, że poziomy TNF są podwyższone w czasie przewlekłego zaburzenia neurologicznego, np. w czasie malarii mózgu (*P. falciparum*). Podobnie jak w przypadku majaczenia, agresywność nie wymaga czynnika zakaźnego, aby zainicjować rodzaj i stopień encefalopatii wymaganej do jej manifestacji. Dwa niezakaźne przykłady to udary i urazowe uszkodzenia mózgu.
- ▶ Vaishnavi S, Rao V, Fann JR. Neuropsychiatric problems after traumatic brain injury: unraveling the silent epidemic. *Psychosomatics.* 2009;50:198-205.

W JAKI SPOSÓB DAMP WPŁYWAJA NA STAN PSYCHICZNY

- ▶ Efekty współdziałania obu mechanizmów:
 - ▶ **Stres** - jest głównym czynnikiem ryzyka zaburzeń psychicznych, w tym zaburzeń depresyjnych i może wywoływać stan zapalny, który jest rozregulowany w depresji. Kilka badań klinicznych i przedklinicznych wykazało silny związek między objawami depresyjnymi a ekspresją czynników nasilających stan zapalny.
 - ▶ Stres fizyczny, komórkowy i psychologiczny inicjuje uwalnianie endogennych czynników uruchamiających DAMP: Interleukiny 1 beta (IL-1 β), Interleukiny 6 (IL6) i czynnika martwicy nowotworu (TNF)
 - ▶ Franklin i in. 2018. Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns. *Brain, Behavior, and Immunity* 72: 2-13. doi: 10.1016/j.bbi.2017.10.025



DAMP	Receptors
ATP	P2X7
Heat shock proteins (HSP)	TLR2, TLR4
Heparan sulfate	TLR4
High mobility group box 1 protein (HMGB1)	TLR2, TLR4, RAGE
Histones	TLR2, TLR4, NLRP3
Mitochondrial ROS (mROS)	NLRP3
Mitochondrial DNA (mtDNA)	TLR9
Nucleic acids	TLR3, TLR7/8, TLR9
S100 proteins	TLR2, TLR4, RAGE
Mitochondrial transcription factor A (tfam)	TLR9, RAGE
Uric acids	NLRP3

Gdy ostry nadmiar TNF rozciąga się na przewlekły śródmózgowy TNF

When an acute excess of TNF extends to chronic intracerebral TNF

PAMP-initiated examples

- Long COVID-19
- Persistent Lyme Disease
- Influenza encephalopathy

Distinctive acute events

TNF-induced
Influenza-like acute
illness

Chronic neurological common events

In contrast to macrophages,
activated microglia are kept in
this TNF-generating state by
the excess TNF they produce.

