



Maciej Czerkies

**Udział receptora TLR4 i białka CD14
w internalizacji niskich i wysokich stężeń
lipopolisacharydu**

**Praca doktorska wykonana
w Pracowni Receptorów Błony Komórkowej
Zakładu Biologii Komórki
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN**

**pod kierunkiem:
prof. dr hab. Katarzyny Kwiatkowskiej**

Warszawa 2012

Pragnę serdecznie podziękować:

Pani prof. dr hab. Katarzynie Kwiatkowskiej za opiekę, wielkie pokłady cierpliwości, nieocenioną pomoc i ogromne zaangażowanie w proces powstawania niniejszej pracy

Panu prof. dr hab. Andrzejowi Sobocie za umożliwienie wykonania pracy w Pracowni Receptorów Błony Komórkowej oraz cenne merytoryczne uwagi

Pani Kazi Mrozińskiej za wspaniałą pomoc techniczną

Mojej Mamie za wsparcie

Oraz wszystkim Kolegom i Koleżankom, dzięki którym lata spędzone w Instytucie były prawdziwą przyjemnością

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów	4
2. Streszczenie	6
3. Wstęp	9
3.1. Receptory PRR	9
3.2. Receptory Toll-podobne	12
3.2.1. Charakterystyka ogólna	12
3.2.2. Struktura receptora TLR4 i innych TLR	15
3.2.3.1 Struktura lipopolisacharydu	18
3.2.3.2 Białka wiążące LPS	20
3.2.4. Ścieżki sygnałowe aktywowane przez lipopolisacharydy	23
3.2.4.1. Ścieżka zależna od MyD88	23
3.2.4.2. Ścieżka niezależna od MyD88 (zależna od TRIF)	25
3.2.4.3. Rola internalizacji receptora TLR4 w sekwencyjnej aktywacji ścieżek sygnałowych	26
3.2.5. Negatywna regulacja przekazywania sygnału przez receptor TLR4	29
3.2.6. Usuwanie i detoksykacja lipopolisacharydu	34
3.3. Szlaki internalizacyjne	36
3.3.1. Endocytoza zależna od klatryny	37
3.3.2. Endocytoza niezależna od klatryny	38
3.3.3. Makropinocytoza	41
3.3.4. Fagocytoza	41
4. Założenia i cel pracy	42
5. Materiały i metody	44
5.1. Stosowane przeciwciała	44
5.1.1. Przeciwciała pierwszorzędowe	44
5.1.2. Przeciwciała drugorzędowe	44
5.2. Hodowla komórek	45
5.3. Przygotowanie lipopolisacharydu, stymulacja komórek	46
5.4. Wyciszanie ekspresji genów kodujących kwaśną i neutralną sfingomielinazę	48
5.4.1. Transfekcja komórek siRNA	48
5.4.2. Pomiary aktywności kwaśnej sfingomielinazy	48
5.4.3. Pomiary aktywności neutralnej sfingomielinazy	49

5.5. Pomiary poziomu TNF α i RANTES w nadsączu komórek przy pomocy testów ELISA	49
5.6. Pomiary poziomu komórkowego ceramidu metodą izotopową	50
5.7. Oznaczanie poziomu białek i lipidów na powierzchni komórek za pomocą cytometrii przepływowej	51
5.7.1. Oznaczanie poziomu powierzchniowego TLR4 i CD14	51
5.7.2. Oznaczanie poziomu powierzchniowego ceramidu	52
5.7.3. Oznaczanie poziomu powierzchniowego gangliozydu GM1	53
5.8. Oznaczanie poziomu CD14 i GM1 na powierzchni komórek za pomocą laserowej cytometrii skaningowej	53
5.9. Oznaczanie poziomu TLR4 na powierzchni komórek techniką izotopową	54
5.10. Analiza składu białkowego techniką elektroforezy w żelu poliakryloamidowym i immunoblotingu	55
5.10.1. Denaturujący rozdział białek w żelu poliakryloamidowym (SDS-PAGE)	55
5.10.2. Transfer i detekcja białek na błonie nitrocelulozowej	56
5.11. Oznaczanie stężenia białka	56
5.12. Mikroskopia fluorescencyjna i analiza obrazu	57
5.13. Pomiary internalizacji LPS-AF488 i dekstranu-FITC za pomocą cytometrii przepływowej	58
5.14. Pomiary internalizacji transferyny za pomocą cytometrii przepływowej	58
5.15. Pomiary internalizacji transferyny za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej	59
5.16. Nadprodukcja zmutowanej formy dynaminy-2 w komórkach	60
5.17. Analiza statystyczna	61
6. Wyniki	62
6.1. Produkcja cytokin indukowana przez LPS na ścieżce zależnej i niezależnej od MyD88 w komórkach J774	62
6.2. Stymulacja komórek przez LPS indukuje wzrost poziomu ceramidu	64
6.3. Wyciszanie ekspresji kwaśnej i neutralnej sfingomielinazy prowadzi do zwiększonej produkcji TNF α w odpowiedzi na LPS	67
6.4. Hamowanie aktywności kwaśnej i neutralnej sfingomielinazy odmiennie reguluje aktywację komórek na ścieżce zależnej i niezależnej od MyD88 w odpowiedzi na LPS.	68
6.5. Ocena poziomu CD14 i TLR4 na powierzchni komórek przy użyciu cytometrii przepływowej i skaningowej	71

6.6. Poziom TLR4 na powierzchni komórek może zostać oznaczony techniką izotopową	73
6.7. Poziom TLR4 na powierzchni komórek spada podczas stymulacji wysokim stężeniem LPS	75
6.8. Poziom CD14 na powierzchni komórek przylegających do podłoża spada podczas stymulacji wysokim stężeniem LPS	76
6.9. Całkowity poziom TLR4 i CD14 w komórkach spada dopiero podczas przedłużonej inkubacji z lipopolisacharydem	78
6.10. Przejściowe współwystępowanie TLR4 i CD14 w komórkach stymulowanych lipopolisacharydem	80
6.11. Internalizacja lipopolisacharydu przez komórki J774	84
6.12. Internalizacja dużych stężeń lipopolisacharydu wymaga udziału CD14, a nie TLR4	85
6.13. Zahamowanie endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy stymuluje internalizację dużych stężeń lipopolisacharydu przez komórki	89
6.14. Inhibicja endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy prowadzi do obniżenia produkcji cytokin w odpowiedzi na LPS	91
6.15. Hamowanie aktywności dynaminy powoduje spadek poziomu TLR4 w komórkach	93
6.16. Blokowanie wiązania LPS do receptorów zmiataczy prowadzi do zahamowania jego internalizacji przez komórki	95
6.17. Inkubacja komórek z siarczanem dekstranu prowadzi do zwiększonej produkcji cytokin w odpowiedzi na LPS	98
6.19. Ekspresja CD14 i TLR4 na powierzchni komórek zwiększa się pod wpływem siarczanu dekstranu	100
7. Dyskusja	102
7.1. Internalizacja lipopolisacharydu jako mechanizm regulacji odpowiedzi prozapalnej komórek	103
7.2. Obniżanie ekspresji TLR4 i CD14 na powierzchni komórek jako mechanizm ograniczania nadmiernej aktywacji makrofagów	114
7.3. Udział sfingolipidów w regulacji odpowiedzi komórek na LPS	116
8. Podsumowanie i wnioski	118
9. Spis literatury	120

1. Wykaz stosowanych skrótów

ASMaza – kwaśna sfingomielinaza

BPI – białko zwiększające przepuszczalność błony bakterii Gram-ujemnych

(ang. *bactericidal/permeability-increasing protein*)

BSA – albumina surowicy bydłowej (ang. *bovine serum albumin*)

cDNA – kwas deoksyrybonukleinowy komplementarny do mRNA (ang. *complementary deoxyribonucleic acid*)

CTX-FITC – podjednostka B toksyny cholery skoniugowana z FITC

DAPI – 4',6-diamidyno-2-fenylindol

Dekstran-FITC – dekstran 40000 skoniugowany z FITC

DMEM – pożywka hodowlana (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMF – dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)

EGTA – kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraoctowy

FBS – płodowa surowica bydłowa (ang. *fetal bovine serum*)

FITC – izotiocyanian fluoresceiny

GPI – glikozylofosfatydyloinozytol

HRP – peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)

IFN – interferon

IL – interleukina

kDa – kilodalton

KDO – kwas 3-deoksy-D-manno-oktulozonowy

LBP – białko wiążące lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide-binding protein*)

LPS – lipopolisacharyd

LPS-AF488 – lipopolisacharyd skoniugowany z Alexa Fluor 488

NSMaza – neutralna sfingomielinaza

PAMP – molekularny wzorzec związany z patogenami (ang. *patogen associated molecular pattern*)

PBS – buforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. *phosphate buffered saline*)

PD – bufor zawierający 125 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM NaHCO₃, 1 mM KH₂PO₄, 10 mM glukozy, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ i 20 mM Hepes, pH 7.4

PDGFR – receptor płytkowego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor receptor*)

PHEM – bufor zawierający 60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA i 4 mM MgCl₂, pH 6.9

PMSF – fluorek fenylo-metylosulfonowy

PRR – receptor rozpoznający wzorce (ang. *pattern recognition receptor*)

RANTES – chemokina β syntetyzowana przez limfocyty T (ang. *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*), nazywana również CCL5 (ang. *Chemokine (C-C motif) ligand 5*)

RPMI – pożywka hodowlana (ang. *Roswell Park Memorial Institute*, pożywka opracowana w tym instytucie)

SDS – siarczan dodecylu sodu

SR – receptor zmiatacz (ang. *scavenger receptor*)

TBS – roztwór soli fizjologicznej buforowany Tris (ang. *Tris buffered saline*)

Tfr-AF647 – transferyna skoniugowana z Alexa Fluor 647

TLC – chromatografia cienkowarstwowa (ang. *thin layer chromatography*)

TLR – receptor Toll-podobny (ang. *Toll-like receptor*)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametylobenzodyna

TNFα – czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. *tumor necrosis factor alpha*)

Tris – tris-(hydroksymetylo)-aminometan

2. Streszczenie

Lipopolisacharyd jest składnikiem błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. W czasie infekcji LPS aktywuje leukocyty, wywołując ogólnoustrojowy stan zapalny nazywany sepsą. Za rozpoznanie lipopolisacharydu przez leukocyty odpowiada złożony układ białek: białko surowicy, LBP, wiąże cząsteczki LPS i przenosi je na białko CD14 zakotwiczone w błonie komórkowej leukocytów, skąd LPS trafia do kompleksu receptora TLR4 i białka MD-2. Aktywowany receptor TLR4 inicjuje dwie ścieżki sygnałowe, zależną i niezależną od udziału białka adaptorowego MyD88, które łącznie prowadzą do syntezy różnorodnych mediatorów reakcji zapalnej. Z uwagi na groźne skutki nadmiernej stymulacji komórek przez LPS istnieją liczne mechanizmy wyciszające ich odpowiedź prozapalną. Obejmują one hamowanie ścieżek sygnałowych uruchamianych przez LPS w wyniku działania określonych białek i lipidów, obniżenie poziomu receptora TLR4 lub/i CD14 na powierzchni stymulowanych komórek oraz detoksykację LPS. Dwa ostatnie mechanizmy wiążą się z internalizacją TLR4 i/lub CD14 oraz LPS. Internalizacja dużych dawek LPS i jego detoksykacja zależy od udziału receptorów zmiataczy. Niewiele jednak wiadomo o współdziałaniu, lub ewentualnym antagonizmie, tych receptorów z receptorami CD14 i TLR4, które odpowiadają za aktywację komórek przez LPS.

Celem pracy było zbadanie mechanizmów negatywnej regulacji odpowiedzi komórek makrofagopodobnych linii J774 na LPS, ze szczególnym uwzględnieniem udziału receptora TLR4 i białka CD14 w internalizacji tej endotoksyny.

Ustaliliśmy, że komórki linii J774 w odpowiedzi na stymulację lipopolisacharydem wytwarzały cytokiny prozapalne na ścieżce zależnej i niezależnej od MyD88 z odmienną dynamiką. Produkcja cytokiny TNF α , powstającej na ścieżce zależnej od MyD88 była szybsza i ulegała zahamowaniu przy stężeniach LPS powyżej 10-50 ng/ml, co wskazuje na włączające się w tych warunkach mechanizmy regulujące negatywnie ten szlak sygnałowy receptora TLR4. Natomiast produkowana na ścieżce niezależnej od MyD88 chemokina RANTES wydzielana była z opóźnieniem w porównaniu z TNF α , ale jej poziom podnosił się wraz z czasem stymulacji. Wykryliśmy, że jednym z czynników negatywnie regulujących produkcję TNF α jest ceramid, powstający w wyniku hydrolizy sfingomieliny przez kwaśną i neutralną sfingomielinazę. Wyciszenie ekspresji genów kodujących te enzymy, a także działanie ich inhibitorów - imipraminy i GW4869 - w sposób istotny zwiększało ilość TNF α uwalnianego przez stymulowane komórki. Dane literaturowe

sugerują, że ceramid hamuje potranslacyjne modyfikacje tego białka. Przeciwnie, silne obniżenie aktywności kwaśnej sfingomielinazy w wyniku działania imipraminy prowadziło do obniżenia produkcji chemokiny RANTES. Może to sugerować, że ceramid generowany przez ten enzym ułatwia endocytozę receptora TLR4, która warunkuje uruchomienie ścieżki niezależnej od MyD88 z błony endosomów.

Stwierdziliśmy, że w czasie aktywacji komórek J774 przez LPS zarówno rozmieszczenie receptora TLR4 i białka CD14, jak i ich poziom na powierzchni błony komórkowej ulegały zmianom. Receptor TLR4 i białko CD14 przemieszczały się w rejon krawędzi wiodącej aktywowanych komórek, gdzie przejściowo współwystępowały. Zgodnie z wynikami obserwacji mikroskopowych, analiza cytometryczna i radioizotopowa poziomu CD14 i TLR4 na powierzchni komórek wykazały, że stymulacja komórek wysokim stężeniem lipopolisacharydu, 1000 ng/ml, powodowała znaczny spadek poziomu powierzchniowego TLR4 (o 45%) i nieco mniejszy ubytek CD14 zauważalny już po 1-2 godzinach stymulacji. Efekt ten był skorelowany z obniżeniem całkowitej ilości TLR4 (o 30%) w komórkach. Redukcja powierzchniowego (i całkowitego) poziomu TLR4 i CD14 może być zatem jednym z elementów wyciszających odpowiedź prozapalną komórek J774.

W komórkach poddanych działaniu dużego stężenia LPS (1000 ng/ml) zauważalna była intensywna internalizacja tej endoksyny. Pobieranie dużego stężenia LPS wymagało udziału białka CD14 i receptorów zmiataczy. Proces ten przebiegał jednak niezależnie od zaangażowania receptora TLR4, co wskazuje, że nie indukował on odpowiedzi prozapalnej i służył neutralizacji LPS przez jego wewnątrzkomórkową detoksykację. Zablokowanie wiązania LPS do receptorów zmiataczy przez kompetycyjny ligand (siarczan dekstranu) hamowało o 70% internalizację dużych stężeń LPS, ale jednocześnie prowadziło do niemal dwukrotnego wzrostu produkcji cytokin prozapalnych, TNF α i RANTES. Wykryliśmy, że pod wpływem siarczanu dekstranu ilość CD14 i receptora TLR4 na powierzchni komórek zwiększała się, co może przyczyniać się do intensyfikowania odpowiedzi prozapalnej w tych warunkach.

Przeciwwagę szlaków aktywujących odpowiedź prozapalną komórek i procesu internalizacji dużych stężeń LPS wykryliśmy także stosując inhibitory endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy. Inhibitory te hamowały produkcję TNF α i RANTES, wskazując na klatryno- i dynamino-zależną endocytozę jako istotną dla generacji sygnałów przez aktywowany receptor TLR4. Jednocześnie, zahamowanie tego szlaku endocytozy prowadziło do wzmożonego pobierania dużych stężeń LPS przez komórki.

Nasze dane wskazują, że białko CD14 uczestniczy zarówno w odpowiedzi prozapalnej komórek indukowanej przez LPS jak i neutralizacji dużych stężeń LPS. CD14 przekazuje bowiem LPS na TLR4, co uruchamia obie ścieżki odpowiedzi prozapalnej. Uruchomienie ścieżki sygnałowej TLR4 niezależnej od MyD88 wymaga klatryno- i dynamino-zależnej endocytozy tego receptora wraz z „sygnałową” (niewielką) pulą LPS. Nadmiar LPS przekazywany jest natomiast z CD14 na receptory zmiatacze, które umożliwiają internalizację i detoksykację endotoksyny. Udział białka CD14 w odpowiedzi prozapalnej i neutralizacji LPS może decydować o przeciwwadze tych procesów.

3. Wstęp

3.1. Receptory PRR

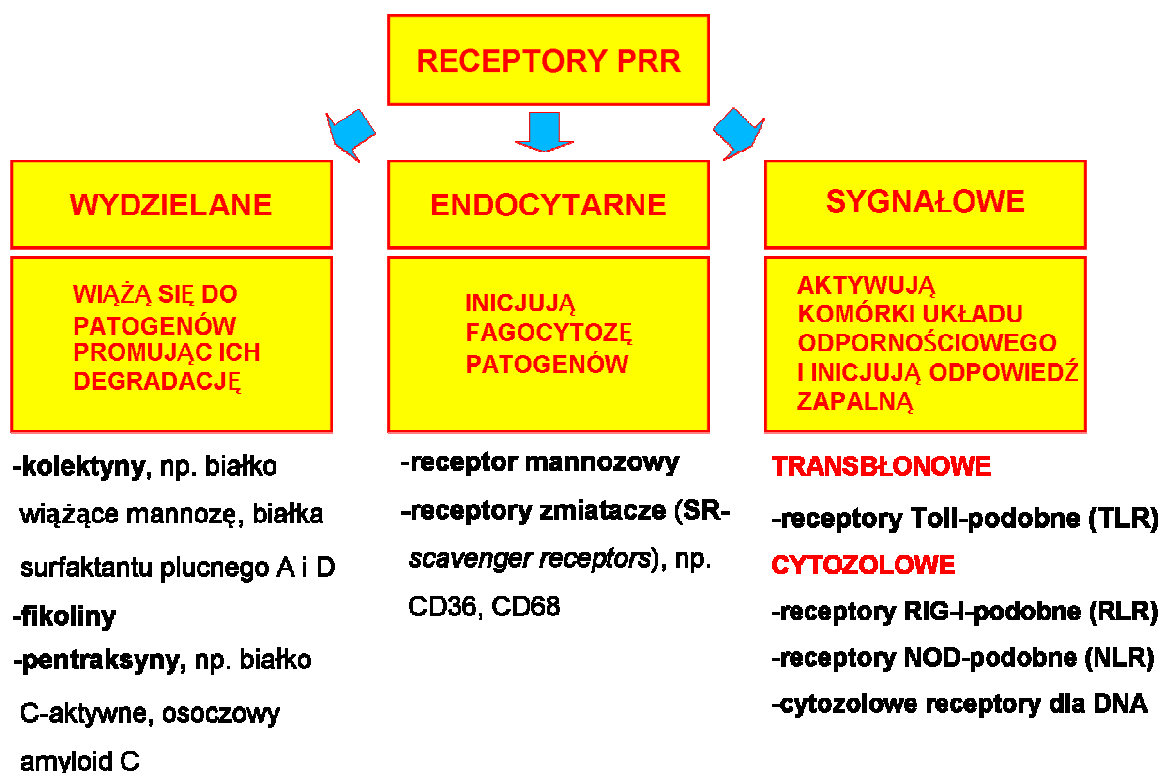
Kluczową rolę w układzie odpornościowym kręgowców pełni jego starsza ewolucyjnie część, układ wrodzony. Odpowiada on za szybką, choć niespecyficzną odpowiedź, skierowaną przeciwko mikroorganizmom, którym udało się pokonać fizyczne bariery chroniące organizm. Układ wrodzony aktywuje też i kontroluje adaptacyjny układ odpornościowy, który zapewnia swoistą odpowiedź oraz długoterminową odporność.

