

MACIEJ WIERZBICKI, IWONA SOKOŁOWSKA, MARCIN STANISŁAWOWSKI,  
PIOTR WIERZBICKI, KRYSZTOF ADRYCH\*, JOANNA WYPYCH\*, MARIAN SMOCZYŃSKI\*,  
ZBIGNIEW KMIEĆ

**ZASTOSOWANIE METODY REAL-TIME PCR ORAZ TECHNIKI  
IMMUNOHISTOCHEMICZNEJ DO OCENY EKSPRESJI RECEPTORA  
TLR-5 W BIOPSJACH BŁONY ŚLIZOWEJ W PRZEBIEGU  
PRZEWLEKŁYCH NIESWOISTYCH ZAPALEŃ JELITA GRUBEGO**

EXPRESSION OF THE TLR-5 RECEPTOR IN THE MUCOSA  
OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE PATIENTS BY THE USE  
OF REAL-TIME PCR AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY

Zakład Histologii, Katedra Histologii i Immunologii AM w Gdańsku  
kierownik: prof. dr Andrzej Myśliwski

\* Katedra Gastroenterologii i Hepatologii Akademii Medycznej w Gdańsku  
kierownik: dr hab. Marian Smoczyński, prof. AMG

W pracy podjęto próbę oceny przydatności metody oznaczenia ilości transkryptu genu *tlr5* metodą real-time PCR oraz wizualizacji białka receptorowego w biopsjach błony śluzowej jelita grubego techniką immunohistochemiczną. Materiał stanowiły biopaty pobrane z tkanki zdrowej i chorobowo zmienionej od osób chorych na przewlekłe nieswoiste zapalenia jelita grubego (PZJG). Wyniki wstępnych badań wskazują, że przy pomocy zastosowanych metod możliwe jest wykazanie różnic w ekspresji genu TLR-5 na poziomie transkryptu i białka TLR-5 między tkanką zmienioną chorobowo i niezmienioną.

Przewlekłe zapalne choroby jelita grubego (PZJG), należące do grupy nieswoistych przewlekłych zapaleń jelit (Inflammatory Bowel Disease), przebiegają w dwóch podstawowych postaciach: przewlekłego wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (PWZJG – *colitis ulcerosa*) oraz choroby Leśniowskiego-Crohna (CD – choroba Crohna). Długotrwały przebieg, który znamionują naprzemienne samoistne zwolnienia i nawroty, występowanie groźnych powikłań, z których najpoważniejszymi są: zwiększone prawdopodobieństwo rozwoju raka, zagrożenie resekcją jelita grubego, sprawiają, iż poznanie mechanizmów powstawania i rozwoju tych chorób od wielu lat stanowi istotny problem badawczy.

Odkrycie w ostatnich latach rodziny jedenastu receptorów Toll-podobnych, tzw. TLR (*toll-like receptors*), kodowanych przez DNA linii zarodkowej, pozwoliło na wykazanie, że w obrę-

bie odporności wrodzonej funkcjonuje złożony system rozpoznawania struktur powierzchniowych i wewnętrznych drobnoustrojów, którego aktywacja prowadzi do uruchomienia ważnych mechanizmów efektorowych odporności wrodzonej i uczestniczy w kształtowaniu odporności wrodzonej [1, 8]. U ssaków receptory TLR są rodziną 11 przezbłonowych cząsteczek, które charakteryzują wspólne cechy strukturalne, takie jak obecność w części zewnątrzkomórkowej domen bogatych w leucynę, które wiążą różne ligandy, krótki region przezbłonowy, występowanie wysoce homologicznej cytoplazmatycznej domeny TIR (*toll/interleukin 1 receptor*) niezbędnej do zapoczątkowania kaskady sygnałowej [5].

Do najważniejszych struktur drobnoustrojów rozpoznawanych przez TLR należą: lipopolisacharyd (LPS) bakterii Gram-ujemnych, peptydoglikan ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, kwasy lipoteichojoye, lipoarabinomannan występujący w ścianie komórkowej mykobakterii, N-formylometionina, lipopeptydy, mannany ściany komórkowej drożdży, cząsteczki bakteryjnego DNA i flagellina – białko wchodzące w skład rzęsek bakteryjnych [1]. Pierwsze obserwacje wykazały udział TLR-2 w rozpoznawaniu składników ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i *Mycoplasma sp.*, takich jak lipoproteiny i kwasy lipoteichojoye [12].