DAMP-initiated examples

- Post-stroke syndromes
- Traumatic brain injury

DAMP effects of
hypoxia and trauma-
induced HMGB1 etc.
induce TNF release

Loss of ability to
taste and smell

Fatigue

Neurogenic
pain

Aggressiveness and
suicidal tendencies

Delirium

Gdy ostry nadmiar TNF rozciąga się na przewlekły śródmózgowy TNF

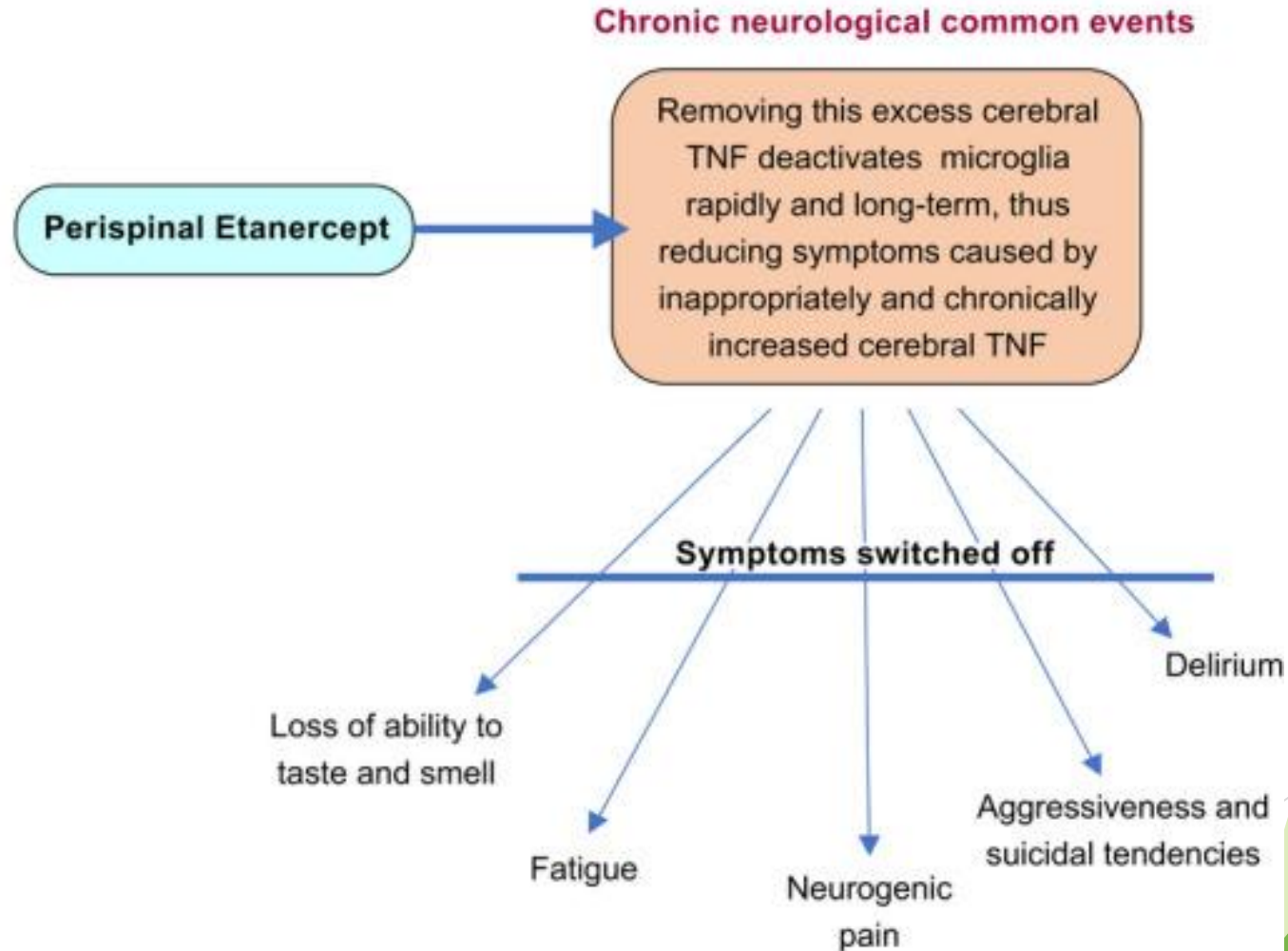
Predictable effects of perispinal TNF on these chronic neurological common events

PAMP-initiated examples

- Long COVID-19
- Persistent Lyme Disease
- Influenza encephalopathy

DAMP-initiated examples

- Post-stroke syndromes
- Traumatic brain injury



W JAKI SPOSÓB DAMP WPŁYWAJA NA STAN PSYCHICZNY

► Działanie etanerceptu

- Po okołordzeniowym podaniu etanerceptu nastąpiła natychmiastowa poprawa neurologiczna.
- Po 24 godzinach nastąpiło znaczne zmniejszenie przewlekłego zmęczenia i depresji po COVID-19 oraz znacząca mierzalna poprawa
 - funkcji poznawczych
 - funkcji wykonawczych
 - fluencji słownej fonemów
- Równowagi i chodu, koordynacji kończyn górnych i siły chwytu
- Funkcje poznawcze, depresję i zmęczenie badano po 29 dniach; każdy pozostał znacznie poprawiony

Białko receptorowe p75 Fc wiążące się z ludzkim czynnikiem martwicy nowotworów (TNF) produkowane metodą rekombinacji genetycznej z wykorzystaniem systemu ekspresji genu ssaków w komórkach jajnika chomika chińskiego. **Etanercept** jest dimerem chimerowego białka i stanowi połączenie domeny receptora 2 ludzkiego TNF (TNFR2/p75) wiążącej się z zewnątrzkomórkowymi ligandami z domeną Fc ludzkiej IgG1.

Działanie etanerceptu dowodzi że TNF mogą mieć znaczący wpływ na stany po infekcji SARS-CoV-2