Funkcjonowanie układu odpornościowego opiera się na zdolności rozróżnienia „obcych” cząsteczek mikroorganizmów od „własnych” cząsteczek organizmu gospodarza. Rozróżnienie to jest istotne ze względu na konieczność wczesnego wykrycia patogenów oraz uniknięcia groźnej w skutkach autoimmunizacji. Kolejnym problemem, który przewyciężyć musi wrodzony układ odpornościowy, jest rozpoznawanie ogromnej liczby potencjalnie niebezpiecznych organizmów, które należą do tak zróżnicowanych klas jak bakterie, wirusy, grzyby i pierwotniaki. Ligandy o takich właściwościach wykrywane są przez **receptory rozpoznające wzorce** (ang. **PRR** – *pattern recognition receptors*). Jest to grupa receptorów występujących w komórkach takich jak monocyty i makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne i nabłonkowe. Receptory te zdolne są do rozpoznawania zachowanych w ewolucji cząsteczek, charakterystycznych dla całych grup mikroorganizmów, a niespotykanych w organizmie gospodarza. Cząsteczki takie określa się mianem **molekularnych wzorców związanych z patogenami** (ang. **PAMP** – *pathogen-associated molecular patterns*) [1]. Typowym przykładem PAMP są składniki budulcowe ściany komórkowej bakterii, a w przypadku bakterii Gram-ujemnych, także błony zewnętrznej. Struktury te zawierają eksponowane, unikalne dla bakterii cząsteczki, takie jak peptydoglikany, lipopolisacharydy oraz specyficzne lipoproteiny. Drugą istotną grupą cząsteczek rozpoznawanych przez PRR są kwasy nukleinowe. W tym przypadku rozróżnienie ich od analogicznych cząsteczek gospodarza jest możliwe dzięki tworzeniu przez nie charakterystycznych struktur, występowaniu specyficznych sekwencji i różnicach w modyfikacji (np. metylacji).

Poza rozpoznawaniem patogenów, dodatkową funkcją pełnioną przez receptory PRR wrodzonego układu odpornościowego jest współudział w odpowiedzi na endogenne sygnały świadczące o uszkodzeniach tkanek. Do takich cząsteczek należą m.in. produkty proteolizy macierzy zewnątrzkomórkowej, które akumulują się podczas uszkodzeń tkanek

oraz niektóre wewnątrzkomórkowe białka, jak HMGB-1 (ang. *high-mobility group box-1*), uwalniane podczas apoptozy komórek. Takie endogenne cząsteczki zdolne do aktywacji układu odpornościowego przy udziale receptorów PRR określa się mianem **DAMP** (ang. *damage/danger associated molecular patterns*) [2, 3].

Na rycinie 3.1 przedstawiono podział receptorów PRR na trzy klasy: wydzielane, inicjujące fagocytozę i sygnałowe.



Ryc. 3.1. Podział receptorów rozpoznających wzorce w oparciu o pełnione funkcje. Receptory inicjujące fagocytozę obecne są głównie na powierzchni komórek żernych, takich jak makrofagi i komórki dendrytyczne. TLR występują również w innych komórkach układu odpornościowego, a także w komórkach nabłonkowych, śródbłonkowych oraz fibroblastach. Receptory RLR i niektóre NLR (np. NOD1) są obecne w cytoplazmie większości typów komórek.

Pierwsze z nich to cząsteczki rozpuszczalne o charakterze opsonin, które wiążą się z powierzchnią patogennych organizmów, ułatwiając ich fagocytozę oraz inicjując klasyczną i lektynową drogę aktywacji układu dopełniacza. Receptory PRR z grupy zaangażowanej w fagocytozę to białka transbłonowe pośredniczące w internalizacji patogenów, co prowadzi do degradacji pobranych cząstek i prezentacji uwolnionych z nich antygenów. Do trzeciej klasy zalicza się kilka rodzin receptorów posiadających domeny sygnałowe i

zdolnych do aktywacji transkrypcji genów kodujących białka o charakterze prozapalnym. Należą do nich:

- **receptory Toll-podobne (TLR, ang. *Toll-like receptors*)** – najlepiej scharakteryzowana rodzina receptorów PRR, omówiona w dalszej części rozprawy.

- **receptory RIG-I-podobne (RLR, ang. *RIG-I-like receptors*)** – rodzina trzech cytoplazmatycznych helikaz wykrywających dwuniciowe wirusowe RNA. Dwie z nich, RIG-1, MDA-5, posiadające domeny CARD (ang. *caspase activation and recruitment*), inicjują ścieżkę sygnałową prowadzącą do syntezy interferonów typu I; trzeci członek tej rodziny, LPG, jest pozbawiony domeny CARD i funkcjonuje jako pozytywny regulator aktywności RIG-1 i MDA-5 [4]. Potwierdzono rolę RLR w rozpoznawaniu m.in. wirusów z rodzin Flaviridae (np. wirus zapalenia wątroby typu C), Picornaviridae (np. wirus Polio) i Paramyxoviridae (np. wirus choroby Newcastle) [4].

- **receptory NOD-podobne (NLR, ang. *NOD-like receptors*)** – liczna rodzina receptorów (zidentyfikowano dotychczas dwadzieścia trzy receptory NLR u ludzi oraz trzydzieści cztery u myszy) rozpoznających cząsteczki PAMP mikroorganizmów w cytoplazmie. Receptory te mogą posiadać kilka różnych domen w części N-terminalnej, na której to podstawie klasyfikuje się je do podrodzin. Do typowo występujących domen efektorowych należą: domena CARD, PYD (ang. *pyrin domain*) oraz domena BIR (ang. *baculovirus inhibitor repeats*). Do rozlicznych ligandów rozpoznawanych przez te receptory zalicza się peptydoglikan, w tym jego składnik - kwas γ -D-glutamyl-mezydiaminopimelinowy, dipeptyd muramylowy ze ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, flagelinę, a także kryształy uwalniane z uszkodzonych tkanek (np. kwasu moczowego) i niektóre toksyny bakteryjne. Aktywacja tych receptorów może prowadzić do utworzenia wielocząsteczkowego kompleksu zwanego „inflamasomem” odpowiedzialnego za promowanie procesów zapalnych, a także mogącego inicjować specyficzną formę apoptozy, zwaną pyroptozą [5, 6].

- **cytozolowe receptory DNA** - grupa w znacznej mierze niezidentyfikowanych białek, odpowiedzialnych za inicjację produkcji interferonów typu I w obecności plazmidowego, wirusowego bądź bakteryjnego DNA w cytoplazmie komórek. Postuluje się udział w tym procesie białek DAI, STING oraz ATG9a [5].

Warto zauważyć, że pomimo znacznego strukturalnego zróżnicowania zarówno ligandów jak i wiążących je receptorów PRR, schemat aktywacji i przebiegu odpowiedzi zapalnej pozostaje zasadniczo taki sam. Charakterystyczny dla receptorów PRR wydaje się być efekt zawężania ilości zaangażowanych w aktywację komórek cząsteczek, od kilkuset

rozpoznawanych PAMP, przez kilkadziesiąt receptorów i kilkanaście powiązanych z nimi białek adaptorowych, do zaledwie około dziesięciu głównych kinaz zaangażowanych w transdukcję sygnału oraz kilku czynników transkrypcyjnych, mających pod kontrolą całe grupy genów. Głównymi kinazami o charakterze sygnałowym są kinazy należące do rodzin **IRAK** (ang. *interleukin-1 receptor-associated kinase*), **TRAF** (ang. *TNF receptor-associated factor*), **MAPK** (ang. *mitogen-activated protein kinase*) oraz **IKK** (ang. *I κ B kinase*).

Docelowo, szlaki sygnałowe uruchamiane przez receptory TLR, RLR i NLR prowadzą do aktywacji kilku głównych czynników transkrypcyjnych: **NF κ B** (ang. *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*), **AP-1** (ang. *activator protein-1*) oraz **IRF 3, 7 i 5** (ang. *interferon regulatory factor*). Pierwsze dwa z tych czynników uruchamiają ekspresję setek genów odpowiedzialnych za produkcję cytokin, chemokin i enzymów zapalnych. Do najważniejszych związków tego typu należą: czynnik martwicy nowotworów (TNF α , ang. *tumor necrosis factor α*), interleukiny IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15 i IL-18, MIP-1 oraz MCP1, 2 i 3. Natomiast czynniki transkrypcyjne IRF3 i IRF7 regulują ekspresję genów kodujących interferony typu I, IFN- α i IFN- β [7].

Głównym efektem ekspresji genów znajdujących się pod kontrolą tych czynników transkrypcyjnych jest inicjacja i regulacja ostrej odpowiedzi zapalnej, a także aktywacja układu dopełniacza, pobudzenie aktywności fagocytów oraz apoptoza zainfekowanych komórek. Poza tym, w ostatnich latach przyznaje się coraz większą rolę receptorów PRR w regulacji nabytej odpowiedzi odpornościowej [8, 9].

3.2. Receptory Toll-podobne

3.2.1. Charakterystyka ogólna

Receptory Toll-podobne (TLR) stanowią rodzinę transbłonowych glikoprotein o zbliżonej, trójdomenowej strukturze oraz wysokiej homologii do białka Toll *Drosophila melanogaster*. Białko Toll związane jest z rozwojem zarodka muszki wzdłuż osi grzbietobrzusznej oraz odpornością muszki owocowej na infekcje grzybowe [10]. Białko rodziny Toll po raz pierwszy powiązано z odpornością u kręgowców pod koniec lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku [11-13]. Przeszukiwanie zsekwencjonowanych genomów kręgowców pozwoliło na wykrycie około stu genów receptorów TLR [14]. Geny kodujące receptory TLR odnaleziono również w genomach bezkręgowców tak

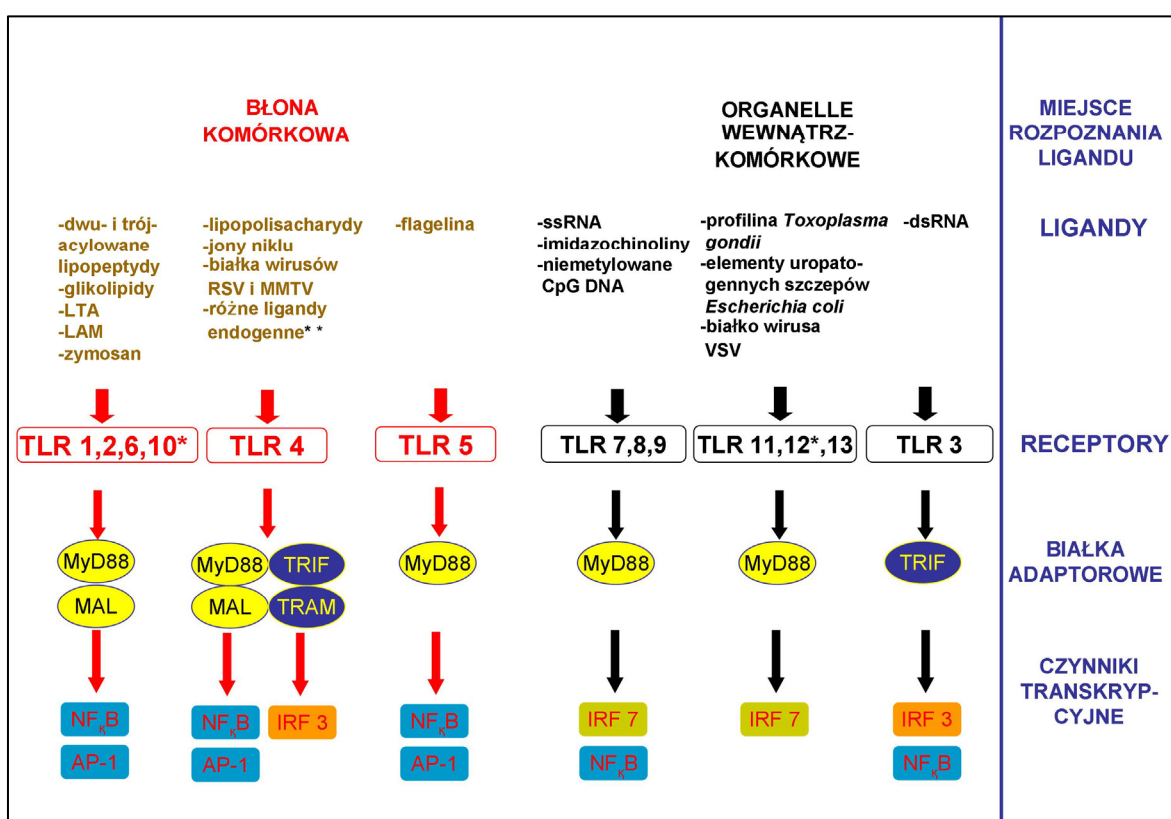
zróżnicowanych jak nicienie *Caenorhabditis elegans*, ostrogon *Tachypleus tridentatus* i jeżowiec *Strongylocentrotus purpuratus* [14-17]. Jako że białka strukturalnie i funkcjonalnie podobne do TLR wykryto nawet w roślinach wydaje się, że receptory te są jednym z najstarszych elementów mechanizmów obronnych wśród organizmów żywych [18].

Jak dotąd zidentyfikowano i opisano trzynaście receptorów TLR występujących u ssaków. Dwanaście z nich występuje u myszy, natomiast dziesięć u ludzi. Pogrupowano je w sześć rodzin na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej (**Ryc. 3.2**). Białka należące do tych podrodziny cechuje podobne, powolne tempo ewolucji, odzwierciedlające niewielką ewolucyjną zmienność rozpoznawanych przez nie cząsteczek PAMP. Każda podrodzina receptorów rozpoznaje generalnie jedną obszerną klasę PAMP, przy czym większość kręgowców posiada co najmniej jeden receptor z każdej z nich. Receptory TLR obecne są w komórkach układu odpornościowego, a także w komórkach nabłonka jelit (TLR4 i 5) i pęcherza moczowego, płuc, wątroby oraz nerek (TLR11) [19-22]. Niedawne odkrycia wykazały także obecność receptorów grupy TLR11-13 w komórkach ośrodkowego układu nerwowego ssaków [23, 24]. U ludzi cała podrodzina TLR11-13 jest obecna tylko w postaci pseudogenu (czemu przypisuje się wrażliwość ludzi na infekcje uropatogennymi szczepami *Escherichia coli*). U myszy natomiast nieaktywny jest gen kodujący TLR10 [14, 25, 26].

Poznane receptory TLR można też podzielić na dwie grupy ze względu na lokalizację w komórce (**Ryc. 3.2**). Receptory z podrodziny TLR1 (do której należy TLR1, 2, 6 i 10), TLR4 i TLR5 występują przede wszystkim w błonie komórkowej. Dzięki swojej lokalizacji na powierzchni komórek rozpoznają one elementy ścian komórkowych, otoczek i aparatów ruchu patogenów. Z drugiej strony, receptory z podrodziny TLR3, TLR7-9 i TLR11-13 zlokalizowane są w organellach wewnątrzkomórkowych, takich jak endosomy i biorą głównie udział w detekcji kwasów nukleinowych mikroorganizmów. Do niedawna uważano, że TLR11 jest receptorem powierzchniowym, ostatnie badania potwierdziły jego wewnątrzkomórkową lokalizację [27].

Poszczególne podrodziny TLR różnią się również pod względem doboru białek adaptorowych (**Ryc. 3.2**). Zidentyfikowano dotychczas pięć białek adaptorowych wykorzystywanych przez TLR: **MyD88** (ang. *myeloid differentiation primary response gene 88*), **TIRAP/Mal** (*TIR domain-containing adapter protein/ MyD88-adapter-like*), **TRIF/TICAM-1** (ang. *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β / TIR-containing adapter molecule 1*), **TRAM/TICAM2** (ang. *TRIF-related adapter molecule/ TIR-*

containing adapter molecule 2) oraz SARM (ang. *Sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein*), z których pierwsze cztery są używane w różnych kombinacjach w zapoczątkowaniu sygnału, natomiast SARM jest negatywnym regulatorem białka TRIF [28, 29]. Większość receptorów TLR, z wyjątkiem TLR3, uruchamia ścieżki sygnałowe z udziałem MyD88, podczas gdy TRIF włączony jest w przekazywanie sygnału tylko przez TLR3 i TLR4 [30, 31]. Wiązanie odmiennych białek adaptorowych przez receptory TLR prowadzi do uruchomienia różnych ścieżek sygnałowych, co stanowi jeden z mechanizmów pozwalających na lepsze dostosowanie odpowiedzi komórki do zaistniałego zagrożenia.



Ryc. 3.2. Klasyfikacja i właściwości receptorów TLR ssaków, opracowano wg [30, 31]

* Dla receptorów TLR10 i TLR12 nie zidentyfikowano jak dotąd ligandów.

** Wyniki badań sugerowały zdolność receptorów TLR4 i TLR2 do wiązania wielu endogennych ligandów, których obecność wskazuje na uszkodzenia tkanek. Postulowane ligandy tego typu to białka szoku cieplnego i elementy macierzy zewnątrzkomórkowej (np. kwas hialuronowy) [32, 33]. Inne badania postawiły jednak w wątpliwość te doniesienia, sugerując, że czynniki endogenne zwiększają jedynie wrażliwość komórek na śladowe ilości PAMP [34].

LTA – kwas lipotejchowy, LAM – lipoarabinomannan, RSV – ang. *respiratory syncytial virus*, MMTV – ang. *mous mammary tumor virus*, VSV – ang. *vesicular stomatitis virus*, ssDNA – jednoniciowy kwas deoksyrybonukleinowy, dsRNA – dwuniciowy kwas rybonukleinowy

3.2.2. Struktura receptora TLR4 i innych TLR

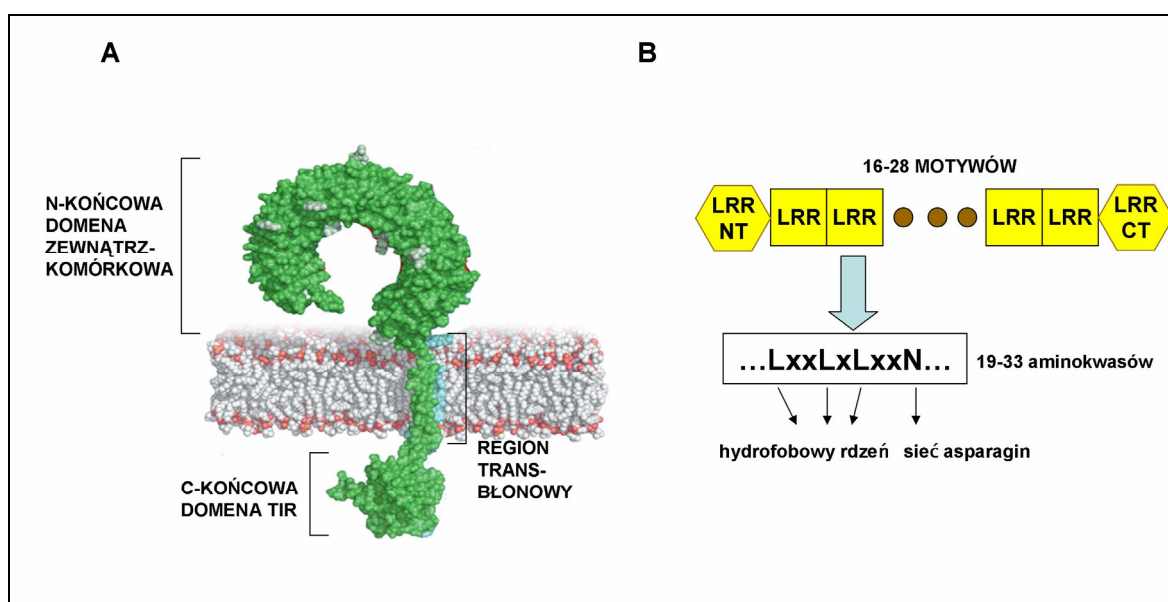
Receptory TLR są glikoproteinami typu I, posiadającymi pojedynczą transbłonową helisę, która łączy N-końcową domenę odpowiadającą za wiązanie ligandu z C-końcową domeną sygnałową (**Ryc. 3.3 A**). Analiza sekwencji i poznanej struktury krystalicznej kilku receptorów TLR wskazują na podobny, zachowany w ewolucji model ich budowy [35-37].

Domenę N-końcową określa się zazwyczaj mianem „zwnątrzkomórkowej”, choć należy pamiętać, że w przypadku receptorów zlokalizowanych wewnątrz komórki jest ona skierowana do światła organelli. Domena ta u wszystkich TLR zbudowana jest z 16-28 **powtórzeń bogatych w leucynę** (ang. LRR - *leucin rich repeats*) [38] (**Ryc. 3.3 B**). Receptor TLR4 zawiera 22 takie motywy. Jest to spotykany także w innych receptorach typ domeny zwnątrzkomórkowej, złożony z kilku do kilkudziesięciu motywów LRR, z których każdy posiada około 20-30 aminokwasów, w tym zachowaną ewolucyjnie sekwencję LxxLxLxxN (gdzie L - leucyna, N - asparagina, x - dowolny aminokwas) oraz region zmienny. Obecność tej sekwencji powoduje przyjęcie charakterystycznej dla TLR4 struktury, zwanej α/β podkową, stabilizowanej przez skierowane do środka cząsteczki łańcuchy boczne leucyny oraz sieć asparagin tworzących wiązania wodorowe. Regiony zmienne tworzą natomiast zwnętrzną, eksponowaną powierzchnię podkowy i mogą pełnić istotne role w interakcjach z ligandami [39].