Rzęski bakteryjne, rozpoznawane przez obecny na różnych komórkach receptor TLR-5, są znanym czynnikiem wirulencji bakterii [11]. W odpowiedzi na bodźce chemiczne i fizyczne środowiska umożliwiają patogenom chemotaksję, adhezję i inwazję tkanek gospodarza. Rzęski pełnią zasadniczą rolę w wirulencji pewnych chorobotwórczych bakterii, wśród których należy wymienić tak ważne czynniki etiologiczne: *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* [10, 6]. Ekspresję TLR-5 wykazano *in vivo* oraz *in vitro* na błonach śluzowych układu oddechowego i pokarmowego [3] oraz na komórkach nabłonka, monocytach i komórkach dendrytycznych [4, 6, 7]. W przeciwieństwie do dość licznych danych dotyczących ekspresji receptorów TLR-4 u chorych na nieswoiste zapalenia jelit (receptor ten wiąże LPS bakterii Gram-ujemnych), niewiele wiadomo jest o zmianach ekspresji receptora TLR-5 w PWZJG i chorobie Leśniowskiego-Crohna. Receptor ten może odgrywać istotną rolę w inicjacji i podtrzymaniu procesu zapalnego poprzez nasilenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, co m.in. prowadzi do wzmożenia sekrecji IL-8 wywierającej silny efekt chemotaktyczny wobec granulocytów obojętnochłonnych [3].

## CEL PRACY

Celem pracy było ustalenie przydatności metody real-time PCR do oznaczenia ilości transkryptu genu *tlr5* oraz określenie obecności białka TLR-5 w błonie śluzowej chorych na przewlekłe wrzodziejące zapalenie jelita grubego i chorobę Leśniowskiego-Crohna przy pomocy techniki immunohistochemicznej.

## MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano biopsje jelita grubego uzyskane od 4 mężczyzn, 2 chorych na PWZJG i 2 chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna. Krótką charakterystykę pacjentów zawarto

w tabeli I. Pobieranie materiału przebiegało zgodnie z protokołem zatwierdzonym przez lokalną Komisję Biotyczną. U pacjentów chorych na colitis ulcerosa określono aktywność choroby wg skali Trulove'a i Wittsa. Przy pomocy kolonoskopu pobrane zostały biopaty ze zmienionej makroskopowo i niezmienionej błony śluzowej, część z nich po utrwaleniu w formalinie została wykorzystana do oceny histopatologicznej w Zakładzie Patomorfologii Akademii Medycznej w Gdańsku. Pozostałe skrawki zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temp. -80 °C do czasu wykonania dalszych oznaczeń.

Tab. I

## Charakterystyka chorych

## Characteristics of patients

Pacjent Patient	Wiek (lata) Age (years)	Rozpoznanie Diagnosis	Czas trwania choroby (lata) Disease duration (years)	Stopień zaawansowania Activity of disease
1	22	UC	8	lekki / moderate
2	30	UC	5	lekki / moderate
3	28	CD	3	średnio ciężki
4	31	CD	2	lekki

UC – PWZJG / ulcerative colitis; CD – choroba Leśniowskiego-Crohna / Crohn's disease

## Izolacja RNA z biopsji

Całkowity komórkowy RNA został wyizolowany z biopsji błony śluzowej jelita grubego przy pomocy zestawu Total RNA Prep Plus (A&A Biotechnology, Polska) opartego o zmodyfikowaną metodę ekstrakcji przy pomocy fenolu/chloroformu [2]. Stężenie (w  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) i czystość wyizolowanego RNA określano metodą spektrofotometryczną przy użyciu spektrofotometru Smart Spec Plus (Bio-Rad, USA). Czystość RNA określano przez pomiar stosunku absorbancji przy dwóch długościach fali:  $\text{OD}_{260\text{ nm}}$  i  $\text{OD}_{280\text{ nm}}$ . Daną próbkę RNA uznawano za czystą, tj. pozbawioną białek i DNA, gdy wartość  $A(260)/A(280)$  zawierała się w granicach 1,6–2,0.

## Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) została przeprowadzona przy użyciu odwrotnej transkryptazy wirusa białaczki mysiej M-MLV (Promega, USA) z wykorzystaniem starterów oligo(dT)<sub>15</sub>. Przygotowany został tzw. „roztwór wstępny” (Pre-Mix); 2  $\mu\text{g}$  RNA wraz z 0,5  $\mu\text{g}$  oligo(dT) denaturowano termicznie poprzez 5 min. w temp. 70 °C, po czym schładzano w lodzie. Następnie dodawano mieszaninę do reakcji RT (Master Mix), a całość po odwirowaniu umieszczono w termocyklerze. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono przez 60 min. w temp. 42 °C. Następnie odwrotną transkryptazę inaktywowano termicznie poprzez ogrzewanie próbek przez 5 min. w temperaturze 99 °C. Uzyskane cDNA przechowywano w temp. -20 °C do czasu wykonania reakcji PCR.

## Ocena ekspresji receptora TLR-5 metodą real-time PCR

Analiza przyrostu produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym (real-time PCR) została wykonana przy pomocy aparatu iCycler (Bio-Rad, USA). Jako startery dla TLR-5 zastosowano: starter A 5'-TCAAACCCCTTCAGAGAATCCC-3', starter B 5'-TTGGAG-TTGAGGCTTAGTCCCC-3'; jako startery dla  $\beta$ -aktyny użyto: starter A 5'-TGTGCC-CATCTACGAGGGGTATGC-3', starter B 5'-GGTACATGGTGGTGCCGCCAGACA-3' [9]. Ocenę przyrostu ilości produktu reakcji dokonywano poprzez wzrost sygnału fluorescencji barwnika Sybr Green, wiążącego się niespecyficycznie z dwuniciowym DNA. W reakcji amplifikacji użyto Sybr Green Jumpstart Taq Readymix (Sigma, USA) z 0,5  $\mu$ l cDNA (dla oceny ilości mRNA  $\beta$ -aktyny), 1  $\mu$ l cDNA (do oceny mRNA TLR-5), do końcowej objętości 20  $\mu$ l. Profil temperaturowo-czasowy wyznaczono przy użyciu programu VNTI, był następujący: 95 °C – 3 min. (wstępna denaturacja), następnie 35 cykli; 95 °C – 30 s (denaturacja), 60 °C – 30 s (przyłączanie starterów), 72 °C – 30 s (elongacja) dla TLR-5, 45 s dla  $\beta$ -aktyny, 80 °C – 5 s (odczyt fluorescencji). W celu identyfikacji produktów niespecyficycznych przeprowadzono analizę krzywej topnienia produktów PCR po zakończeniu właściwej reakcji amplifikacji w następujących warunkach: 70 °C – 1 min., następnie 40 cykli; 95 °C – 10 s (denaturacja), 70 °C – 10 s (renaturacja, odczyt fluorescencji),  $\Delta t = 0,3$  °C w każdym cyklu aż do 94 °C. Dla każdej serii reakcji wyznaczano krzywą wzorcową z wykorzystaniem jako matrycy plazmidu pUC 19bact, pUC 19tlr (Fermentas, Litwa) zawierającym wklonowaną sekwencję docelową w malejących rozcieńczeniach seryjnych od 106 do 102 kopii. Reakcje dla wszystkich prób przeprowadzano w dwóch powtórzeniach.