Domeny zwnątrzkomórkowe wielu spośród poznanych receptorów TLR odpowiadają tej charakterystyce, właściwej dla tzw. rodziny „typowych” białek zawierających motywy LRR. Jednak w przypadku receptora TLR4, a także całej podrodziny TLR1, sekwencja aminokwasowa motywów LRR w centralnej części domeny zwnątrzkomórkowej odbiega od zachowanego ewolucyjnie wzorca. W motywach tych brak typowej sieci asparagin stabilizującej strukturę, czego konsekwencją jest podział domeny zwnątrzkomórkowej na trzy części, a także odsłonięcie wwnętrżnych kieszonek o charakterze hydrofobowym [40-42]. Postuluje się obecnie rolę tych strukturalnych odchyleń w dostosowaniu receptorów do wiązania ligandów o odmiennym charakterze chemicznym. Receptory o typowej strukturze, takie jak TLR3 i TLR7-9, wiążą ligandy hydrofilowe, takie jak kwasy nukleinowe, przy użyciu zwnętrżnej powierzchni domeny zwnątrzkomórkowej. Z drugiej strony, receptory o wydzielonych trzech subdomenach wykazują zdolność do wiązania ligandów hydrofobowych za pomocą odsłoniętych wwnętrżnych kieszonek o takim charakterze chemicznym. W taki właśnie sposób receptory TLR1, 2 i 6 rozpoznają dwu- i trójacylowane lipopeptydy i lipoproteiny bakteryjne [41]. Receptor TLR4 stanowi

szczególony przypadek. Jako jedyny poznany receptor z rodziny TLR nie wiąże on bezpośrednio swojego głównego ligandu, jakim jest lipopolisacharyd, lecz wymaga udziału koreceptora, białka MD-2 [43-45]. Uważa się, że odsłonięte kieszonki hydrofobowe w strukturze TLR4 pozwalają na dimeryzację receptora poprzez wiązanie jednego z lipidowych łańcuchów lipopolisacharydu (patrz 3.2.3.) [36, 46].

Należy też dodać, że receptory TLR, podobnie jak inne białka zawierające moduły LRR, posiadają bogate w cysteinę motywy LRRNT i LRRCT (na, odpowiednio, końcu N i C domeny zewnętrznej), które dodatkowo stabilizują całą strukturę domeny zewnątrzkomórkowej chroniąc jej hydrofobowy rdzeń. Kolejną właściwością TLR jest obecność zachowanych ewolucyjnie sekwencji aminokwasowych w domenie zewnątrzkomórkowej (głównie na jej powierzchni), w obrębie których zachodzi N-glikozyłacja. Modyfikacja ta pełni najprawdopodobniej istotne funkcje w procesie rozpoznawania ligandów, a także w lokalizacji i transporcie receptora [47].



Ryc. 3.3. **A** - Model monomeru receptora TLR w błonie komórkowej na przykładzie TLR3 (wg [48], zmodyfikowany). **B** - Schemat budowy domeny zewnątrzkomórkowej receptora TLR, zawierającej powtórzenia bogate w leucynę LRR (wg [36], zmodyfikowany). Sekwencja LxxLxLxxN tworzy równoległe β -nici stanowiące wewnętrzną, hydrofobową część domeny, zakończoną sekwencjami LRRNT i LRRCT. Pozostała część każdego motywu (region zmienny, niezaznaczony na schemacie) tworzy helisy i pętle składające się na zewnętrzną część domeny.

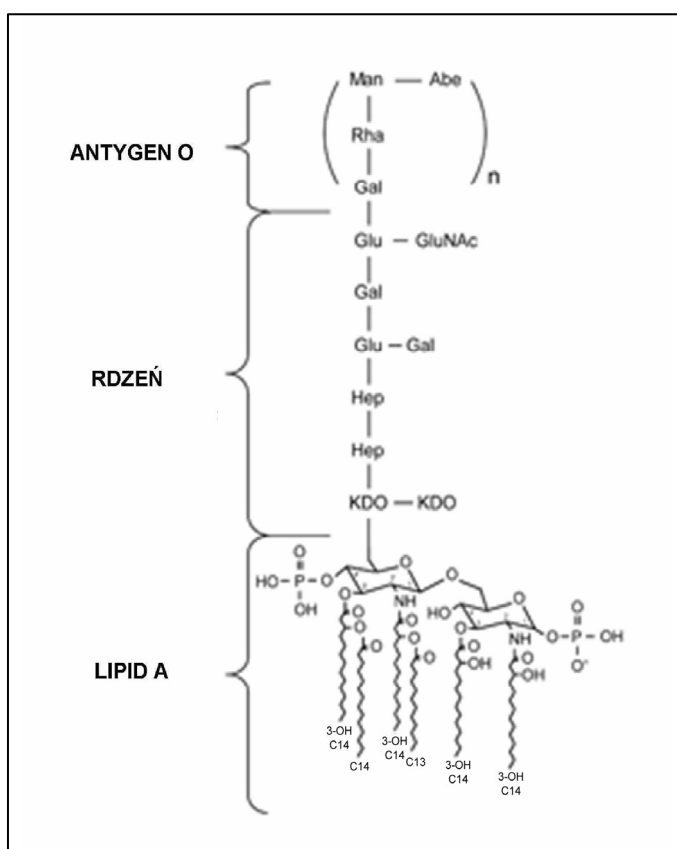
Domena cytoplazmatyczną receptorów TLR, odpowiedzialną za inicjację procesu przekazywania sygnału jest **domena TIR** (ang. *Toll/Il-1receptor homology domain*), występująca również w receptorach dla interleukin oraz białkach adaptorowych TLR (ze względu na jej obecność te trzy rodziny białek przyporządkowuje się do jednej

nadrodziny). Domena ta zbudowana jest z około 200 reszt aminokwasowych [28, 49]. Tworzą one centralnie umiejscowioną β -kartkę złożoną z pięciu nici, oznaczonych β A- β E, otoczoną pięcioma helisami, α A- α E. Pętle łączące te elementy, zwłaszcza pętla BB i DD, wystają ponad powierzchnię domeny i najprawdopodobniej odgrywają istotną rolę w jej multimeryzacji, która jest warunkiem utworzenia kompleksu sygnałowego [50, 51].

Poznanie struktur krystalicznych kilku receptorów TLR z różnych podrodzin w kompleksach z ich ligandami [40, 41, 48, 52] bądź antagonistami [42, 53] pozwoliło nie tylko na dostrzeżenie wspólnych dla wszystkich TLR właściwości, ale także na zaproponowanie ogólnego modelu aktywacji receptorów tej rodziny [36, 37]. Sekwencja zdarzeń pozostaje w znacznej mierze niezależna od charakteru chemicznego ligandu. Związanie ligandu powoduje jedynie lokalne, niewielkie odkształcenia konformacji receptora, pozwala jednak na jego dimeryzację, która, za wyjątkiem kompleksów TLR1-TLR2 i TLR2-TLR6, ma charakter homodimeryzacji. Pomimo różnic w miejscu wiązania ligandów pomiędzy różnymi TLR, powstający kompleks ma zasadniczo ten sam kształt, przypominający literę M, co spowodowane jest zbliżeniem do siebie domen zewnątrzkomórkowych w rejonie przybłonowym. Prowadzi to do zbliżenia cytoplazmatycznych domen TIR obu podjednostek dimeru i ustawieniem ich w orientacji promującej ich dimeryzację. Towarzyszą temu zmiany konformacyjne domeny TIR receptora umożliwiające przyłączenie domen TIR białek adaptorowych i utworzenie kompleksu sygnałowego z kinazami pierwszego rzędu, takimi jak IRAK [37, 54]. Niedawne badania sugerują, że receptor TLR4 różni się pod tym względem od innych TLR. Domeny cytoplazmatyczne i transbłonowe TLR4 wykazują immanentną zdolność do silnej, konstytutywnej dimeryzacji, w przeciwieństwie do innych receptorów tej rodziny [55, 56]. Rolą domeny zewnętrznej w tym układzie jest hamowanie tych interakcji, dopóki nie zostanie związany specyficzny ligand – lipopolisacharyd. Wydaje się, że taki układ prowadzi do znacznie silniejszej aktywacji komórek niż w przypadku pozostałych receptorów TLR. Badania nad konstytutywnie aktywnymi receptorami TLR, których domenę zewnątrzkomórkową zastąpiono domeną białka CD4, pozwoliły ustalić, że TLR4 kilkusetkrotnie silniej aktywuje promotory genów prozapalnych niż pozostałe receptory tej rodziny [57].

3.2.3. Rozpoznawanie lipopolisacharydów przez receptor TLR4

3.2.3.1 Struktura lipopolisacharydu



Ryc. 3.4. Ogólny model struktury cząsteczki lipopolisacharydu. Głównym źródłem zmienności jest obecność i struktura antygenu O, modyfikacje w obrębie oligosacharydu rdzeniowego, fosforylacja glukozoamin oraz ilość i długość podstawionych reszt kwasów tłuszczowych w lipidzie A. Te dwa ostatnie czynniki odgrywają rolę w interakcji LPS z kompleksem TLR4-MD-2.

(źródło:

<http://digitalunion.osu.edu/r2/summer08/mconroy/>, zmienione)

KDO - kwas 3-deoksy-D-manno-2-oktoluzonowy, Hep - L-glicero-D-mannoheptoza, Glu - glukoza, Gal - galaktoza, Man - mannoza, Rha - ramnoza, GluNAc - kwas N-acetyloglutaminowy, Abe - abekwoza (3,6-dideoksy-D-ksylo-heksoza)

Lipopolisacharydy to zbiorcze określenie dla grupy związków o zbliżonej strukturze (Ryc. 3.4.), które stanowią główny składnik zewnętrznego listka błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych [58]. Ze względu na istotną rolę, jaką pełnią w utrzymywaniu struktury komórki bakteryjnej, ich budowa została w znacznym stopniu zachowywana w toku ewolucji, stanowiąc modelowy przykład PAMP. LPS silnie aktywuje komórki wrodzonego układu odpornościowego, wywołując odpowiedź zapalną. Nadmierna reakcja na LPS i obecność jego dużych stężeń może prowadzić do ogólnoustrojowej reakcji zapalnej zwanej *sepsą* [59]. *Ciężka sepsa* wiąże się z wystąpieniem zagrażających życiu zaburzeń czynności podstawowych narządów, a następująca niewydolność układu sercowo-naczyniowego jest podstawą zdiagnozowania *szoku septycznego*.

Rozpoznanie lipopolisacharydu jest wieloetapowym procesem i wymaga współdziałania szeregu białek – LBP (ang. *LPS-binding protein*), CD14 (ang. *cluster of differentiation 14*) oraz kompleksu białek TLR4/MD-2. Dopiero w 1998 roku wykryto, że receptor TLR4 odpowiada za inicjację kaskad sygnałowych w odpowiedzi na LPS [12].

Wcześniejsze prace wskazywały na udział w tym procesie innych receptorów, takich jak integryny CD11/CD18 i białko regulatorowe układu dopełniacza CD55 [60, 61]. Postulowano również rolę receptorów z rodziny zmiataczy, takich jak mysi receptor Cla-1 i ludzki receptor CD36 [62-64].

LPS składa się z trzech części: łańcucha polisacharydowego zwanego antygenem O, rdzenia oraz lipidu A, zakotwiczonego cząsteczkę LPS w błonie zewnętrznej bakterii [65] (Ryc. 3.4).

Antygen O składa się z reszt cukrowych, których skład i liczba podlegają znacznemu zróżnicowaniu. Zidentyfikowano ponad 60 reszt cukrowych oraz 30 modyfikujących je elementów niecukrowych spotykanych w łańcuchach O-swoistych. Najczęściej spotykane cukry tworzące łańcuch to heksozy, takie jak glukoza, fruktoza, galaktoza, mannoza i ramnoza. U niektórych gatunków, bądź też w specyficznych warunkach wzrostu, łańcuch O-swoisty może nie występować, bądź występować w skróconej formie. Skutkuje to tzw. „szorstkim” (ang. rough) fenotypem kolonii bakterii, w odróżnieniu od typowego fenotypu kolonii „gładkich” (ang. smooth) [66]. Najczęściej uznaje się, że długość i skład cukrowy antygeny O nie ma wpływu na biologiczną aktywność LPS, a jego duża zmienność powoduje, że nie jest on dobrym celem dla receptorów z grupy PRR. Niemniej jednak, całkowity brak łańcucha O-swoistego moduluje proces rozpoznawania LPS przez komórki wrodzonego układu odpornościowego, co zaobserwowano w przypadku LPS z bakterii z rodzaju *Brucella* i *Salmonella*, a także *Escherichia coli* [67-69]. LPS tego typu, w przeciwieństwie do LPS z pełnym łańcuchem O-swoistym, aktywuje niektóre reakcje komórki bez udziału białka CD14 [68, 70].

Rdzeń cząsteczki LPS ma charakter oligosacharydu. Zawiera resztę kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (KDO), która przyłączona jest do proksymalnej reszty glukoaminy lipidu A. Reszty kwasu KDO są zwykle podstawione przez kolejne reszty kwasu KDO oraz reszty L-glicero-D-mannoheptozy (Hep). Układ 1-3 KDO i 2-3 Hep tworzy tzw. „wewnętrzny rdzeń”, do którego dołączone są zazwyczaj trzy heksozy („zewnętrzny rdzeń”). Struktura tej części jest znacznie mniej zmienna niż w przypadku antygeny O, może jednak zawierać różne modyfikacje. Uważa się, że oligosacharyd rdzeniowy nie jest istotny dla pełnej biologicznej aktywności LPS, może jednak mieć modulujący efekt [71].

Lipid A jest najlepiej zachowaną ewolucyjnie częścią cząsteczki lipopolisacharydu. Jest to również część rozpoznawana przez receptory układu odpornościowego, odpowiada ona zatem za prozapalną aktywność LPS [72, 73]. Podstawą budowy lipidu A są dwie

cząsteczki glukozaminy połączone wiązaniem glikozydowym β -1-6. Do tego cukrowego szkieletu dołączonych jest, w zależności od gatunku bakterii, 4-7 reszt kwasów tłuszczowych o zróżnicowanej długości. Ilość i długość podstawionych reszt kwasów tłuszczowych jest głównym źródłem heterogenności lipidu A wśród bakterii i jednocześnie najistotniejszym czynnikiem wpływającym na aktywność biologiczną LPS. Obecność sześciu łańcuchów węglowych zawierających 12-14 atomów węgla stanowi optymalną strukturę z punktu widzenia aktywacji komórek, a dodanie lub usunięcie tylko jednego łańcucha obniża aktywność prozapalną LPS ponad stukrotnie [71, 74]. Drugim ważnym czynnikiem warunkującym pełną zdolność LPS do aktywacji układu odpornościowego jest fosforylacja glukozaamin przy 1 i 4 atomie węgla [75]. Obie te właściwości strukturalne mają decydujący wpływ na siłę wiązania LPS z białkami MD-2 i TLR4.

3.2.3.2 Białka wiążące LPS

LPS ma charakter amfipatyczny i w środowisku wodnym tworzy micelle, blokujące dostęp lipidu A do receptorów. Spontaniczne dyfuzja LPS z micelli do receptorów zachodzi bardzo powoli [76]. W procesie oderwania monomerów LPS z micelli, lub bezpośrednio z błony zewnętrznej bakterii uczestniczą białka ostrej fazy: **LBP** i **BPI**, występujące w osoczu. LBP jest glikoproteina o masie cząsteczkowej 60 000, która wiąże pojedyncze cząsteczki LPS i katalizuje ich transport do białka CD14 [76-79]. Blisko spokrewnione i podobne strukturalnie białko BPI (ang. *bactericidal/permeability-increasing protein*) znacznie silniej wiąże LPS, nie przekazuje go jednak na CD14. Postuluje się natomiast jego rolę w procesie detoksykacji lipopolisacharydu [80]. Białka ostrej fazy oraz CD14 pozwalają na koncentrację cząsteczek LPS przed przekazaniem ich na kompleks TLR4/MD-2, co pozwala na silną i szybką odpowiedź komórki nawet przy niewielkich stężeniach lipopolisacharydu w środowisku (1 ng/ml i mniejszych).

CD14 to białko o masie cząsteczkowej 56 000, w części zewnątrzkomórkowej zawierające powtórzenia LRR, w czym przypomina receptory TLR. CD14 tworzy homodimery i w tej postaci wiąże LPS za pomocą hydrofobowej kieszonki zlokalizowanej na zewnętrznej powierzchni dimeru [81]. CD14 jest pozbawione domeny transbłonowej i cytoplazmatycznej. Jest ono zakotwiczone w zewnętrznej warstwie błony komórkowej poprzez łącznik glikozylofosfatydiloinozytolu (GPI), zlokalizowany na końcu C białka [81, 82]. Zewnątrzkomórkowa fosfolipaza C może katalizować hydrolizę wiązania estrowego, które wiąże grupę acylową, zakotwiczającą CD14 w błonie komórkowej, z

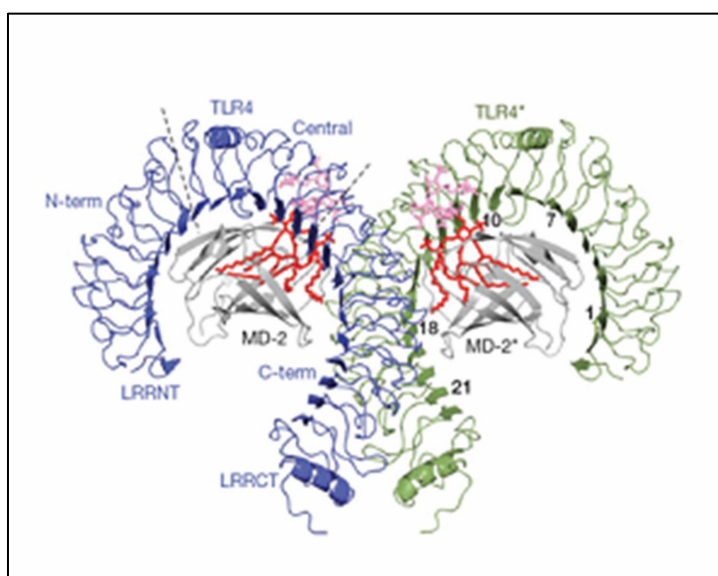
pozostałym fragmentem łącznika GPI. Prowadzi to do uwolnienia CD14 do formy rozpuszczalnej (sCD14), która umożliwia rozpoznanie LPS przez komórki pozbawione CD14 w formie białka błonowego (mCD14). sCD14 może także powstawać na drodze niezależnej od fosfolipazy, poprzez pominięcie potranslacyjnej modyfikacji dodającej kotwicę GPI i bezpośrednie wydzielenie do środowiska [83].

Obecność kotwicy GPI w błonowej formie CD14 wskazuje na powiązanie tego receptora z tzw. tratwami lipidowymi. Są to mikrodomeny błony komórkowej wzbogacone w sfingolipidy i cholesterol, które wyodrębniają się z otoczenia bardziej płynnych obszarów błony zawierających głównie glicerofosfolipidy [84, 85]. Tratwy lipidowe są mikrorejonami błony komórkowej, w których gromadzą się wybrane receptory oraz kinazy biorące udział w transdukcji sygnału [86, 87]. Kluczowe znaczenie tego zjawiska dla generacji ścieżek sygnałowych zostało potwierdzone w przypadku takich receptorów układu odpornościowego jak BCR (ang. *B cell receptor*), TCR (*T cell receptor*) oraz receptorów Fc [88-90]. Zakotwiczenie CD14 w tratwach lipidowych sugeruje istnienie podobnego mechanizmu w procesie formowania kompleksu sygnałowego CD14/MD-2/TLR4 [91].

Najczęściej przyjmuje się, że CD14 razem z LBP pełnią rolę „anteny”, efektywnie wychwytyjącej lipopolisacharyd i przekazującej go na TLR4 [92-94]. Ze względu na udział CD14 w wiązaniu LPS białko to jest często nazywane receptorem LPS, pomimo braku sekwencji sygnałowej i w takim rozumieniu określenie to jest stosowane w tej rozprawie. Wiele badań wskazuje, że CD14 może pełnić również inne funkcje w procesie stymulacji komórek przez lipopolisacharyd. CD14 kontroluje internalizację aktywowanego receptora TLR4 prowadzącą do uruchomienia jednej z jego ścieżek sygnałowych (patrz 3.2.4.3) [95]. CD14 może też brać udział w pobieraniu LPS przez komórki na drodze nieprowadzącej do ich aktywacji, lecz pozwalającej na detoksykację endotoksyny i zmniejszenie jej stężenia w środowisku [96, 97].

Przekazanie LPS z CD14 na **kompleks TLR4/MD-2** stanowi ostatni etap rozpoznania tej cząsteczki i rozpoczyna proces transdukcji sygnału [43, 98]. MD-2 posiada rzadko spotykaną strukturę β -kubka (ang. β -cup), zbudowaną z dwóch równoległych β -kartek, które tworzą obszerną kieszonkę wiążącą lipidową część cząsteczki lipopolisacharydu [53]. Samo MD-2 jest powiązane z zewnętrzną powierzchnią receptorów TLR4 za pomocą wiązań wodorowych i jonowych. Po związaniu LPS do kieszonki MD-2 dochodzi do utworzenia kompleksu złożonego z dwóch heterodimerów TLR4/MD-2 (**Ryc. 3.5**). Cząsteczka lipopolisacharydu pełni w tym procesie rolę mostka: w przypadku optymalnej

struktury LPS, zawierającej sześć reszt kwasów tłuszczowych, pięć z nich wypełnia kieszonkę MD-2, podczas gdy szósty jest częściowo odsłonięty i wchodzi w interakcje z hydrofobową kieszonką drugiej cząsteczki TLR4. Wiązanie to jest dodatkowo stabilizowane przez dwie grupy fosforanowe lipidu A, które tworzą jonowe i wodorowe wiązania z resztami lizyny i argininy na powierzchni sąsiadujących TLR4 i MD-2 [36, 37].

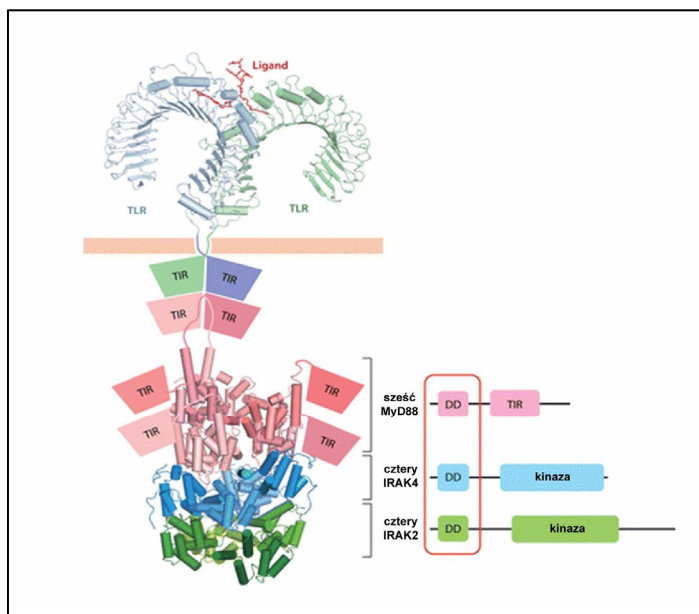


Ryc. 3.5. Struktura kompleksu TLR4/MD-2 po związaniu LPS. Przedstawione są tylko zewnątrzkomórkowe domeny receptorów TLR4. Lipid A został oznaczony czerwoną linią. Pięć z sześciu reszt kwasów tłuszczowych pogrążonych jest w kieszonce MD-2, szósty wchodzi w interakcje z resztami fenyloalanin na sąsiadującej cząsteczce TLR4. Kompleks przyjmuje charakterystyczną, M-kształtną strukturę. (źródło: [36])

Bezpośrednie oddziaływania między cząsteczkami TLR4 pozostają natomiast słabe, pomimo ich zbliżenia. Model ten pozwala zrozumieć znaczenie roli modyfikacji strukturalnych lipidu A dla aktywności biologicznej LPS, jako że brak grup fosforanowych lub odstępstwa od optymalnej liczby podstawionych reszt kwasów tłuszczowych nie pozwalają na uformowanie stabilnego kompleksu sygnałowego.

Po dimeryzacji TLR4 cały kompleks przyjmuje charakterystyczny dla receptorów Toll-podobnych układ, przypominający literę M. Tak jak opisano w 1.2.2, prowadzi to do zmian w orientacji domen zewnątrzkomórkowych w rejonie przybłonowym co umożliwia homodimeryzację cytoplazmatycznych domen TIR i utworzenie kompleksu sygnałowego, zawierającego białko adaptorowe MyD88. W interakcji MyD88 z receptorem TLR4 pośredniczy dodatkowo białko adaptorowe Mal/TIRAP [99, 100]. Białko MyD88 posiada domenę TIR analogiczną do obecnej w TLR, która pozwala na oddziaływanie z receptorem oraz zlokalizowaną na końcu C domenę śmierci DD (ang. *death domain*), poprzez którą wchodzi w interakcje z kinazami IRAK2 i IRAK4. Cytoplazmatyczne domeny receptorów TLR4, białka adaptorowe oraz kinazy IRAK2 i IRAK4 tworzą kompleks sygnałowy nazywany myddosomem [101].

Uformowanie tego kompleksu pozwala na fosforylację kinaz IRAK i uruchomienie sygnału wewnątrzkomórkowego na pierwszej z dwóch aktywowanych przez LPS ścieżek: ścieżce zależnej od MyD88 (**Ryc. 3.6**). Uruchomienie drugiej ze ścieżek sygnałowych, zachodzącej bez udziału MyD88, ale zależnej od białka adaptorowego TRIF, wymaga internalizacji receptora TLR4 [102].



Ryc. 3.6. Związanie ligandu powoduje dimeryzację zewnętrznej domeny receptora TLR4, a konsekwencji multimeryzację domen TIR receptorów i białek adaptorowych. Do powstającego kompleksu wiążą się za pomocą domen DD cztery cząsteczki kinazy IRAK2 i cztery cząsteczki kinazy IRAK4. Stwierdzona obecność sześciu cząsteczek MyD88 w myddosomie może wskazywać na ich oddziaływanie z kompleksami tworzonymi przez inne dimery receptorów, sugerując tworzenie przez nie skupisk wyższego rzędu [36, 101]. (źródło: [36])

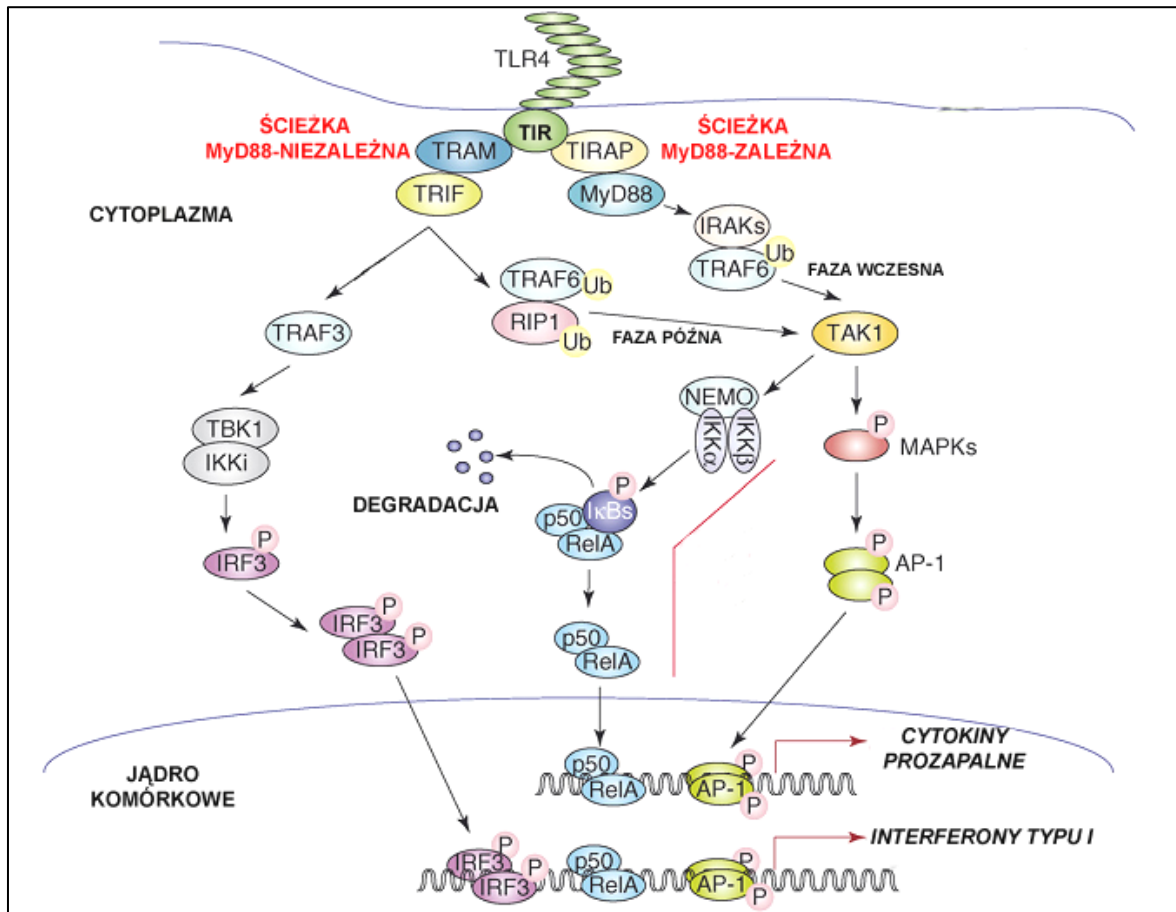
3.2.4. Ścieżki sygnałowe aktywowane przez lipopolisacharydy

3.2.4.1. Ścieżka zależna od MyD88

Ścieżka sygnałowa zależna od białka adaptorowego MyD88 jest charakterystyczna dla nieomal wszystkich receptorów TLR, za wyjątkiem TLR3 [103]. Na ścieżce tej dochodzi do aktywacji transkrypcji genów cytokin prozapalnych, przy użyciu dwóch czynników transkrypcyjnych, NFκB oraz AP-1. **NFκB** to homo- lub heterodimerski kompleks białkowy złożony z dwóch białek należących do rodziny Rel. Najczęściej spotykany w komórkach i aktywowany na szlakach sygnałowych receptorów TLR jest heterodimer złożony z podjednostek p50/NFκB1 oraz p65/RelA, który jest silnym aktywatorem transkrypcji wielu genów. Kompleks ten występuje w cytoplazmie, a jego translokacja do jądra komórkowego jest hamowana przez interakcje z białkami rodziny IκB (ang. *inhibitor of NFκB*) (**Ryc. 3.7**). **AP-1** (ang. *activator protein*) jest natomiast dimerycznym białkiem, którego podjednostki należą do jednej z czterech rodzin białkowych: Jun, Fos, Maf i ATF (ang. *activating transcription factor*) [104]. Aktywowany AP-1, typowo wskutek

fosforylacji przez kinazy MAPK, uruchamia transkrypcję wielu genów związanych m.in. z proliferacją, różnicowaniem komórek, odpornością i apoptozą [105]. Stwierdzono, że na ścieżce zależnej od MyD88 dochodzi także do aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF1 i IRF5, chociaż odpowiedzialne za ten proces molekularne mechanizmy nie zostały jak dotąd dokładnie opisane [106, 107].

Proces transdukcji sygnału receptora TLR4 rozpoczyna się od uformowania kompleksu sygnałowego za pomocą domen TIR i DD homodimeru receptorów, białek adaptorowych TIRAP i MyD88 oraz kinaz IRAK. Pierwszym zdarzeniem sygnałowym na tej ścieżce jest fosforylacja kinazy IRAK1 przez IRAK4, prawdopodobnie także przy udziale IRAK2 [108]. Aktywowane białko IRAK1 oddysocjowuje od kompleksu receptorowego i wchodzi w interakcje z kinazą TRAF6 (ang. *tumor necrosis factor receptor associated factor 6*) (**Ryc. 3.7**). Białko to posiada na końcu N domenę RING (ang. *really interesting new gene*), która nadaje mu aktywność ligazy ubikwityny E3. TRAF6, aktywowany przez IRAK1, tworzy kompleks z białkami Ubv13 i Uev1A, czego konsekwencją jest poliubikwitynacja obu kinaz (IRAK1 i TRAF6) oraz aktywacja kolejnego przekaźnika sygnału, kinazy TAK1 (ang. *transforming growth factor β -associated kinase-1*), występującej w kompleksie z białkami TAB1/2/3 (ang. *TAK1-binding protein*) [5, 109]. Aktywowany przez ubikwitynację i fosforylację TAK1 jest zdolny do dalszej fosforylacji substratów z dwóch głównych grup kinaz: **IKK** (kinaza inhibitora czynnika NF κ B, ang. *inhibitor of NF κ B kinase*) oraz **MAPK** (kinaza aktywowana miogenami, ang. *mitogen-activated protein kinase*) [110, 111]. IKK to kompleks złożony z trzech białek (IKK α , IKK β oraz elementu regulatorowego, IKK γ /NEMO), który fosforyluje białka I κ B na resztach seryny. Prowadzi to do ich poliubikwitynacji i degradacji przez proteasom 26S, co pozwala uwolnionemu czynnikowi NF κ B na translokację do jądra i uruchomienie ekspresji docelowych genów [112]. Natomiast rodzina kinaz serynowo-treoninowych MAPK odpowiada głównie za aktywację czynnika AP-1 (**Ryc. 3.7**). Charakterystyczny dla tej rodziny jest sposób transdukcji sygnału na drodze tzw. kaskady kinaz MAP, stanowiącej układ trzech kinaz (MAP3K-MAP2K-MAPK) aktywowanych sekwencyjnie. W odpowiedzi na lipopolisacharyd aktywacji ulegają kinazy z trzech głównych grup MAPK spotykanych u ssaków: białka ERK1/2 (ang. *extracellular signal regulated kinase*), p38 oraz JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*), jednak nie wszystkie elementy kaskad MAP biorących udział w przekazywaniu sygnału na ścieżce MyD88-zależnej zostały zidentyfikowane [113, 114]. Do tej pory potwierdzono udział białek MKK3 i MKK6 jako kinaz bezpośrednio aktywowanych przez TAK1 [115, 116].



Ryc. 3.7. Ścieżki sygnałowe receptora TLR4 aktywowane przez LPS. Związanie MyD88 i TIRAP do domen TIR receptora TLR4 prowadzi do wczesnej aktywacji NFκB i AP-1 na szlaku przekaźników IRAK4-IRAK1-TRAF6-TAK1-IKK/MAPK i produkcji cytokin prozapalnych. Związanie TRIF i TRAM uruchamia ścieżkę MyD88-niezależną, prowadzącą do aktywacji IRF3 i produkcji interferonów typu I na szlaku TRAF3-TANK-TBK1-IKKi. Jednocześnie, interakcja TRIF z TRAF6 przy udziale białka RIP-1 pozwala na opóźnioną aktywację NFκB i łączy obie ścieżki. NFκB przedstawiony jest jako dimer białek p50 i RelA. Schemat nie uwzględnia roli internalizacji receptora w inicjacji ścieżki MyD88-niezależnej. Źródło: [112], zmienione.

3.2.4.2. Ścieżka niezależna od MyD88 (zależna od TRIF)

Drugą ścieżką przekazywania sygnału receptora TLR4 jest ścieżka niezależna od MyD88, zwana również ścieżką zależną od białka adaptorowego TRIF (Ryc. 3.7). Ścieżka ta jest inicjowana tylko przez receptory TLR3 i TLR4, przy czym TLR4 wymaga do jej uruchomienia dodatkowego białka adaptorowego TRAM, które pośredniczy w interakcji między receptorem TLR4 i białkiem adaptorowym TRIF [117, 118]. Ścieżka ta odgrywa główną rolę w aktywacji ekspresji genów interferonów typu I (IFNα i IFNβ), poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych IRF (ang. *interferon regulatory factor*): **IRF3** i,

w mniejszym stopniu, **IRF7**. Białka te są obecne w nieaktywnej formie w cytoplazmie, natomiast po ufosforylowaniu w regionach C-końcowych ulegają homodimeryzacji i przemieszczają się do jądra, gdzie wraz z NFκB i AP-1 tworzą kompleks wiążący się do regionu promotorowego i wzmacniającego docelowych genów [112, 119] (**Ryc. 3.7**).

Związanie białek adaptorowych TRIF i TRAM z domenami cytoplazmatycznymi TLR4 rozpoczyna tworzenie kompleksu sygnałowego z białkami odpowiedzialnymi za fosforylację czynnika IRF3. Wykazano, że niezbędne w tym procesie jest białko TRAF3, pełniące rolę pomostu między TRIF i kolejnymi kinazami [112, 120]. Do TRAF3 wiąże się białko TANK (ang. *TRAF family member-associated NFκB activator*), które wchodzi w interakcje z kinazą TBK1 (ang. *TANK binding kinase-1*). TBK1 z kolei tworzy kompleks z kinazą IKKε/IKKi i w tej postaci białka te fosforylują czynniki transkrypcyjne IRF [121]. W procesie aktywacji IRF3 biorą prawdopodobnie udział także inne białka, jak na przykład Akt, który również wiąże się z TBK1 [122].

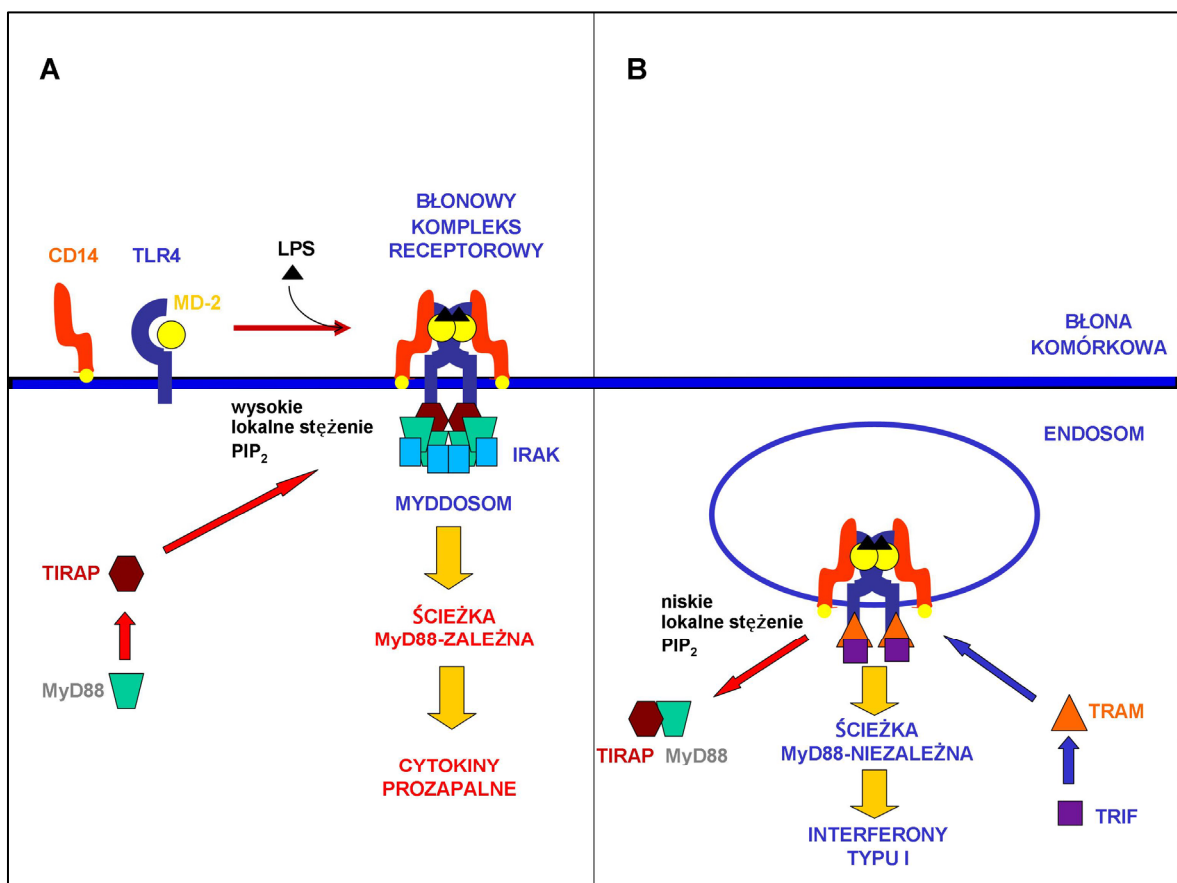
Na ścieżce zależnej od TRIF, oprócz fosforylacji IRF3 i IRF7 dochodzi również do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB. Jest to możliwe dzięki obecności w N-końcowym regionie cząsteczki TRIF motywów wiążących TRAF6 [123]. Pozwala to na aktywację kinazy TAK1 i kolejnych przekaźników wg schematu opisanego powyżej dla ścieżki MyD88-zależnej (**Ryc. 3.7**). Dodatkowo, TRIF zdolny jest również do wiązania białka RIP1 (ang. *receptor-interacting protein 1*). Uważa się obecnie, że TRIF, TRAF6 i RIP1 tworzą kompleks, który jest odpowiedzialny za zależną od ubikwitynacji aktywację TAK1 [30]. Sugeruje się, że ścieżka TRIF-zależna odpowiada za późną aktywację NFκB, związaną z autokrynną aktywacją komórek przez TNFα, podczas gdy ścieżka MyD88-zależna prowadzi do wczesnej, szybkiej aktywacji NFκB bezpośrednio po związaniu lipopolisacharydu [112, 124]. Niemniej jednak, transdukcja sygnału na obu ścieżkach jest wymagana do pełnej aktywacji produkcji cytokin prozapalnych w odpowiedzi na LPS (**Ryc. 3.7**).