### Ocena obecności receptora TLR-5 w biopsji błony śluzowej jelita cienkiego metodą immunohistochemiczną

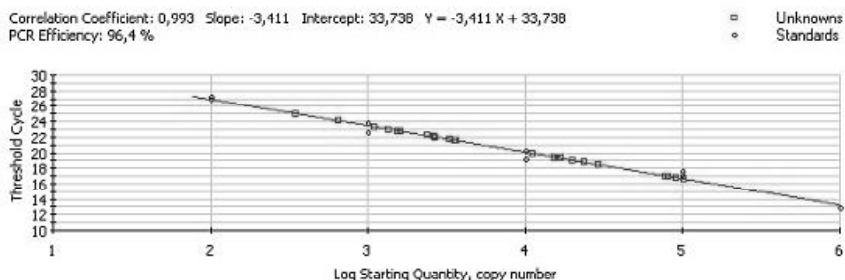
Biopsje jelita grubego przechowywano w temp. – 80 °C do czasu wykonania skrawków w kriostacie CM 1900 w temperaturze -20 °C (Leica, Niemcy). Przygotowane skrawki tkanki inkubowane były w 0,3% roztworze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanolu w celu zahamowania aktywności endogennych peroksydaz tkankowych. Następnie za pomocą surowicy blokowano miejsca niespecyficznego wiązania, a po przepłukaniu skrawków buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) naniesiono kozie, poliklonalne IgG skierowane przeciwko TLR-5 (AbCam, W. Brytania) w rozcieńczeniu 1:200, a następnie inkubowano w temp. 4 °C przez okres 24 godzin. Z kolei skrawki płukano PBS i dodano na 2 godz. w temp. 21 °C króliczą biotynylowaną IgG skierowaną przeciw kozim poliklonalnym przeciwciałom (Vector Labs, USA). Następnie dodano peroksydazę sprzężoną z awidyną i biotyną na czas 60 minut w temp. 21 °C (zestaw ABC, Vector Labs, USA). Lokalizację kompleksu antygen-przeciwciało uwidocznilo dodając barwnik, 3,3'-diaminobenzydynę (ICN Biomedicals Inc., USA). Preparaty zamykano w DPX (POCh, Polska) i oceniano w mikroskopie Eclipse 800 (Nikon).

## WYNIKI

### Real-time PCR

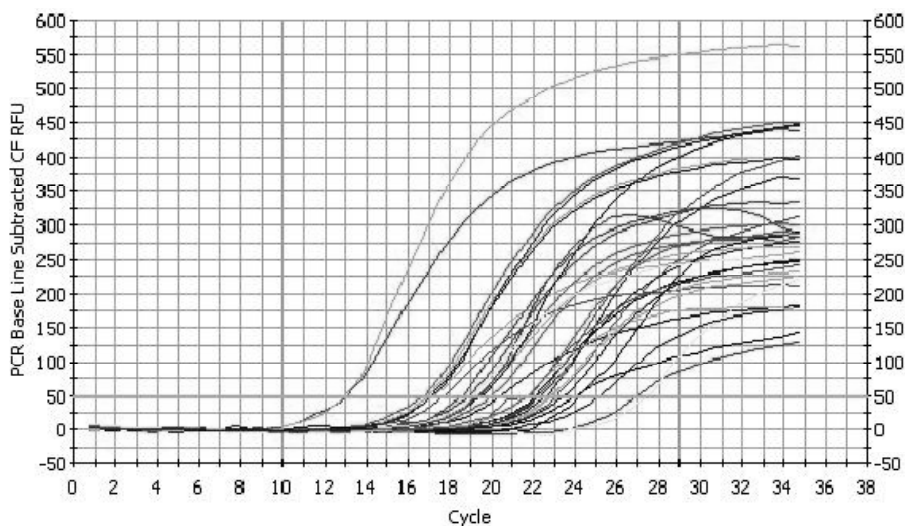
Ryc. 1 przedstawia krzywą standardową dla  $\beta$ -aktyny wyznaczoną na podstawie amplifikacji seryjnych rozcieńczeń plazmidu pUC19 bact.

W trakcie tej reakcji jednocześnie zmierzono ilość mRNA dla  $\beta$ -aktyny zawartego w badanych próbach klinicznych.



Ryc. 1. Krzywa standardowa dla  $\beta$ -aktyny wyznaczona na podstawie amplifikacji plazmidu pUC 19bact w malejących rozcieńzeniach seryjnych od  $10^6$  do  $10^2$  („Standards”). Na jej podstawie program iQ-Detection obliczył zawartość  $\beta$ -aktyny w badanych próbach klinicznych („Unknown”). Charakterystyka uzyskanej linii prostej: współczynnik korelacji 0,933; współczynnik nachylenia krzywej – 3,411; wydajność reakcji 96,4%

Fig. 1. Standard curve for  $\beta$ -actin amplification. The curve is based on values obtained for decreasing serial dilutions of the p UC 19bact plasmid ( $10^6$ – $10^2$ ). Unknown –  $\beta$ -actin content in clinical samples