3.2.4.3. Rola internalizacji receptora TLR4 w sekwencyjnej aktywacji ścieżek sygnałowych

Obecność receptora TLR4 w organellach wewnątrzkomórkowych, takich jak aparat Golgiego, oraz jego internalizacja były obserwowane już we wczesnej fazie badań nad tym receptorem [125, 126]. Mimo to, przez wiele lat uważano, że receptor ten aktywuje obie ścieżki sygnałowe jako białko błony komórkowej. Uważano to za wyjątkową właściwość

receptora TLR4, jako że wszystkie inne poznane PRR (w tym pozostałe TLR, patrz **Ryc. 3.2**) zdolne do aktywacji produkcji interferonów, inicjują transdukcję sygnału z błony organeli wewnątrzkomórkowych bądź z cytoplazmy.

Alternatywny model uruchamiania ścieżek sygnałowych przez TLR4 został zaprezentowany w 2008 roku przez Kagana i współpracowników [102]. Model ten zakłada, że aktywacja ścieżek MyD88-zależnej i –niezależnej jest rozdzielona w czasie i przestrzeni (**Ryc. 3.8**). Kluczowym wydarzeniem regulującym generację sygnału na ścieżce niezależnej od MyD88 jest internalizacja receptora TLR4. Według proponowanego modelu, błonowy kompleks receptorowy złożony z CD14, TLR4 i MD-2 formuje się w rejonach błony komórkowej bogatych w fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bisfosforan (PI(4,5)P₂ (ang.- *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*). Obecność domeny wiążącej PI(4,5)P₂ w



Ryc. 3.8. Schemat sekwencyjnej aktywacji ścieżek sygnałowych TLR4 regulowanej przez internalizację receptora.

A – Związanie lipopolisacharydu prowadzi do utworzenia kompleksu receptorowego przez CD14, TLR4 i MD-2. Wysokie lokalne stężenie PI(4,5)P₂ pozwala na wiązanie białka adaptorowego TIRAP, który z kolei wiąże MyD88, a następnie kinazy IRAK. Formuje się myddosom rozpoczynając transdukcję sygnału na ścieżce MyD88-zależnej.

B – Po internalizacji receptora stężenie PI(4,5)P₂ w błonie endosomu spada, co powoduje oddysocjowanie kompleksu TIRAP-MyD88. Do uwolnionych domen TIRAP receptora wiążą się białka adaptorowe TRAM oraz TRIF, rozpoczynając przekazywanie sygnału na ścieżce niezależnej od MyD88.

obrębie białka adaptorowego TIRAP umożliwia jego asocjację z błoną komórkową, co z kolei ułatwia interakcję domen TIR tego białka, MyD88 i receptora TLR4. Po aktywacji ścieżki zależnej od MyD88 dochodzi do internalizacji receptora TLR4. W błonie powstającego endosomu znacząco spada stężenie PI(4,5)P₂, na skutek czego kompleks MyD88-TIRAP oddysocjowuje od receptorów TLR4. Umożliwia to z kolei przyłączenie drugiego zestawu białek adaptorowych, TRAM i TRIF i aktywację ścieżki TRIF-zależnej. Warto zauważyć, że białko TRAM pozbawione jest domeny wiążącej PI(4,5)P₂, dlatego nie oddziałuje ono z błoną komórkową i nie konkuruje z MyD88 w wiązaniu domen TIR receptorów TLR4.

Białka TIRAP i TRAM odgrywają zatem rolę „sortujących” adaptorów, zapewniających uruchomienie kaskad sygnałowych z konkretnych przedziałów komórki. Zbliżony model przestrzennej regulacji aktywacji opisano również w przypadkach innych receptorów, takich jak EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu – ang. *epidermal growth factor receptor*) i TNFR (receptor czynnika martwicy nowotworów – ang. *tumor necrosis factor receptor*) [127, 128].

Powyższy model pozostawia otwartą kwestię inicjacji i regulacji internalizacji receptora TLR4 oraz ścieżki endocytozy, na której może ona zachodzić. Nieliczne dane wskazują na udział w tym procesie dynaminy (patrz 3.3), co sugeruje endocytozę TLR4 na ścieżce zależnej od tego białka, podobnie jak ma to miejsce w przypadku EGFR i receptora transferyny [102, 129, 130]. Doniesienie z roku 2011 wskazuje natomiast, że internalizacja TLR4 jest zależna od białka CD14 i zachodzi na związanej z makropinozytozą ścieżce endocytozy, kontrolowanej przez aktywność kinazy tyrozynowej Syk, fosfolipazę PLCγ2 oraz napływ jonów Ca²⁺ do komórki [131]. Należy jednak zwrócić uwagę, że w tych badaniach stymulowano komórki wysokim stężeniem LPS (1000 ng/ml), które indukuje mechanizmy prowadzące raczej do wyłączenia niż stymulacji odpowiedzi prozapalnej indukowanej przez LPS (patrz 3.2.5). W internalizacji TLR4 postuluje się udział innych białek, takich jak receptory DAP12 (ang. *DNAX-activating protein of molecular mass 12 kilodaltons*) oraz FcεRIγ [132, 133].

TLR4 pojawia się też w błonie fagosomów, w obrębie których internalizowane są bakterie *Escherichia coli*. Proces ten prowadzi do uruchomienia TRIF-zależnej ścieżki sygnałowej i syntezy interferonów typu I [134]. Autorzy tego doniesienia przytoczyli też dowody sugerujące rozwiązanie problemu transportu TLR4 do błony fagosomów - receptor może pochodzić z frakcji wczesnych endosomów, a zjawisko transportu TLR4 z błon wczesnych endosomów do błony fagosomów kontrolowane jest, ich zdaniem, przez

GTPazę Rab11. Wątek ten wspierają inne doniesienia, według których kompleks TLR4/MD-2, konstytutywnie obecny wewnątrz komórek makrofagów, jest w stanie rozpoznawać LPS i inicjować TRIF- i MyD88-zależne ścieżki sygnałowe z błony organeli wewnątrzkomórkowych [135, 136].

Szlak endocytarny współuczestniczy też w wygaszaniu aktywacji receptora TLR4. Receptor TLR4 przemieszcza się do późnych endosomów i lizosomów i podlega degradacji w ich obrębie. W procesie tym bierze udział inna GTPaza z rodziny Rab (ang. *Ras-related protein*) - białko Rab7b, asocjujące z błoną lizosomów. Aktywność tego białka odgrywa istotną rolę w promowaniu degradacji TLR4 i negatywnej regulacji transdukcji sygnału tego receptora [137].

Z powyższego przeglądu danych literaturowych wyłania się fragmentaryczny i niespójny obraz możliwych mechanizmów internalizacji TLR4 oraz roli tego procesu w aktywacji komórek przez LPS.

3.2.5. Negatywna regulacja przekazywania sygnału przez receptor TLR4

Aktywacja receptora TLR4 przez lipopolisacharyd prowadzi do bardzo silnej ekspresji genów prozapalnych [57]. Sepsa, będąca bezpośrednią konsekwencją niezdolności organizmu do kontrolowania nadmiernej odpowiedzi zapalnej, wciąż pozostaje jedną z najczęstszych przyczyn śmierci na oddziałach intensywnej opieki medycznej [138, 139]. Dzieje się tak, pomimo że przekazywanie sygnału indukowanego przez LPS i uruchamianie ścieżki sygnałowej poddane są złożonej regulacji. W procesach tych bierze udział liczna grupa białek, które mogą działać na poziomie zewnątrzkomórkowym, błonowym, lub wewnątrzkomórkowym [140] (**Ryc. 3.9**), a także niektóre lipidy błony komórkowej, takie jak ceramid.

Zewnątrzkomórkowe białka, LBP i sCD14, regulują aktywację TLR4 wpływając na ilość dostępnego lipopolisacharydu, który może zostać związany przez kompleks TLR4-MD-2. Zasadnicza rola tych białek polega na koncentracji cząsteczek LPS i przekazywaniu ich na TLR4. Jednak, przy wysokich stężeniach LPS (100-1000 ng/ml) oba białka biorą udział również w procesach zmierzających do neutralizacji LPS i uniknięcia nadmiernej aktywacji komórek. LBP może przekazywać związany LPS na cząsteczki HDL (lipoproteina o wysokiej gęstości, ang. *high density lipoprotein*), co pozwala na usuwanie go ze środowiska przez receptory zmiatacze [96, 141]. Inne białko ostrej fazy, BPI, charakteryzuje się wyższym powinowactwem do LPS niż LBP i może transportować

związany lipopolisacharyd do komórek bez udziału CD14. Na dalszych etapach infekcji bakteryjnej obecność tego białka znacznie ogranicza aktywację komórek, przyspieszając jednocześnie procesy detoksykacyjne [80, 142]. Wykazano również istnienie kilku rozpuszczalnych form receptora TLR4 (sTLR4), będących produktem alternatywnego składania eksonów. Te formy receptora zachowują zdolność do wiązania LPS przy pomocy MD-2, nie posiadają jednak domeny transbłonowej i cytoplazmatycznej, niezbędnej do generacji sygnału. Poziom mRNA sTLR4 rośnie w komórkach w odpowiedzi na LPS, a jego obecność wpływa na obniżenie produkcji cytokin prozapalnych [143, 144]. Oprócz tego, w inhibicji TLR4 postuluje się również udział elementów macierzy zewnątrzkomórkowej, a także licznych substancji egzogennych, takich jak kurkumina i sulforafan [7, 145].

Białka błonowe regulujące aktywację komórek przez LPS to z reguły receptory, które wchodzi w interakcje z TLR4 ograniczając możliwość uformowania funkcjonalnego kompleksu sygnałowego. Interesującym przykładem jest tu białko RP105 (ang. *radioprotective protein 105 kDa*, znane także jako CD180). Struktura domen zewnątrzkomórkowych tego białka i TLR4 jest podobna, białko RP105 nie posiada jednak cytoplazmatycznej domeny sygnałowej. Co więcej, ekspresja RP105 na powierzchni komórki oraz zdolność do wiązania ligandu przez RP105 zależy od obecności koreceptora MD-1, będącego homologiem MD-2 [146]. RP105 i MD-1 mogą wiązać się z TLR4, zapobiegając jego homodimeryzacji i uniemożliwiając asocjacje receptora z cząsteczkami lipopolisacharydu [147]. Działanie białek takich jak ST-2L (ILRL1 – ang. *interleukin-1 receptor-like protein 1*) i SIGIRR (ang. *single Ig IL-1-related receptor*) polega na ich zdolności do wiązania białek MyD88 i TRIF oraz ich sekwestracji, co opóźnia tworzenie myddosomu oraz kompleksu sygnałowego w błonie endosomu [148, 149]. Z kolei białko TRAIL-R (ang. *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor*), w odróżnieniu od poprzednio wymienionych białek nie oddziałuje bezpośrednio z TLR4 [150]. Mechanizm jego działania polega najprawdopodobniej na stabilizacji I κ B i tym samym zapobieganiu aktywacji NF κ B [147].

stymulowana przez LPS i działa na zasadzie sprzężonych zwrotnie pętli regulacyjnych. Spośród licznych poznanych inhibitorów wewnątrzkomórkowych do najlepiej scharakteryzowanych należą MyD88s, A20, SOCS-1, Tollip, IRAK-M, Triad3A oraz niedawno opisany regulacyjny system złożony z białek Fliih, LRRFIP2 i Flap-1.

MyD88s jest skróconą wersją głównego białka adaptorowego receptora TLR4, będąca produktem alternatywnego składowania eksonów. Tworzy on heterodimery z MyD88, które nie są zdolne do wiązania kinaz IRAK i zapobiegają ich fosforylacji [151]. Białko IRAK-M interferuje z procesem przekazywania sygnału przez uniemożliwienie oddysocjowania kompleksu IRAK1/IRAK4 od MyD88 [152]. Kolejnym regulatorem działającym na tym etapie jest białko Tollip (ang. *Toll interacting protein*), które zapobiega autofosforylacji IRAK-1 [153]. Natomiast białko SOCS-1 (ang. *suppressor of cytokin signalling 1*) jest ligazą E3 ubikwityny, która może poliubikwitynować adaptor TIRAP i prowadzić do jego degradacji [154]. Na uwagę zasługuje także SARM, jedne z pięciu białek adaptorowych związanych z receptorami Toll-podobnymi, które wiąże i sekwestruje białko TRIF i jest jednym z nielicznych poznanych regulatorów ścieżki sygnałowej niezależnej od MyD88 [28].

Stosunkowo niedawne odkrycia pozwoliły na dopisanie do listy regulatorów ścieżek sygnałowych TLR4 układu trzech białek: Fliih (ang. *flightless I homolog*), LRRFIP2 (ang. *LRR-Fli-1-interacting protein 2*) oraz Flap-1 (ang. *Fli-1 LRR-associated protein 1*). Kompetycyjne wiązanie tych białek do MyD88 i ich interakcje w toku długotrwałej inkubacji z LPS mogą mieć pierwszorzędne znaczenie w wygaszaniu nadmiernej aktywacji komórek [155] (**Ryc. 3.9**).

Białko TRAF6 jest jednym z centralnych przekaźników sygnału na ścieżce zależnej od MyD88. Jest ono celem między innymi dla białka A20, które deubikwitynuje TRAF6, uniemożliwiając mu tym samym aktywację TAK1. A20 negatywnie reguluje również białko RIP-1, zaangażowane w późną aktywację NFκB na ścieżce MyD88-niezależnej [156]. Aktywność TRAF6 negatywnie regulują także należące do tej samej rodziny TRAF1 i TRAF4 oraz β-arestyny [157]. Inne regulatory działające na późnych etapach ścieżek sygnałowych to między innymi Abin-3 oraz Dok1/Dok2, który specyficznie hamuje fosforylację kinaz Erk [147] (**Ryc. 3.9**).

Komórki mogą również kontrolować nasilenie odpowiedzi na lipopolisacharyd poprzez **regulację syntezy, rozmieszczenia i degradacji receptora TLR4 i/lub CD14**, chociaż dane na ten temat są sprzeczne. Wykazano, że ekspresja receptorów TLR4 i CD14 w komórkach Kupffera (makrofagi wątrobowe) ulega zwiększeniu pod wpływem inkubacji z

LPS [158]. Wiadomo również, że w aktywowanych komórkach TLR4 i CD14 może przemieszczać się między błoną komórkową a organellami wewnątrzkomórkowymi takimi jak aparat Golgiego, endosomy oraz retikulum endoplazmatyczne [126, 159]. W regulacji transportu TLR4 do błony komórkowej uczestniczą białka gp96 oraz PRAT4A i ich poziom ma wpływ na wrażliwość komórek na LPS [160, 161]. W translokacji TLR4 z błon aparatu Golgiego do błony komórkowej uczestniczy też białko Rab10, regulując „uzupełnianie” błonowej subpopulacji TLR4 [162]. Z drugiej strony, istnieją dane wykazujące ubytek TLR4 z powierzchni komórek poddanych działaniu lipopolisacharydu [129] oraz wskazujące na degradację receptora w tych warunkach. Ligaza ubikwityny E3, Triad3A, bierze udział w poliubikwitynacji i proteasomalnej degradacji kilku receptorów Toll-podobnych, w tym TLR4 [163]. Nadprodukcja Triad3A prowadzi do degradacji TLR4, a także innych białek biorących udział w transdukcji sygnału – TIRAP, TRIF i RIP1 [163, 164]. Pod wpływem lipopolisacharydu TLR4 ulega też degradacji w lizosomach, a nadprodukcja lizosomalnej GTPazy Rab7b intensyfikuje ten proces [129]. Nie jest jednak wiadomo, czy proteasomalna i lizosomalna ścieżka degradacji TLR4 są ze sobą powiązane. Wypadkowy poziom receptora TLR4 wydaje się zatem zależeć od kilku różnych mechanizmów, podlegających złożonej regulacji.

Nasza wiedza na temat **udziału lipidów** w aktywacji komórek przez LPS jest uboższa, aczkolwiek problematyka ta zyskała na znaczeniu wraz z odkryciem, że opisane już wcześniej tratwy lipidowe błony komórkowej, wzbogacone w sfingolipidy i cholesterol, są miejscami aktywacji szeregu receptorów komórek układu odpornościowego [88-90]. Zgodnie z tą linią danych wykazano, że aktywowany przez LPS receptor TLR4 komórek THP-1 asocjuje z tratwami lipidowymi skupiającymi białko CD14, co prowadzi do produkcji cytokin prozapalnych, a procesy te wymagają udziału ceramidu powstającego w wyniku hydrolizy sfingomieliny przez kwaśną sfingomielinazę [165, 166]. Takie działanie ceramidu wynikałoby z jego właściwości fuzogennych pociągających za sobą zmiany struktury błony komórkowej podyktowane pojawieniem się w niej ceramidu [167]. Wprost przeciwnie, wykazywano też, że egzogeny ceramid C-8 i C-6 hamował produkcję TNF α , interleukiny 6 i 8 przez niektóre komórki, w tym makrofagi mysie [168, 169]. Co więcej, myszy pozbawione ekspresji kwaśnej sfingomielinazy wykazywały dziesięciokrotny wzrost poziomu interleukiny 1 β i zwiększoną śmiertelność w odpowiedzi na infekcję Gram-ujemną bakterią *Pseudomonas aeruginosa* [170]. Zgodnie z tym stwierdzono ostatnio, że ceramid hamuje aktywność enzymu decydującego o powstaniu i sekrecji ostatecznej formy TNF α przez makrofagi [171]. Łącznie te dane sugerują, że ceramid

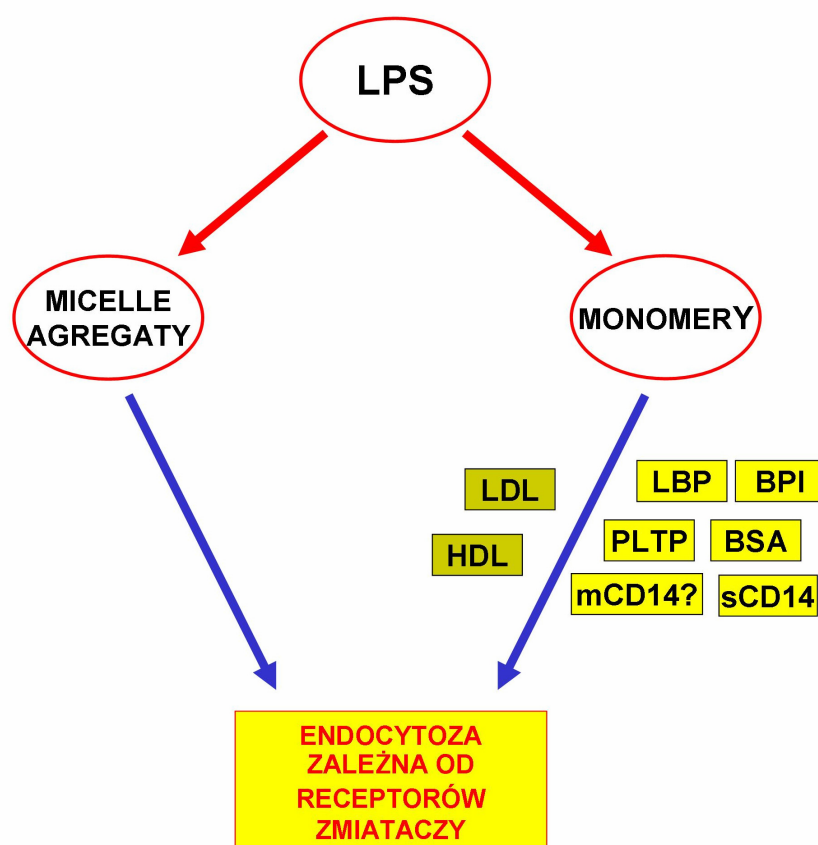
generowany w odpowiedzi na stymulację komórek przez LPS może spełniać rolę negatywnego regulatora syntezy przynajmniej niektórych cytokin prozapalnych.

3.2.6. Usuwanie i detoksykacja lipopolisacharydu

Skutkiem infekcji bakteryjnej jest pojawienie się w krwiobiegu znacznych ilości lipopolisacharydu, uwolnionego z rozpadających się komórek bakterii. Neutralizacja LPS jest kolejnym sposobem wygaszenia aktywacji komórek przez tę endotoksynę. Detoksykacja LPS zachodzi na drodze jego enzymatycznej modyfikacji do postaci nieaktywnej biologicznie, katalizowanej zewnątrz- i wewnątrzkomórkowo. Największy udział w oczyszczaniu organizmu z lipopolisacharydu mają komórki wątroby, w szczególności lokalna populacja makrofagów, zwanych komórkami Kupffera. Znaczne ilości LPS ulegają także internalizacji w komórkach nabłonka płuc i śledziony [172]. Enzymatyczna detoksykacja lipopolisacharydu osiągana jest przez jego deacylację (usunięcie podstawionych reszt kwasów tłuszczowych) oraz defosforylację glukozoamin lipidu A przy 1 i 4 atomie węgla. Deacylacja katalizowana jest przez enzym hydrolazę acyloksyacylową gromadzoną w lizosomach neutrofilii i makrofagów [174, 175]. Za defosforylację LPS odpowiada alkaliczna fosfataza [176]. Zmodyfikowane cząsteczki lipopolisacharydu ulegają prawdopodobnie dalszej degradacji, jako że metabolity LPS są obecne w żółci i kale. Wydaje się jednak, że w niektórych warunkach zmodyfikowany LPS może zostać uwolniony z komórki i wykazywać antagonistyczne działanie w stosunku do receptorów [177, 178].