Ryc. 2. Wykresy amplifikacji prób klinicznych dla  $\beta$ -aktyny przy użyciu termocyklera iQCyler. Oś odciętych: ilość cykli reakcji amplifikacji, oś rzędnych: intensywność fluorescencji produktów amplifikacji. Linia pozioma obrazuje poziom odniesienia uwzględniający obecność tła. Każdą reakcję dla danej próby przeprowadzono dwukrotnie

Fig. 2. The graph shows the amplification profiles of  $\beta$ -actin mRNA present in clinical samples. X axis, number of amplification cycles, Y axis, intensity of fluorescence in arbitrary units. The values were counted against background fluorescence consideration (horizontal line). Every sample was run twice

Ryc. 2 przedstawia wykresy obrazujące przyrost produktów reakcji amplifikacji dla  $\beta$ -aktyny w poszczególnych próbach klinicznych po kolejnych cyklach reakcji real-time PCR. W analogiczny sposób wyznaczono ilość produktów amplifikacji mRNA TLR-5 w tych samych próbach.

Uzyskane dane posłużyły do pomiaru wyjściowej ilości mRNA  $\beta$ -aktyny i TLR-5, co umożliwiło ocenę względnej zawartości mRNA TLR-5 w stosunku do zawartości mRNA konstytutywnego genu, jakim jest  $\beta$ -aktyna (Tab. II). Wartości uzyskane z tkanki zmienionej i niezmienionej zapalnie różniły się między sobą u poszczególnych pacjentów. U chorych na PWZJG zaobserwowano wzrost ilości mRNA TLR-5 w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita w stosunku do miejsca niezmienionej zapalnie, przy czym zakres tych zmian był bardzo duży (chory nr 1, chory nr 2, Tab. II). U jednego z pacjentów chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna zaobserwowano przeciwny kierunek zmian (chory nr 3, Tab. II), a u drugiego (chory nr 4, Tab. II) – brak zmian w ekspresji genu TLR-5 w miejscu zmienionym zapalnie, w stosunku do niezmienionej zapalnie fragmentu błony śluzowej jelita grubego.

Tab. II

Ilość mRNA  $\beta$ -aktyny i TLR-5 w biopsjach błony śluzowej jelita grubego poszczególnych chorych po-branych z miejsc zmienionych zapalnie i niezmienionych

The initial amounts of  $\beta$ -actin and TLR-5 mRNA molecules in biopsies taken from altered and unaltered colonic mucosa

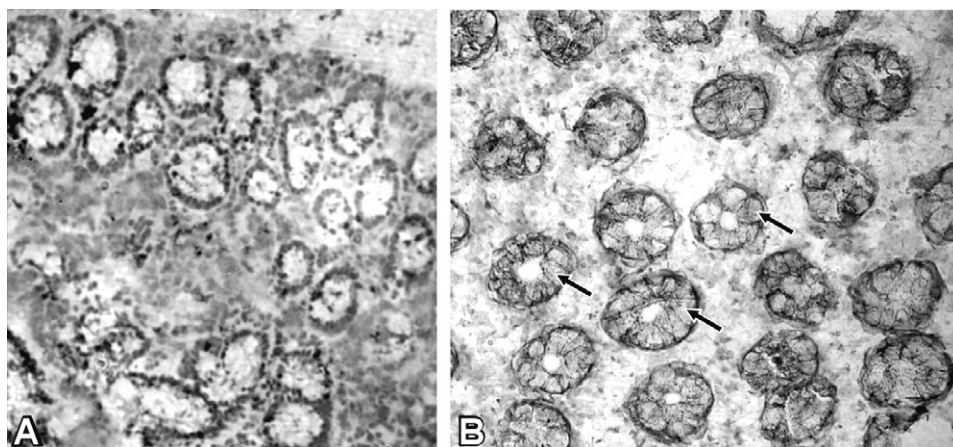
Pacjent / Patient	Średnia ilość mRNA $\beta$ -aktyny $\pm$ SD Amount of $\beta$ -actin mRNA $\pm$ SD	Średnia ilość mRNA TLR-5 $\pm$ SD Amount of TLR-5 mRNA $\pm$ SD	Stosunek ilości mRNA TLR-5 do $\beta$ -aktyny (%) TLR-5/ $\beta$ -actin mRNAs ratio (%)
1 (UC, tkanka zmieniona, AT)	$5,61 \pm 1,69 \times 10^1$	$3,03 \pm 0,18 \times 10^2$	540
1 (UC, tkanka niezmienniona UnT)	$7,81 \pm 7,45 \times 10^2$	$2,31 \pm 0,74 \times 10^2$	29
2 (UC, tkanka zmieniona, AT)	$1,03 \pm 0,74 \times 10^2$	$2,19 \pm 1,14 \times 10^2$	212
2 (UC, tkanka niezmienniona, UnT)	$7,32 \pm 0,0,52 \times 10^2$	$9,42 \pm 0,53 \times 10^2$	128
3 (CD, tkanka zmieniona, AT)	$8,42 \pm 0,21 \times 10^1$	$9,36 \pm 9,95$	11
3 (CD, tkanka niezmienniona, UnT)	$2,09 \pm 0,98 \times 10^1$	$2,69 \pm 0,24 \times 10^1$	128
4 (CD, tkanka zmieniona, AT)	$5,67 \pm 1,46 \times 10^4$	$2,37 \pm 1,07 \times 10^2$	0,4
4 (CD, tkanka niezmienniona, UnT)	$4,28 \pm 1,61 \times 10^4$	$2,55 \pm 1,58 \times 10^2$	0,6

Legenda jak dla tabeli I

Legend as for table I. AT, altered tissue (inflamed mucosa), UnT, unaltered tissue (normal mucosa).

## Badania immunocytochemiczne

Zastosowana metoda pozwoliła na uwidocznienie w skrawkach uzyskanych ze zmienionej zapalnie błony śluzowej jelita grubego chorych na PWZJG barwnego produktu reakcji antygen-przeciwciała w obrębie komórek nabłonka jelita grubego (ryc. 3A). Produkt reakcji obecny był zarówno w podstawnej, jak i szczytowej części enterocytów. Komórki kubkowe nie uległy zabarwieniu, podobnie jak komórki obecne w blaszce właściwej błony śluzowej. Porównanie skrawków uzyskanych od 2 różnych chorych nie uwidocznilo istotnych różnic w intensywności reakcji. W reakcji kontrolnej, w której pominięto przeciwciała pierwotne (ryc. 3B) nie zaobserwowano reakcji barwnej.



Ryc. 3. Obecność białka TLR-5 w biopsji błony śluzowej pacjenta chorego na PZWJG oceniana przy pomocy techniki immunocytochemicznej. 3A – kontrola bez przeciwciała pierwotnego; 3B – ziarnistości w cytoplazmie są dowodem reakcji pozytywnej w enterocytach tworzących kryptę jelitową. Oryginalne powiększenie 200x

Fig. 3. Visualization of the TLR-5 antigen in a colonic biopsy of the ulcerative colitis patient. 3A – control without primary antibody, lack of precipitates in enterocytes' cytoplasm; 3B – the arrows show positive reaction in the cytoplasm of enterocytes lining the crypts. Original magnification 200x

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Udział odpowiedzi immunologicznej stanowi ważny element w patogenezie przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit. W ciągu ostatnich dwóch lat wykazano, że składniki odporności wrodzonej, receptory Toll-podobne 4 (TLR-4), mogą mieć istotny wpływ na rozwój i przebieg colitis ulcerosa i choroby Leśniowskiego-Crohna. Podjęte przez nas badania stanowią wstęp do określenia roli receptorów TLR-5, innego rodzaju receptorów z grupy TLR, w patomechanizmie tych chorób. Przedstawione wyniki pokazują, iż określenie ilości mRNA (transkryptu) przy pomocy metody real-time PCR jest użyteczne dla oceny biopsji błony śluzowej jelita chorych na PWZJG i CD. Zastosowana metoda pozwala na określenie różnic w ilości mRNA TLR-5

pomiędzy tkanką zmienioną i niezmienioną zapalnie. Wykazanie, w jaki sposób zmienia się ekspresja receptora TLR-5 w błonie śluzowej jelita objętego przewlekłym procesem zapalnym, może przyczynić się do lepszego poznania patogenezы PZJG. Metoda real-time PCR, z natury rzeczy, dotyczy mieszanych populacji komórkowych. Zastosowanie przez nas metody immunocytochemicznej umożliwia wykazanie obecności białka TLR-5 w poszczególnych rodzajach komórek w obrębie krypt jelitowych. Produkt reakcji antygen-przeciwciało zlokalizowany był tylko w enterocytach, a nie w komórkach nacieku zapalnego, co potwierdza rolę komórek nabłonka jelitowego jako struktur uczestniczących w rozpoznawaniu pewnych wspólnych antygenów bakteryjnych. Wydaje się, że możliwa jest też jakościowa ocena mniejszej lub większej ekspresji cząsteczek TLR-5 przez porównanie intensywności reakcji immunocytochemicznej na skrawkach barwionych w identycznych warunkach, to jest w tej samej serii barwienia.