Z uwagi na fizjologiczne znaczenie detoksykacji kluczowe jest pytanie o mechanizmy internalizacji dużych stężeń LPS. Główną klasą receptorów zaangażowanych w tym procesie są receptory zmiatacze. Natomiast wydaje się, że receptor TLR4 nie uczestniczy w takiej „niesygnałowej” endocytozie LPS [179]. Te same badania wskazały też, że w procesie internalizacji LPS uczestniczy CD14, chociaż jego relacja z aktywnością receptorów zmiataczy nie jest znana [179]. Receptory zmiatacze to grupa receptorów, których wspólną cechą jest zdolność do wiązania zmodyfikowanego LDL i HDL (lipoproteiny niskiej i dużej gęstości, ang. *low or high density lipoprotein*). Oprócz tego rozpoznają wiele innych makrocząsteczek obdarzonych ujemnym ładunkiem i odgrywają istotną rolę w oczyszczaniu organizmu z substancji obcych, a także z resztek komórek uległych apoptozie i zmodyfikowanych cząsteczek własnych. Na podstawie struktury domeny transbłonowej i zewnątrzkomórkowej grupę tę dzieli się obecnie na kilka klas, oznaczanych A-H, z których najlepiej scharakteryzowane są receptory klasy A i B [180,

181]. Receptory zmiatacze są obecne na powierzchni makrofagów, ale w przeciwieństwie do CD14/TLR4, występują także w wielu innych typach komórek. Mogą zatem uczestniczyć w internalizacji LPS przez makrofagi, ale również przez komórki nabłonkowe i komórki miększu wątroby [179, 182]. Przez długi czas proces endocytozy LPS wiązano z receptorami zmiataczami klasy A (SR-A1 i SR-A2) [183]. Późniejsze badania wykazały jednak, że istotną rolę w tym procesie w ludzkich komórkach odgrywa również Cla-1 (SR-B1) należący do klasy B [62].



Ryc. 3.10. Udział receptorów zmiataczy w internalizacji lipopolisacharydu przez komórki. W obecności białek osocza znaczna część LPS występuje w postaci asocjowanych z nimi monomerów i ulega internalizacji przy udziale receptorów zmiataczy. LPS występujący w postaci micelli oraz agregatów powstałych po rozpadzie bakterii może być także internalizowany przez komórki nabłonkowe za pomocą wybranych receptorów zmiataczy klasy A. W oparciu o: [62, 135, 183].

Ważnym aspektem procesu internalizacji lipopolisacharydu jest jej zależność od interakcji LPS z białkami osocza. Jak wspomniano, ze względu na amfipatyczny charakter cząsteczki, LPS występuje w środowisku wodnym w postaci micelli bądź jako składowa agregatów - fragmentów martwych bakterii, które mogą osiągać znaczne rozmiary (do 1000 kDa). Pojedyncze cząsteczki LPS (nazywane także monomerycznym LPS) występują w kompleksach z białkami osocza: sCD14, LBP, BPI, albuminą oraz różnymi klasami

lipoprotein. Wykazano, że po inkubacji z ludzkim osoczem, 90% cząsteczek LPS występuje w postaci związanej z lipoproteinami różnych klas: HDL, LDL i chylomikronami [184, 185]. W tej postaci LPS ulega internalizacji i detoksykacji na ścieżce zależnej od receptorów zmiataczy. Wykazano, że receptor Cla-1 umożliwia internalizację LPS związanego z cząsteczkami HDL, ale też samodzielną internalizację monomerów LPS (wolnych od lipoprotein) powstających w obecności albuminy [62]. LPS pobierany przez Cla-1 w sposób niezależny od HDL ulegał akumulacji w aparacie Golgiego, podczas gdy pobierany łącznie z HDL trafiał do endosomów zawierających materiał powracający do błony komórkowej [62]. LPS może być przenoszony na cząsteczki lipoprotein przez białka LBP i PLTP (białko transportujące fosfolipidy, ang. *phospholipid transfer protein*) [186]. Związanie LPS przez BPI oraz sCD14 także prowadzi do jego internalizacji, nie wiadomo jednak, czy biorą w niej udział receptory zmiatacze [80]. Micelle tworzone przez niezwiązane przez białka cząsteczki lipopolisacharydu oraz agregaty LPS ulegają internalizacji przez komórki nabłonkowe wątroby, śledziony i płuc, posiadające duże ilości receptorów zmiataczy klasy A [173, 183] (Ryc. 3.10).

Podsumowując, internalizacja dużych stężeń LPS jest zatem dość złożonym procesem, angażującym różne typy komórek, receptorów i dróg endocytozy. Złożoność tego zagadnienia sprawia, iż pomimo jego istotności dla detoksykacji LPS dane na temat mechanizmów tego procesu są fragmentaryczne. W świetle najnowszych danych wskazujących, że internalizacja jest też elementem aktywacji komórek przez LPS (ścieżka uruchamiana przez TLR4 w sposób zależny od TRIF), badanie wzajemnej zależności pomiędzy aktywnością receptorów zmiataczy, CD14 i TLR4 daje szansę na sprecyzowanie mechanizmów regulujących negatywnie aktywność prozapalną LPS i promujących jego detoksykację.

3.3. Szlaki internalizacyjne

Endocytoza polega na internalizacji części błony komórkowej razem ze związanymi z nią cząsteczkami i płynem zewnątrzkomórkowym. W kontekście funkcjonowania układu odpornościowego szczególnie ważna jest fagocytoza patogenów i pinocytoza rozpuszczalnych antygenów, które podlegają następnie proteolizie wewnątrz komórek żernych, a powstałe tą drogą peptydy-antygeny prezentowane są limfocytom. Procesy te znajdują się jednak poza obszarem zainteresowania tej rozprawy. Endocytoza jest też jednym z mechanizmów kontrolujących komórkową lokalizację, a przez to i

funkcjonowanie, receptorów komórek układu odpornościowego, w tym prawdopodobnie także receptora TLR4 (patrz 3.2.4.3.). Niektóre szlaki endocytozy wykorzystywane są również przez patogeny w celu wniknięcia do komórek gospodarza.

Do początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia funkcjonował klarowny podział dróg internalizacji cząstek do komórek. Obejmował on fagocytozę dużych cząstek (o średnicy powyżej 0.5 μm), makro- i mikropinocytozę fazy płynnej oraz endocytozę receptorową zależną od klatryny [187-189]. Późniejsze badania z zastosowaniem farmakologicznych inhibitorów tej ostatniej ścieżki pozwoliły na wykrycie innych szlaków internalizacji zbiorczo nazywanych endocytozą niezależną od klatryny. Najważniejsze z dróg internalizacji są przedstawione w **Tabeli 3.1**. Różnią się one pobieranym „ładunkiem”, udziałem kluczowych białek (takich jak dynamina i monomeryczne GTP-azy), lipidów i cytoszkieletu aktynowego [190].

3.3.1. Endocytoza zależna od klatryny

Jeden z najlepiej poznanych mechanizmów internalizacji, występujący powszechnie w komórkach, polega na tworzeniu niewielkich (ok. 100 nm średnicy) pęcherzyków opłaszczonych białkiem - klatryną [191]. Do cząsteczek transportowanych tą drogą do komórki należy transferyna i LDL wiązane przez swoiste receptory, aktywowane receptory różnych czynników wzrostu (np. EGFR, PDGFR) oraz receptory związane z białkami G (przy pomocy odmiennych adaptorów z rodziny β -arestyn) [192].

Klatryna samorzutnie tworzy struktury nazywane triskelionami, złożone z trzech ciężkich i trzech lekkich łańcuchów oddziałujących ze sobą na C-końcach. Połączenie wielu takich struktur umożliwia utworzenie koszyka otaczającego wpuklający się fragment błony komórkowej [193]. Oprócz klatryny, kluczowe znaczenie dla tego typu internalizacji mają białka adaptorowe oraz dynamina. Białka adaptorowe rozpoznają sekwencję sygnałową internalizowanych receptorów, koordynują gromadzenie cząsteczek klatryny w miejscach internalizacji i wspomagają polimeryzację triskelionów [194, 195]. Białka adaptorowe pełnią też istotną funkcję wspomagającą wpuklanie się błony, wiążąc się bezpośrednio z błoną komórkową za pomocą domen BAR (ang. *Bin-Amphiphysin-Rsv*) i stabilizując jej odkształcenia [196, 197]. Do najistotniejszych adaptorów zaangażowanych w te procesy należy kompleks AP-2 (ang. *adaptor protein 2*), Ap180, SNX9, (*sorting nexin-9*), amfizyna oraz białka z rodziny epsyn [194, 198, 199]. W zależności od rodzaju ładunku, w procesie endocytozy klatryno-zależnej mogą brać udział odmienne zestawy białek adaptorowych, prowadząc do zróżnicowania dynamiki tego procesu [194, 200].

Za odcięcie uformowanego pęcherzyka endocytarnego od błony komórkowej odpowiada dynamina, białko o aktywności GTP-azy [201]. Przy pomocy białek adaptorowych dynamina tworzy helikalny polimer wokół szyjki pęcherzyka, który, po zajściu hydrolizy GTP, ulega wydłużeniu i ściśnięciu. Pozwala to na przerwanie błony i odcięcie opłaszczonego przez klatrynę pęcherzyka endocytarnego [202]. U ssaków występują trzy geny kodujące dynaminę różniące się ekspresją w różnych typach komórek oraz liczne warianty wynikające z alternatywnego składania eksonów [203]. Produkt ekspresji genu *Dyn2* (dynamina 2) jest obecny we wszystkich typach komórek, podczas gdy ekspresja *Dyn1* ograniczona jest do komórek nerwowych, a *Dyn3* do kilku wybranych tkanek [204]. Aktywność dynaminy wymagana jest dla uruchomienia ścieżki sygnałowej receptora TLR4 niezależnej od MyD88 (patrz 3.2.4.3.).

Uformowany pęcherzyk zostaje wkrótce pozbawiony klatrynowego płaszcza przy udziale białek hsc70 oraz auksyliny i ulega fuzji z wczesnymi endosomami [205]. Pobrane ligandy, takie jak LDL, trafiają ostatecznie do lizosomów i są utylizowane przez komórkę. Uważa się również, że ścieżka ta odgrywa ważną rolę w regulacji powierzchniowej ekspresji receptorów, gdyż po internalizacji mogą one powracać na powierzchnię komórki (jak receptor transferyny i receptor LDL) lub być kierowane na ścieżkę degradacji (jak receptor EGF) [127, 206].

3.3.2. Endocytoza niezależna od klatryny

Istniejące dane wskazują, że ścieżki niezależne od klatryny odpowiadają za 70% poboru płynów i ponad 60% obrotu błony komórkowej w różnych typach komórek [207, 208]. Mechanizmy tych szlaków internalizacyjnych są słabo poznane, a ich klasyfikacja i dokładna ocena znaczenia napotyka wiele trudności. Poza zdolnością ładunków do wnikania różnymi ścieżkami (jak w przypadku podjednostki B toksyny *Vibrio cholerae*) i ich wzajemną kompensacją w przypadku zablokowania ścieżki preferowanej, istotny problem stanowi fakt, że jedno białko (np. Cdc 42) jest często zaangażowane w regulację kilku szlaków. Dodatkowo, zarówno stosowane metody inhibicji farmakologicznej, jak i manipulacje ekspresją genów kodujących białka zaangażowane w mechanizmy endocytozy, są często niespecyficzne i wpływają na różne ścieżki, bądź też są źródłem poważnych drugorzędowych efektów i artefaktów [209]. Do najważniejszych ścieżek niezależnych od klatryny zalicza się:

-endocytoza zależna od kaweoli – kaweole to niewielkie (ok. 50-80 nm średnicy) zagłębienia w błonie komórkowej występujące w niektórych typach komórek, takich jak

pneumocyty, adipocyty, fibroblasty i komórki mięśni gładkich [210]. Dołki te opłaszczone są oligomerami białka kaweoliny 1 [211]. Skład lipidowy kaweoli odpowiada tzw. „tratwom lipidowym” (patrz 3.2.3., strona 12) i charakteryzuje się dużą zawartością cholesterolu i glikosfingolipidów [212]. Kaweole były pierwszymi strukturami, które powiązano z endocytozą niezależną od klatryny i na przestrzeni lat przypisywano im udział w internalizacji białek z kotwicą GPI, toksyny cholery, konformacyjnie zmodyfikowanych albumin i $\beta 1$ integryn, a także jako drogę wejścia do komórki dla niektórych wirusów, jak np. SV40. Wskazywano, że ta droga internalizacji wymaga udziału dynaminy [190, 213, 214]. Jednak coraz częściej kaweole postrzega się jako struktury dość trwale z błoną komórkową i stabilizujące niektóre jej komponenty [215, 216]. W świetle tych różnych doniesień, rola kaweoli w endocytozie jest obecnie przedmiotem kontrowersji [209].

-endocytoza zależna od flotillin – flotillina 1 i 2 to białka związane z cholesterolowo-sfingolipidowymi tratwami lipidowymi [217]. Uważa się, że te domeny błony komórkowej uczestniczą w internalizacji białek z kotwicą GPI (np. CD59), toksyny cholery i proteoglikanów [187]. Tempo tworzenia pęcherzyków opłaszczonych przez flotililiny oraz ich internalizacji pozostaje jednak niewielkie w stosunku do pęcherzyków opłaszczonych klatryną [218].

-endocytoza zależna od Cdc42 – Cdc42 (ang. *cell division control protein 42*) jest małą GTP-azą z rodziny białek Rho. Kontroluje ona ścieżkę endocytozy odpowiedzialną za znaczną część pobierania płynów do komórki oraz internalizację białek z kotwicą GPI i toksyny cholery B, prawdopodobnie w sposób niezależny od dynaminy [190, 207]. Błonowe wypuklenia charakterystyczne dla tej ścieżki, zwane przENOŚnikami niezależnymi od klatryny (ang. *clathrin independent carriers* – CLIC) są wydłużone i rozgałęzione [187]. Internalizowany ładunek jest natomiast gromadzony w populacji specyficznych wczesnych endosomów, zwanych GEEC (ang. *GPI-enriched early endosomal carriers*), dlatego też szlak ten nazywany jest również ścieżką CLIC/GEEC [219]. Białko GRAF1 (ang. *GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1*) jest jedynym dotychczas zidentyfikowanym białkiem specyficznym dla tego szlaku [209, 220].

-endocytoza zależna od RhoA – obserwowany w leukocytach szlak endocytozy zależny od białek RhoA oraz Rac1 został zidentyfikowany jako ścieżka internalizacji receptora interleukiny 2 [221]. Ścieżka ta jest zależna od dynaminy oraz od kinaz PAK1 i PAK2 [222]. Waga tej ścieżki i powszechność występowania poza leukocytami pozostają

niejasne, ale ścieżka działająca przy użyciu podobnych mechanizmów została opisana w komórkach pęcherza moczowego [223]

ŚCIEŻKA INTERNALIZACJI	MORFOLOGIA	INTERNALIZOWANE CZĄSTECZKI	UDZIAŁ DYNAMINY	INNE BIAŁKA I LIPIDY
ZALEŻNA OD KLATRYNY	Dolki opłaszczone klatryną, Ø 100 nm	aktywowane receptory o aktywności kinaz tyrozynowych, receptory związane z białkami G, LDL, transferyna	TAK	epsyny, AP2, amfifizyna, SNX9, Ap180
ZALEŻNA OD KAWEOLI	Dolki opłaszczone kaweoliną, Ø 50-80 nm	białka z kotwicą GPI, CTxB, modyfikowane albuminy, wirusy SV40 i EV1	TAK	aktyna, kinaza Src, kinaza białkowa C α , PTRF, glikolipidy
ZALEŻNA OD FLOTILLINY	Dolki opłaszczone flotiliną 1 i 2	CD59, proteoglikany, CTxB	RÓŻNE DONIESIENIA	aktyna
ZALEŻNA OD Cdc42	Wydłużone, tabularne „przeośniki niezależne od klatryny” (CLIC) oraz endosomy GEEC	faza płynna, białka z kotwicą GPI, CTxB, toksyna VacA, aerolizyna	NIE	aktyna, GRAF1, ARHGAP10, Arf1, sfingomielina
ZALEŻNA OD RhoA	Nieopłaszczone dolki	receptor interleukiny 2B, Fc ϵ RI (receptor IgE) toksyna C2, wirus HIV-1	TAK	Rac1, PAK 1/2, sfingomielina
ZALEŻNA OD Arf6	Nieopłaszczone dolki	MHC I, CD59, karboksypeptydaza E, E kadheryny, integryna β 1, wirus A9	RÓŻNE DONIESIENIA	nieznane
MAKROPINOCYTOZA	Faldy błony, makropinosomy 0.5-5 μ m	Faza płynna, receptory o aktywności kinaz tyrozynowych	RÓŻNE DONIESIENIA	aktyna, PAK 1, CtBP1/BARS, fosfolipaza D, PI3- kinaza, Ras, kinaza Src, rodzina białek SNX-PX-BAR
FAGOCYTOZA	Faldy błony otaczające internalizowany cząstkę, fagosomy	patogeny, pozostałości komórek uległych apoptozie	PRAWDO- PODOBNY	aktyna, amfifizyna, RhoA, Arf6, Cdc42, Rac1, IQGAP1

Tabela 3.1. Zestawienie głównych szlaków internalizacyjnych
PTRF (ang. *polymerase I and transcript release factor*), IQGAP1 (ang. *IQ motif containing GTPase activating protein 1*), CTxB- podjednostka B toksyny cholery. Opracowano wg [190, 194, 209]

-endocytoza zależna od Arf6 – ścieżka endocytozy zależna od monomerycznej GTPazy Arf6 (ang. *ADP ribosylation factor-6*) odpowiada za internalizację kilku białek, takich jak MHC klasy I, integryny $\beta 1$, karboksypeptydazy E, E-kadheryny, a także niektórych białek z kotwicą GPI [190]. Najprawdopodobniej jednak główna rola tej ścieżki związana jest z obiegiem i recyklingiem błony komórkowej, a także z regulacją dynamiki endosomów [209, 224].

3.3.3. Makropinocytoza

Jest to droga pobierania znacznych ilości płynów i rozpuszczonych substancji. Jest ona związana z silnym fałdowaniem błony komórkowej spowodowanym polimeryzacją aktyny [225]. Efektem fuzji fałdów błony jest powstanie dużych (500 nm - 5 μ m) pęcherzyków zwanych makropinosomami. Proces ten zależy od szeregu białek wymienionych w Tabeli 1, nie zidentyfikowano jednak dotąd regulatorów specyficznych tylko dla tej ścieżki [226, 227]. Udział dynaminy w makropinocytozie jest kontrowersyjny, gdyż wiele doniesień jej przeczy [228-230]. Wyjątkiem jest tu makropinozytoza stymulowana przez PDGF i inne czynniki wzrostu i związana z tworzeniem tzw. „ruffles”- fałd na grzbietowej powierzchni komórki (ang. *circular dorsal ruffles*) [231]. W 2007 roku grupa McNivena, odkrywcy dynaminy, potwierdziła te dane i wykazała jednocześnie, że udziału niektórych izoform dynaminy 2 wymaga natomiast inna forma pobierania fazy płynnej - konstytutywna mikropinocytoza [230, 233, 234].

3.3.4. Fagocytoza

Fagocytoza jest inicjowana przez interakcję określonych receptorów komórek żernych bądź bezpośrednio z powierzchnią cząstki bądź z pokrywającymi je opsoninami. Najważniejszymi opsoninami są przeciwciała IgG oraz składnik dopełniacza C3b. Ich związanie przez, odpowiednio, receptory Fc γ lub receptory dopełniacza CR1 i CR3 prowadzi do polimeryzacji aktyny, która umożliwia wysuwanie filopodiów otaczających cząstkę, co skutkuje uformowaniem pęcherzyka - fagosomu. Fagocytoza wymaga udziału monomerycznych GTPaz z rodziny Rho, których dobór zależy od receptorów inicjujących fagocytozę [235].

4. Założenia i cel pracy

Lipopolisacharyd jest składnikiem błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. W czasie infekcji LPS aktywuje leukocyty, wywołując ogólnoustrojowy stan zapalny nazywany sepsą. Za rozpoznanie lipopolisacharydu przez leukocyty odpowiada złożony układ białek: pojedyncze cząsteczki LPS wiązane są przez białko surowicy, LBP, które przenosi endotoksynę na białko CD14 zakotwiczone w błonie komórkowej leukocytów, skąd LPS trafia do kompleksu receptor TLR4/MD-2. Aktywowany receptor TLR4 inicjuje dwie ścieżki sygnałowe, zależną i niezależną od udziału białka adaptorowego MyD88, prowadzące łącznie do syntezy różnorodnych mediatorów reakcji zapalnej.

Z uwagi na groźne skutki nadmiernej stymulacji komórek przez LPS istnieją mechanizmy wyciszające ich odpowiedź prozapalną [236], które obejmują:

- hamowanie ścieżek sygnałowych uruchamianych przez LPS przez różnorodne białka i lipidy;
- obniżenie poziomu receptora TLR4 lub/i CD14 na powierzchni komórek stymulowanych przez LPS;
- detoksykację LPS.

Pierwszy z wymienionych mechanizmów polega na zwrotnym hamowaniu kaskad sygnałowych TLR4 przez aktywowane na ich szlaku białka bądź pojawiające się lipidy, takie jak ceramid - lipid o plejotropowym działaniu wywieranym na składniki błony komórkowej i białka wewnątrzkomórkowe.

Dwa pozostałe mechanizmy negatywnej regulacji odpowiedzi komórek na LPS wiążą się z internalizacją CD14 i/lub TLR4 oraz LPS. Internalizacja wysokich stężeń LPS i jego detoksykacja zależy od udziału receptorów zmiataczy. Niewiele wiadomo o współdziałaniu, lub ewentualnym antagonizmie, tych receptorów z receptorami CD14 i TLR4, które odpowiadają za aktywację komórek przez LPS.

Problem ten dodatkowo komplikuje fakt, że internalizacji receptora TLR4 przypisuje się też rolę przeciwną do „wyciszenia” odpowiedzi komórek na LPS. W 2008 roku Kagan i współpracownicy wykazali, że dynamino-zależna endocytoza receptora TLR4 jest istotnym elementem generacji jego ścieżki sygnałowej niezależnej od MyD88. Według tej koncepcji internalizacja aktywowanego TLR4 (CD14?) umożliwia uruchomienie tej kaskady z błony endosomów.

Celem pracy było zbadanie wybranych mechanizmów negatywnej regulacji odpowiedzi komórek makrofagopodobnych linii J774 na LPS, ze szczególnym uwzględnieniem udziału receptora TLR4 i białka CD14 w internalizacji tej endotoksyny.

W związku z tym podjęto badania mające na celu:

- zbadanie dynamiki odpowiedzi prozapalnej komórek stymulowanych przez różne stężenia LPS, prowadzącej do produkcji cytokin na ścieżce zależnej i niezależnej od MyD88;
- określenie udziału ceramidu w aktywacji komórek przez LPS, a także w internalizacji tej endotoksyny;
- ocenę zmian poziomu receptora TLR4 i CD14 na powierzchni komórek stymulowanych przez LPS;
- charakterystykę mechanizmu internalizacji wysokich stężeń LPS i ocenę udziału w tym procesie receptora TLR4, CD14 oraz receptorów zmiataczy;
- zbadanie zależności pomiędzy procesem internalizacji wysokich stężeń LPS (detoksykacja LPS) i odpowiedzią prozapalną komórek.

5. Materiały i metody

5.1. Stosowane przeciwciała

5.1.1. Przeciwciała pierwszorzędowe

- rozpoznające ceramid mysie IgM, klon MID 15B4 (Alexis)
- rozpoznające mysie receptor TLR4 poliklonalne królicze IgG, klon H-80 (Santa Cruz Biotechnology)
- rozpoznające mysie receptor TLR4 monoklonalne IgG skoniugowane z biotyną, klon UT41 (eBioscience)
- rozpoznające kompleks TLR4/MD-2 monoklonalne szczurze IgG blokujące wiązanie LPS, klon MTS510, izotyp IgG2a (BD Pharmingen)
- rozpoznające mysie receptor CD14 poliklonalne królicze IgG, klon M-305 (Santa Cruz Biotechnology)
- rozpoznające mysie receptor CD14 monoklonalne szczurze IgG, klon rmC5-3 (BD Pharmingen) oraz Sa14-2 (Santa Cruz Biotechnology)
- rozpoznające mysie receptor CD14 monoklonalne szczurze IgG blokujące wiązanie LPS, klon 4C1, izotyp IgG2b (BD Pharmingen)
- rozpoznające białko I_κB ufosforylowane na reszcie seryny 32 (Ser32) monoklonalne królicze IgG, klon 14D4 (Cell Signaling)
- rozpoznające aktywną monoklonalne mysie IgG, klon C4 (MP Biomedicals)
- rozpoznające metkę HA monoklonalne szczurze IgG, klon 3F10 (Roche)
- rozpoznające metkę HA monoklonalne kozie IgG (Vector Labs)

5.1.2. Przeciwciała drugorzędowe

- rozpoznające mysie IgM kozie IgG sprzężone z FITC (Sigma)
- rozpoznające królicze IgG kozie IgG sprzężone z FITC (fragment F(ab)₂) (Jackson ImmunoResearch)
- rozpoznające szczurze IgG ośle IgG sprzężone z Texas Red (Jackson ImmunoResearch)
- rozpoznające szczurze IgG ośle IgG sprzężone z FITC (Jackson ImmunoResearch)
- rozpoznające królicze IgG owcze IgG sprzężone z biotyną (Rockland)
- rozpoznające mysie IgG kozie IgG sprzężone z HRP (Jackson ImmunoResearch)

- rozpoznające królicze IgG kozie IgG sprzężone z HRP (Rockland)
- rozpoznające szczurze IgG kozie IgG sprzężone z HRP (Rockland)
- rozpoznające królicze IgG kozie IgG wyznakowane ^{125}I (PerkinElmer)

Dodatkowo, w badaniach były również wykorzystywane przeciwciała kontrolne:

- królicze IgG ChromPure (Jackson ImmunoResearch)
- mysie IgM, klon MPC 104E (Sigma)
- szczurze IgG2a, klon R35-95 (kontrola izotypowa dla przeciwciała anti-TLR4 MTS510, BD Pharmingen)
- szczurze IgG2b, klon A95-1 (kontrola izotypowa dla przeciwciała anti-CD14 4C1, BD Pharmingen)

5.2. Hodowla komórek

Doświadczenia były prowadzone na komórkach linii J774A.1 zakupionych w Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC). Są to komórki makrofagopodobne, pierwotnie uzyskane z guza nowotworowego samicy myszy szczepu BALB/c, często używane w badaniach dotyczących fizjologii monocytów i makrofagów [237].

Komórki J774 były przechowywane w ciekłym azocie w obecności 10% DMSO. Po rozmrożeniu komórki hodowano w pożywce DMEM (Sigma-Aldrich) zawierającej D-glukozę w stężeniu 1000 mg/l, 10% inaktywowanej termicznie (30 min, 56°C) płodowej surowicy bydlęcej (FBS, Life Technologies) oraz antybiotyki (penicylina i streptomycyna, 100 µg/ml, Polfa). Komórki były utrzymywane w atmosferze nasyconej parą wodną, przy 5% stężeniu CO₂, w 37°C w szalkach do hodowli komórkowych (10 cm średnicy; Corning); w tych warunkach komórki rosły przylegając do podłoża. Po pokryciu około 80% powierzchni szalki, komórki były delikatnie mechanicznie odrywane od podłoża, zawieszane w świeżej pożywce i przenoszone do nowej szalki w ilości 2x10⁶ komórek na 10 ml pożywki. Doświadczenia prowadzono na hodowlach pasażowanych nie więcej niż 40-50 razy. Do doświadczeń komórki osadzano przez wirowanie (400xg, 3 min., temp. pokojowa), zawieszano w świeżej pożywce i наносzono w odpowiedniej gęstości na szkiełka, szalki lub płytki do hodowli komórkowych i hodowano przez noc. Doświadczenia, które wymagały przeniesienia komórek w stan zawiesiny prowadzono na hodowlach oderwanych od podłoża i utrzymywanych przez 18 godzin w szalkach bez pokrycia hodowlanego (Medlab) w pożywce RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) z dodatkiem

10% FBS, 2000 mg/l D-glukozy, 2 mM L-glutaminy i 25 mM HEPES i antybiotykami jak wyżej, a następnie stymulowanych LPS w świeżej porcji tej pożywki.

W serii doświadczeń związanych z wyciszaniem ekspresji sfingomielinaz używano komórek linii J774A.1 hodowanych w zawieszynie. W takich przypadkach komórki były utrzymywane na szalkach bez pokrycia hodowlanego (Medlab) w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS jak wyżej. Hodowla była pasażowana co dwa dni, po osiągnięciu gęstości około 1×10^6 komórek/ml pożywki i na 18 godzin przed doświadczeniem wysiewana na płytki do hodowli komórek adherentnych w RPMI/10% FBS.

Do doświadczeń obejmujących transfekcję komórek plazmidami używano komórek linii RAW 264.7, które charakteryzowały się znacznie lepszą niż J774 wydajnością transfekcji i przeżywalnością w jej toku. Jest to linia komórek makrofagopodobnych uzyskanych pierwotnie z guzów nowotworowych myszy zarażonych wirusem białaczki Abelsona (ATCC). Komórki tej linii wykazują wiele cech wspólnych z J774 i są równie często wykorzystywane w badaniach nad fizjologią makrofagów. Hodowlę adherentnych komórek linii RAW 264.7 prowadzono w pożywce RPMI (Sigma-Aldrich) zawierającej 10% FBS, 4500 mg/l D-glukozy, 2 mM L-glutaminy i antybiotyki.

5.3. Przygotowanie lipopolisacharydu, stymulacja komórek

Lipopolisacharyd z *Escherichia coli* O111:B4 (tzw. ultraczysty, pozbawiony domieszki białek i kwasów nukleinowych; List Biological Laboratories) został przygotowany zgodnie z instrukcjami producenta, poprzez rozpuszczenie w sterylnej wodzie w stężeniu 1 mg/ml przy jednoczesnym podgrzewaniu w temperaturze 37°C i worteksowaniu. Roztwór LPS był przechowywany w 4°C. Przed pobraniem LPS był ponownie poddany worteksowaniu (5 min., temp. pokojowa) w celu homogenizacji micelli, a następnie dodawany do pożywki (w większości doświadczeń uzupełnionej 10% FBS) do ostatecznego stężenia 1-1000 ng/ml i ponownie worteksowany. LPS przygotowywano w ten sposób na około 30 minut przed dodaniem do komórek, w celu umożliwienia jego efektywnej monomeryzacji przez białka surowicy. W serii doświadczeń, wyjściowy roztwór LPS w H₂O worteksowano, następnie poddawano sonikacji w sonikatorze igłowym UPS200S (Bielscher) przez 5 minut (4°C) i rozcieńczano w DMEM/FBS jak wyżej. Biotynylowany LPS z *E. coli* serotyp O111:B4 (Invivogen) przygotowywano w ten sam sposób, nie był jednak aktywny biologicznie.

Do badań nad internalizacją lipopolisacharydu używano LPS z *E. coli* serotyp O55:5 koniugowanego z Alexa Fluor 488 (LPS-AF488; Invitrogen). Po rozpuszczeniu LPS-

AF488 w H₂O, jego porcje były przechowywane w temperaturze -80°C, a roztwory do doświadczeń przygotowywane jak opisano powyżej.

Stymulację komórek lipopolisacharydem prowadzono w temperaturze 37°C przez 1-18 godzin w zależności od typu doświadczenia.

Wstępną inkubację z czynnikiem wywołującym degradację kwaśnej sfingomielinazy, imipraminą (w stężeniu 70 µM, Sigma-Aldrich) [238], a także z 14 µM GW4869 (Sigma-Aldrich), inhibitorem aktywności neutralnej sfingomielinazy [239], prowadzono przez 80 minut w 37°C w pożywce z 10% FBS. Inhibitory były obecne podczas następującej stymulacji komórek LPS, ich stężenie jednak było zredukowane o połowę w celu uniknięcia ich potencjalnych efektów cytotoksycznych. Cytochalazyna D (czynnik depolimeryzujący aktyne; Sigma) była stosowana w stężeniu 3 µM w obecności 1% FBS przez 30 minut (37°C) przed podaniem LPS oraz podczas następującej stymulacji komórek LPS. Inkubacja komórek z 0,5 U/ml sfingomielinazy z *Bacillus cereus* (Sigma-Aldrich) była prowadzona w 4°C przez 5-60 minut przed podaniem LPS

Inkubacja komórek z inhibitorami endocytozy była prowadzona przez 30 minut w 37°C przed stymulacją LPS: siarczan dekstranu (Fluka), kompetycyjny inhibitor wiązania ligandów do receptorów zmiataczy oraz jego analog strukturalny, siarczan chondroityny (Sigma-Aldrich), były używane w stężeniu 10 i 25 µg/ml w DMEM/10% FBS. Związki te były także obecne w tym stężeniu podczas stymulacji komórek LPS. Wstępna inkubacja komórek z 40 lub 80 µM dynasorem, inhibitorem aktywności enzymatycznej dynaminy (Sigma-Aldrich), oraz z 10 lub 30 µM pitstop-2, inhibitorem klatryny (Abcam Biochemicals), była prowadzona w pożywce bez FBS zgodnie z zaleceniami producentów. Stężenie obu inhibitorów było zredukowane o połowę w czasie następującej stymulacji komórek przez lipopolisacharyd, prowadzonej w DMEM/10% FBS.

Inkubacja komórek z przeciwciałami hamującymi wiązanie lipopolisacharydu do TLR4 i CD14 (szczurze IgG, klony, odpowiednio, MTS510 i 4C1) oraz kontrolami izotopowymi stosowanymi w stężeniu 1-20 µg/ml była prowadzona przez 30 minut w 37°C. Przeciwciała w zredukowanym o połowę stężeniu były również obecne w czasie następującej inkubacji komórek z LPS-AF488 (60 min., 37°C).

5.4. Wyciszanie ekspresji genów kodujących kwaśną i neutralną sfingomielinazę

5.4.1. Transfekcja komórek siRNA

Hodowane w zawiesinie komórki J774 były zbierane przez wirowane (400xg, 10 min., temp. pokojowa) i zawieszane w ilości 2×10^6 w 100 μ l roztworu do nukleofekcji V (Lonza). Do komórek dodawane było 5 μ l wodnego roztworu małego interferującego RNA (siRNA; Ambion) swoistego wobec produktu genów mysiej kwaśnej sfingomielinazy (ASMazy) lub neutralnej sfingomielinazy (NSMazy) oraz siRNA kontrolny, w ilości 75 pmoli na 10^6 komórek. Komórki poddawane były transfekcji przy użyciu aparatu Nucleofector II (Lonza) i programu T-020 zgodnie z instrukcjami producenta. Bezpośrednio po transfekcji do komórek dodawano 900 μ l podgrzanej do 37°C pożywki RPMI zawierającej 10% FBS, a następnie zawiesinę komórek przenoszono na szalkę z pokryciem hodowlanym. Po 24 godzinach (37°C) komórki zbierano i przenoszono na płytki hodowlane: 1×10^6 w 1 ml pożywki RPMI/10% FBS na dołek płytki 12-dołkowej do pomiarów aktywności sfingomielinaz lub 1×10^5 w 250 μ l tej pożywki na dołek płytki 96-dołkowej do pomiarów poziomu cytokin techniką ELISA. Następnie komórki hodowano kolejne 24 godziny w 37°C i używano do doświadczeń (całkowity czas - 48 godzin od transfekcji).

5.4.2. Pomiary aktywności kwaśnej sfingomielinazy

Komórki J774 były nanoszone w ilości 1×10^6 w 1 ml pożywki RPMI/10% FBS na płytkę 12-dołkową i hodowane 24 godziny (37°C). Po przeniesieniu płytki na lód komórki przemywano buforem PD (125 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM NaHCO₃, 1 mM KH₂PO₄, 10 mM glukozy, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ i 20 mM Hepes, pH 7.4) i lizowano 30 minut (4°C) w 260 μ l buforu zawierającego 0,2% Triton X-100, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA i 20 mM Tris-HCl (pH 7.4). Lizat (100 μ l) mieszano następnie ze 150 μ l buforu zawierającego 135 mM octanu sodu, pH 5.0, 1,3 mM EDTA oraz wcześniej przygotowane liposomy o składzie: 10 μ M NBD-C6-sfingomielina i 30 μ M 1,2-dioleilo-*sn*-glicerolo-3-fosfocholina (Avanti) [240]. Mieszaninę inkubowano przez 1,5 godziny w 37°C, po czym reakcję hydrolizy sfingomieliny zatrzymywano przez dodanie 0,45 ml 2-propanolu, 1,5 ml heptanu i 0,2 ml PBS. Po rozdzieleniu faz i zebraniu fazy górnej mierzono w niej fluorescencję NBD-ceramidu, powstałego w wyniku hydrolizy NBD-sfingomieliny, wykorzystując

spektrofluorymetr Spex (Yobin-Yvon, Edison, NJ), wzbudzenie $\lambda=460$ nm, emisja $\lambda=534$ nm. Otrzymane wyniki były normalizowane w stosunku do zawartości białka mierzonej w lizatach komórkowych metodą BCA.

5.4.3. Pomiary aktywności neutralnej sfingomielinazy

Komórki J774 (1×10^6 w 1 ml RPMI/10% FBS) nanoszono na płytkę 12-dółkową i hodowano 24 godziny (37°C). Po odmyciu komórek w buforze PD hodowlę inkubowano w RPMI10% FBS zawierającym $100 \mu\text{M}$ imipraminy w celu wywołania proteolizy ASMazy (60 minut, 37°C) po czym komórki poddawano 30-minutowej lizie (4°C) w $130 \mu\text{l}$ buforu zawierającego 0,2% Triton X-100, 5 mM MgCl_2 , 50 mM HEPES oraz mieszaninę inhibitorów proteaz (2 mM PMSF oraz po $10 \mu\text{g/ml}$ aprotininy, leupeptyny i pepstatyny), pH 7.4. W dalszej części testu mierzono ilość fluorescencyjnego produktu utleniania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego przez H_2O_2 powstający w wyniku rozkładu choliny przez oksydazę choliny. Cholina jest z kolei produktem reakcji defosforylacji fosfocholiny powstającej w wyniku działania sfingomielinazy [241]. Lizat ($100 \mu\text{l}$) mieszano ze $100 \mu\text{l}$ roztworu zawierającego 0,4% Triton X-100, 1 mM sfingomielinę C16, 4 mM kwas 4-hydroksyfenylooctowy, 10 U/ml alkalicznej fosfatazy (Pierce), 0,5 U/ml oksydazy choliny, 20 U/ml peroksydazy chrzanowej i 100 mM HEPES, pH 7.4. Po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 37°C reakcja była zatrzymywana przez dodanie 0.5 ml roztworu 10 mM EDTA w PBS (4°C). Fluorescencja próbek była mierzona w spektrofluorymetrze Spex (Yobin-Yvon, Edison, NJ) przy wzbudzeniu $\lambda=320$ nm i emisji $\lambda=400$ nm, a odczyty normalizowane w stosunku do zawartości białka mierzonej w lizatach komórkowych przy pomocy zestawu Micro BCA (Thermo Scientific).

5.5. Pomiary poziomu TNF α i RANTES w nadsączu komórek przy pomocy testów ELISA

Komórki J774 były nanoszone na płytkę 96-dółkową w ilości $0,5 \times 10^5$ na dołek w $250 \mu\text{l}$ DMEM/10% FBS i inkubowane przez noc w 37°C . Komórki stymulowano 1-1000 ng/ml LPS w $200 \mu\text{l}$ DMEM/10% FBS w temperaturze 37°C . Po określonym czasie stymulacji (1-24 godz.) zbierano $150 \mu\text{l}$ nadsączu znad komórek, w którym oceniano ilość cytokin TNF α i RANTES za pomocą testów ELISA, odpowiednio „ELISA MAXTM Standard Set Mouse TNF α ” (BioLegend) i „DuoSet ELISA Development System Mouse CCL5/RANTES” (R&D Systems), zgodnie z instrukcjami producentów. Testy ELISA

wykonywane były na płytkach 96-dołkowych MaxiSorpTM (Nunc). Do końcowej reakcji używano 100 µg/ml TMB w 100 µl 100 mM buforu cytrynowego, pH 5.0, z dodatkiem 0,15% H₂O₂. Reakcję utleniania TMB zatrzymywano przez dodanie 100 µl 2 M kwasu siarkowego. Absorbancja była odczytywana za pomocą czytnika płytek Sunrise (Tecan) przy λ=450 nm i korekcji przy λ=570 nm. Stężenie cytokin obliczano na podstawie krzywej standardowej przy użyciu programu GraphPad Prism.

Pozostałe na płytce komórki były wybarwiane fioletem krystalicznym w celu zweryfikowania ich ilości. Do dołków dodawano 50 µl 0,05% fioletu krystalicznego w 20% metanolu i inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie płytkę płukano trzykrotnie wodą i zostawiano do wyschnięcia. Następnie do dołków dodawano 150 µl metanolu w celu wyekstrahowania fioletu krystalicznego. Po ewentualnym rozcieńczeniu, intensywność zabarwienia próbek była mierzona w czytniku płytek Sunrise (Tecan) przy λ=570 nm. Odczyty służyły do normalizowania stężenia produkowanych cytokin.