## PIŚMIENNICTWO

1. Anderson K.: Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 2000, 12, 1, 13. – 2. Chomczynski P, Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987, 162, 1, 156. – 3. Gewirtz A., Navas T., Lyons S., Godowski P., Madara J.: Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol.* 2001, 167, 4, 1882. – 4. Heil F., Ahmad-Nejad P., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Gellert T., Dietrich H., Lipford G., Takeda K., Akira S., Wagner H., Bauer S.: The Toll-like receptor 7 (TLR7) – specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 2003, 33, 11, 2987. – 5. Iwasaki A., Medzhitov R.: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004, 5, 10, 987. – 6. Jacchieri S., Torquato R., Brentani R.R.: Structural study of binding of flagellin by Toll-like receptor 5. *J Bacteriol.* 2003, 14, 185, 4243. – 7. Means T., Hayashi F., Smith K., Aderem A., Luster A.: The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol.* 2003, 170, 10, 5165. – 8. O’Neil D., Porter E. M., Elewaut D., Anderson G., Eckmann L., Ganz T., Kagnoff M.: Expression and regulation of the human  $\beta$ -defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol.* 1999, 163, 12, 6718. – 9. Maaser C., Heidemann J., Eiff C., Luger A., Spahn T., Binion D., Domschke W., Luger N., Kucharzik T. Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-Like receptor 5: A binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol.* 2004, 172, 5056. – 10. Ramos H., Rumbo M., Sirard J.: Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 2004, 12, 11, 509.
11. Smith K.D., Andersen-Nissen E., Hayashi F., Strobe K., Bergman M., Barrett S., Cookson B., Aderem A.: Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol.* 2003, 4, 12, 1247. – 12. Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999, 11, 4, 443.



M. Wierzbicki, I. Sokołowska, M. Stanisławowski, P. Wierzbicki, K. Adrych, J. Wypych, M. Smoczyński, Z. Kmieć

EXPRESSION OF THE TLR-5 RECEPTOR IN THE MUCOSA OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE PATIENTS BY THE USE OF REAL-TIME PCR AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY

Summary

The Toll-like receptor 5 (TLR-5) was found to play a role in the development of some inflammatory diseases, however, its involvement in the pathogenesis of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), main entities of Inflammatory Bowel Disease (IBD) has yet to be determined. The aim of our preliminary study was to assess the expression of TLR-5 in the colonic biopsies of 2 UC and 2 CD patients by the use of real-time PCR and immunocytochemistry.

Total RNA isolated from one biopsy specimen was used to obtain cDNA by the reverse transcriptase reaction. Primers specific for exon 1 of the *tlr-5* gene were used for real-time PCR reaction. In this way the initial amount of TLR-5 and  $\beta$ -actin mRNAs were determined for mucosal biopsies taken from inflamed and non-inflamed colonic mucosa of the same patient. We found increased TLR-5/ $\beta$ -actin mRNA ratio in the altered mucosa of UC patients. On the contrary, the expression of the *tlr-5* gene was decreased or unchanged in the inflammatory mucosa of CD patients. The presence of TLR-5 protein was established in the enterocytes, however, no positive reaction was found in the goblet cells or lamina propria cells. The preliminary results of this quantitative and qualitative study suggest that TLR-5 expression may be different in the colonic mucosa of UC and CD patients, and that real-time PCR technique together with immunocytochemistry represent valuable methods for the assessment of TLR-5 role in the pathogenesis of IBD.

Adres: mgr inż. Maciej Wierzbicki  
Zakład Histologii  
Katedra Histologii i Immunologii AMG  
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk  
e-mail: macwierzb@amg.gda.pl