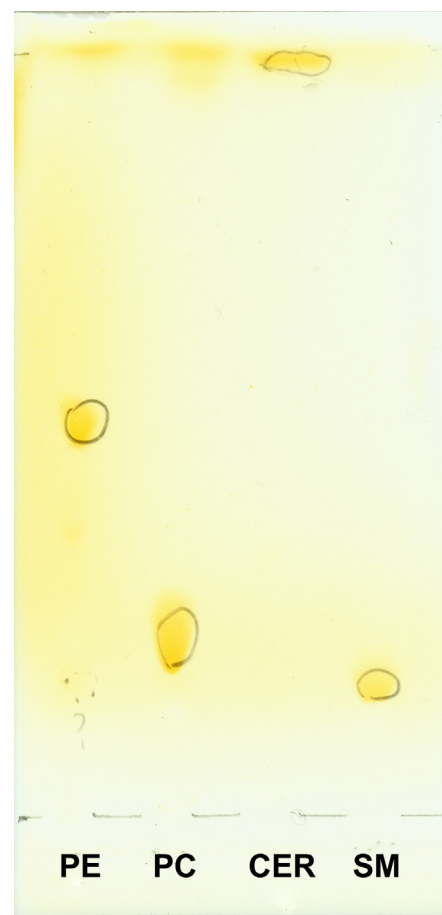
5.6. Pomiary poziomu komórkowego ceramidu metodą izotopową

Komórki J774 poddawane były znakowaniu izotopowemu za pomocą prekursora ceramidu, [³H]-seryny (Parkin Elmer, Waltham) w stężeniu 4 µCi/ml na 1x10⁶ komórek. Komórki (1x10⁶) hodowano w obecności izotopu w 2 ml pożywki DMEM zawierającej 6% FBS na szalkach z pokryciem do hodowli tkankowych o średnicy 30 mm (Falcon) przez 40 godzin, 37°C. Po znakowaniu komórki były przemywane buforem PD z dodatkiem 1 mM MgCl₂ i 1 mM CaCl₂, a następnie odrywane mechanicznie z powierzchni szalek i zawieszane w buforze PD. Po zwirowaniu (400xg, 3 min, temp. pokojowa), komórki były poddawane lizie w 1 ml 0,1% SDS. Część lizatu (100 µl) pozostawiano do pomiaru zawartości białka, a z pozostałej ekstrahowano lipidy przez dodanie 3 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:2, v:v) i worteksowanie (1 min). Po dodaniu 1 ml chloroformu i 1 ml buforu PBS worteksowanie powtarzano a następnie mieszaninę wirowano (1000xg, 2 min., temp. pokojowa) w celu rozdzielenia faz. Dolną fazę przenoszono do nowej próbówki i odparowywano w strumieniu azotu. Po wysuszeniu, wyekstrahowane lipidy zawieszano w 30 µl mieszaniny chloroform:metanol (19:1, v:v).

Tak przygotowane lipidy były poddawane rozdzielaniu na płytce do chromatografii cienkowarstwowej (Silica Gel 60, Merck) inkrustowanej 1% szczawianem wapnia. Płytkę była uprzednio aktywowana przez wyprażanie w 120°C przez 30 minut. Całość ekstraktu lipidowego (30 µl) oraz po 25 µg ceramidu C16 i sfingomieliny C16 z jaja kurzego

(Avanti) w 30 μ l mieszaniny chloroform:metanol, (1:2, v:v) nanoszono na płytkę w porcjach po 10 μ l. Rozdział lipidów przeprowadzano w mieszaninie octan metylu:1-propanol:chloroform:chlorek potasu (25:25:25:10:9, v:v), po czym płytkę suszono na powietrzu. Lipidy uwidacziano po umieszczeniu płytki w oparach jodu w ekcykatorze (Ryc. 5.1.). Piętna odpowiadające obszarom, gdzie według wskazań standardu znajdował się ceramid, zeszkrobywano z płytki i zawieszano w mieszaninie płynu scyntylacyjnego i etanolu (7:3, v:v). Radioaktywność próbek była mierzona w liczniku scyntylacyjnym LS6000TA (Beckman) i normalizowana w stosunku do zawartości białka.

Ryc. 5.1. Rozdział standardowych lipidów na płytce chromatograficznej, uwidocznionych w oparach jodu. PE – fosfatydyloetanolamina, PC – fosfatydylocholina, CER – ceramid C:16, sfingomielina – C:16



5.7. Oznaczanie poziomu białek i lipidów na powierzchni komórek za pomocą cytometrii przepływowej

5.7.1. Oznaczanie poziomu powierzchniowego TLR4 i CD14

Do doświadczeń prowadzonych przy użyciu metod cytometrii przepływowej używano komórek J774 w zawiesinie (patrz 3.2). Bezpośrednio przed doświadczeniem komórki były rozdzielone po $0,5 \times 10^6$ /próbę. Po odwirowaniu (400xg, 3 min., temp. pokojowa) komórki były zawieszane w 150 μ l pożywki RPMI/10% FBS zawierającej odpowiedni czynnik „blokujący” i inkubowane 30 minut w 4°C. Stosowane czynniki blokujące obejmowały 5% lub 20% inaktywowaną surowicę mysią (Jackson ImmunoResearch), IgG mysie lub agregaty IgG mysich w stężeniu 1 mg/ml, a także mieszaniny tych czynników. Agregaty IgG przygotowywano poprzez podgrzewanie (25 min., 63°C) i schładzanie (5 min., 4°C) 10 mg/ml roztworu mysich IgG; duże agregaty białek usuwano przez wirowanie (5000xg,

5 min., 4°C). Po wyblokowaniu wolnych miejsc wiążących białka na powierzchni błony komórkowej, komórki zbierano przez wirowanie (400xg, 3 min., 4°C) i zawieszano w 100 µl RPMI zawierającego 2-5 µg/ml odpowiedniego przeciwciała: króliczego anti-TLR4 (Santa Cruz), króliczego anti-CD14 (Santa Cruz) lub kontrolnego króliczego IgG (Jackson ImmunoResearch) w obecności 5% inaktywowanej surowicy mysiej. Po inkubacji (40 min., 4°C) komórki przemywano trzykrotnie buforem PD, a następnie zawieszano w 100 µl RPMI zawierającego 10 µg/ml koziego IgG-FITC skierowanego przeciwko króliczym IgG (Jackson ImmunoResearch) w obecności 5% inaktywowanej mysiej surowicy. Po kolejnych 40 minutach inkubacji (4°C) komórki ponownie odmywano buforem PD, a następnie utrwalano 20 minut w 1% formaldehydzie w PBS (0,5 ml na próbę, 4°C) i analizowano w cytometrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson) obsługiwany przez program CellQuest. Analizie poddawano 10 000 komórek z każdej próbki. W celu obliczenia ostatecznej wartości sygnału, od średniej geometrycznej intensywności fluorescencji danej próbki odejmowano średnią otrzymaną dla komórek inkubowanych z kontrolnym przeciwciałem króliczym IgG. W serii wstępnych doświadczeń, CD14 uwidaczniano stosując szczurze IgG swoiste wobec tego białka (Santa Cruz Biotechnology) oraz ośle anti-szczurze IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch) uzyskując takie same wyniki jak przy użyciu przeciwciał króliczych.

5.7.2. Oznaczanie poziomu powierzchniowego ceramidu

Komórki J774 odwirowywano, zawieszano w świeżej pożywce, rozdzielano po $0,5 \times 10^6$ /próbę, a następnie utrwalano w 1% formaldehydzie w buforze PBS przez 15 minut (4°C). Po trzykrotnym przemyciu komórek buforem PD, zawieszano je w 150 µl PBS z 3% kozią surowicą i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki były inkubowane z 2 µg/ml mysich IgM rozpoznających ceramid (Alexis) lub z równym stężeniem kontrolnych mysich IgM w PBS (30 min., temp. pokojowa). Po trzykrotnym przemyciu w PBS komórki były inkubowane z 10 µg/ml przeciwciała rozpoznającego mysie IgM koniugowanego z FITC (Sigma) w PBS (40 min., temp. pokojowa). Po dwóch kolejnych przemyciach buforem PBS komórki zawieszano w 500 µl tego buforu i analizowano w cytometrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson) obsługiwany przez program CellQuest. Analizie poddawano 10 000 komórek z każdej próbki. Od średniej geometrycznej intensywności fluorescencji próbek odejmowano średnią otrzymaną dla komórek inkubowanych z kontrolnym przeciwciałem mysim IgM.

5.7.3. Oznaczanie poziomu powierzchniowego gangliozydu GM1

Komórki J774 odwirowywano od pożywki, zawieszano w świeżej pożywce i rozdzielano po $0,5 \times 10^6$ /próbę. Po odwirowaniu komórki zawieszano w 200 μ l RPMI/10% FBS z 2 μ g/ml podjednostki B toksyny cholery skoniugowanej z FITC (CTX-FITC) i inkubowano 40 minut w 4°C. Po trzykrotnym odmyciu buforem PD komórki utrwalano 20 minut w 1% formaldehydzie w PBS (0,5 ml na próbę, 4°C) i analizowano w cytometrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson) obsługiwany przez program CellQuest. Analizie poddawano 10 000 komórek z każdej próbki, od średniej geometrycznej intensywności fluorescencji próbek odejmowano wartość tej średniej otrzymaną dla komórek kontrolnych, nieinkubowanych z CTX-FITC.

5.8. Oznaczanie poziomu CD14 i GM1 na powierzchni komórek za pomocą laserowej cytometrii skaningowej

Komórki J774 były nanoszone w ilości 2×10^4 na szkiełko nakrywkowe 15x15 mm w DMEM/10% FBS i hodowane przez 18 godzin w 37°C. Po przemyciu buforem PD, komórki były utrwalane w 3% formaldehydzie na buforze PHEM (60 mM Pipes, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA i 4 mM $MgCl_2$, pH 6.9) przez 10 minut w 4°C i dodatkowo 20 minut w temperaturze pokojowej. Kolejne inkubacje prowadzone były również w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym odmyciu w buforze PHEM, komórki inkubowano przez 5 minut z 50 mM NH_4Cl /PHEM w celu wyblokowania wolnych grup aldehydowych, 20 minut w TBS z 5% inaktywowaną mysią surowicą, a następnie przez 40 minut ze szczurzym przeciwciałem IgG anti-CD14 (2 μ g/ml w TBS/5% inaktywowana mysia surowica) lub z kontrolnymi szczurzymi IgG w tym samym stężeniu (Jackson ImmunoResearch). Nadmiar przeciwciał był odmywany (5 razy po 5 min. w TBS), po czym komórki inkubowano 40 minut z drugorzędowym oślim IgG-FITC skierowanym przeciwko szczurzym IgG (10 μ g/ml w TBS zawierającym 0,2% BSA). W serii doświadczeń, w miejsce przeciwciał rozpoznających i uwidaczniających CD14 komórki inkubowano z 2 μ g/ml podjednostki B toksyny cholery skoniugowanej z FITC, w celu uwidocznienia gangliozydu GM1. Po kolejnym odmyciu (5 razy po 5 min. w TBS), komórki powtórnie utrwalano (3% formaldehyd w TBS, 10 min.), a następnie permeabilizowano z użyciem 0,05% Tritonu X-100 w TBS (2 min., 4°C), przemycano trzykrotnie w TBS i inkubowano z 1 μ g/ml DAPI w celu uwidocznienia DNA (30 min.). Po odmyciu preparatów w TBS i jednokrotnie w H_2O , nanoszono na nie kroplę mowiolu (PolyScience) zawierającego 2,5% czynnika stabilizującego fluorescencję DABCO

(Sigma) i analizowano w laserowym cytometrze skaningowym (CompuCyte) obsługiwany przez oprogramowanie iCys. Wynik analizy stanowił średnią wartość fluorescencji dla około 500 komórek z każdego wariantu. Od wartości odczytów fluorescencji prób odejmowano wartości preparatów kontrolnych, inkubowanych ze szczurzym IgG.

5.9. Oznaczanie poziomu TLR4 na powierzchni komórek techniką izotopową

Poziom TLR4 oznaczano na powierzchni komórek rosnących na podłożu oraz przeniesionych w stan zawiesiny.

Komórki adherentne: W celu oznaczenia poziomu TLR4 na powierzchni komórek adherentnych, komórki J774 przenoszono do płytki 24-dołkowej ($1,5 \times 10^6$ komórek w 1 ml DMEM/10% FBS na dołek) i hodowano 18 godzin (37°C). Po stymulacji komórek, płytki hodowlane były przenoszone na lód, komórki przemywano buforem PD z dodatkiem 1 mM MgCl_2 i 1 mM CaCl_2 (4°C) i inkubowane w 200 μl buforu PD zawierającego 10% inaktywowaną myszą surowicę (4°C). Po 20 minutach, na komórki nawarstwiano 200 μl buforu PD zawierającego 5 $\mu\text{g/ml}$ króliczego IgG swoistego wobec TLR4 (Santa Cruz Biotechnology) lub równej ilości kontrolnego króliczego IgG (Jackson ImmunoResearch) w obecności 5% inaktywowanej mysiej surowicy. Inkubacja z przeciwciałami trwała 40 minut (4°C), po czym nadmiar niezwiązanych przeciwciał odmywano trzykrotnie buforem PD (4°C). Następnie komórki inkubowano w 200 μl PBS zawierającego 0,1 μg koziego przeciwciała skierowanego przeciwko króliczemu IgG i wyznakowanego ^{125}I (0,5 $\mu\text{Ci/próbkę}$, PerkinElmer) oraz 0,1 μg niewyznakowanego koziego przeciwciała rozpoznającego królicze IgG (Jackson ImmunoResearch). Po 1,5 godziny inkubacji (4°C) komórki odmyto trzykrotnie buforem PD zawierającym 0,2% BSA, przeniesiono w tym buforze do probówek i zawieszono w 150 μl PBS; 20 μl zawiesiny komórek pozostawiano do pomiaru ilości białka. Pozostałe komórki zawieszano w 1,8 ml mieszaniny płynu scyntylacyjnego i Tritonu X-100 (2:1, v:v). Po 20 minutach inkubacji radioaktywność próbek była analizowana w liczniku scyntylacyjnym LS6000TA (Beckman) i normalizowana w stosunku do zawartości białka.

Komórki w zawieszynie: Komórki ($0,5 \times 10^6/próbkę$) były przenoszone na lód i przemywane dwukrotnie buforem PD przez wirowanie (400xg, 3 min., 4°C). Następnie komórki inkubowano w 200 μl buforu PD z dodatkiem 10% inaktywowanej mysiej surowicy przez 20 minut (4°C) oraz 200 μl buforu PD zawierającego 5 $\mu\text{g/ml}$ króliczego IgG swoistego wobec TLR4 lub równej ilości kontrolnego króliczego IgG (Jackson ImmunoResearch) w

obecności 5% mysiej surowicy (40 min., 4°C). Po inkubacji z przeciwciałem komórki były trzykrotnie przemywane buforem PD (jak wyżej) i utrwalone w 4% formaldehydzie na buforze PHEM przez 20 minut w 4°C i dodatkowe 10 minut w temperaturze pokojowej. Po odmyciu komórek trzykrotnie buforem PHEM poddawano je 15-minutowej inkubacji z 50 mM NH₄Cl w celu wyblokowania wolnych grup aldehydowych. Reakcję komórek z mieszaniną przeciwciał znakowanych ¹²⁵I i nieznakowanych, opisaną wyżej dla komórek adherentnych, przeprowadzano przez 1,5 h w temperaturze pokojowej z delikatnym wytrząsaniem. Po skończonej inkubacji komórki odmywano trzykrotnie w buforze PD/0,2% BSA, zawieszano w 150 µl PBS, odebrano 20 µl zawiesiny komórek do oceny ilości białka, a w pozostałej części próbki mierzono radioaktywność jak opisano powyżej.

5.10. Analiza składu białkowego techniką elektroforezy w żelu poliakryloamidowym i immunoblotingu

5.10.1. Denaturujący rozdział białek w żelu poliakryloamidowym (SDS-PAGE)

Komórki J774 bądź RAW 264.7 były nanoszone w ilości 1×10^5 w 250 µl DMEM/10% FBS na płytkę 96-dółkową z pokryciem do hodowli tkankowych i hodowane 18 godzin (37°C). Po stymulacji komórek, płytka była przenoszona na lód, a komórki przemywane trzykrotnie buforem PD z dodatkiem 1 mM MgCl₂ i 1 mM CaCl₂ (4°C) i lizowane przez dodanie do dołków 60 µl buforu zawierającego 0,5% Triton X-100, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 20 mM Hepes, pH 7.4, 50 µM tlenek fenylarsenu, 10 mM fosforanu p-nitrofenolu, 1 mM Na₃VO₄ oraz inhibitory aktywności proteaz (4°C). Po 10 minutach do lizatów dodawano 20 µl czterokrotnie stężonego buforu do próbek (końcowe stężenia: 2% SDS, 10% glicerol, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% β-merkaptioetanol, 0,004% błękit bromofenolu). Próbki przenoszono do probówek, gotowano 5 minut, schładzano, wirowano (12000xg, 30 sek., temp. pokojowa) i nanoszono w objętości 15 µl na 10% żel poliakryloamidowy. Rozdział białek prowadzono w aparacie Mighty Small II (Hoefler) przy napięciu 120V w buforze z 25 mM Tris, 192 mM glicyny i 0.1% SDS. Masy cząsteczkowe polipeptydów określano na podstawie ich ruchliwości elektroforetycznej porównywanej z migracją zestawu standardowych białek (Bio-Rad).

5.10.2. Transfer i detekcja białek na błonie nitrocelulozowej

Białka rozdzielone na żelu poliakrylamidowym były przenoszone na błonę nitrocelulozową wg metody Towbina i wsp. [242]. Transfer prowadzono w aparacie TE22 (Amersham Biosciences) w buforze 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS i 10% metanol przez 18 godzin przy 120 mA lub 1,5 godziny przy 400 mA. Obecność białek na błonie sprawdzono poprzez jej barwienie 0,2% Ponceau S. Do płukania błony używano buforu TBST (TBS z 0,05% Tween 20). Wolne miejsca na błonie nitrocelulozowej blokowano inkubując ją przez 1 godzinę w 3% BSA/TBST i 1 godzinę w mieszaninie 1% żelatyny i 1% poliwinylpyrolidonu (Sigma) na TBST. W celu detekcji białek błonę inkubowano przez 1,5 godziny z przeciwciałem pierwszorzędowym, a po płukaniu (5 x 7 min., TBST) przez 1 godzinę z przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z HRP. Po intensywnym odmyciu niezwiązanych przeciwciał (jak wyżej) na błonach przeprowadzano reakcję chemiluminescencji przy użyciu odczynnika SuperSignal West Pico (Pierce), a immunoreaktywne białka wykrywano na błonach radiograficznych (Foton). Analizę densytometryczną immunoreaktywnych polipeptydów przeprowadzano po zeskanowaniu kliszy przy pomocy programu ImageJ.

W doświadczeniach używano następujących przeciwciał:

- królicze IgG rozpoznające TLR4 (H-80, Santa Cruz Biotech.), 1:2000;
- królicze IgG rozpoznające CD14 (rmC5-3 BD Pharmingen), 1:500;
- królicze IgG rozpoznające fosfo-I κ B (14D4, Cell Signaling), 1:2000;
- mysie IgG rozpoznające aktyne (C4, MP Biomedicals), 1:80 000;
- szczurze IgG rozpoznające metkę HA (3F10, Roche), 1:3000;
- drugorzędowe kozie IgG rozpoznające królicze IgG, sprzężone z HRP (Rockland), 1:5000;
- drugorzędowe kozie IgG rozpoznające szczurze IgG, sprzężone z HRP (Rockland) 1:5000;
- drugorzędowe kozie IgG rozpoznające mysie IgG sprzężone z HRP (Jackson ImmunoResearch), 1:100 000.

5.11. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w próbkach było badane przy pomocy zestawu Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) zgodnie z instrukcjami producenta. Do dołków płytki 96-dołkowej dodawano po 150 μ l próbki lizatów komórkowych, rozcieńczonych, aby zredukować stężenia detergentów oraz 150 μ l uprzednio przygotowanego odczynnika do

pomiaru białka (2 godz, 37⁰C). Absorbancję próbek mierzono w czytniku płytek Sunrise (Tecan) przy $\lambda=562$ nm, stężenie białka obliczano przy użyciu programu GraphPad Prism.

5.12. Mikroskopia fluorescencyjna i analiza obrazu

Komórki J774 były nanoszone w ilości $2,5 \times 10^4$ na szkiełko nakrywkowe 15x15 mm w DMEM/10% FBS i hodowane przez 18 godzin w 37⁰C. Po stymulacji LPS komórki były przemywane buforem PD i przenoszone na lód. W tych warunkach na szkiełka nanoszono 100 μ l DMEM zawierającym 10% inaktywowanej surowicy mysiej i 20 mM Hepes, pH 7,4 (Jackson ImmunoResearch). Po 30 minutach komórki poddawano inkubacji z 4 μ g/ml króliczego przeciwciała anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnology) w DMEM w obecności 5% mysiej surowicy i 20 mM HEPES, pH 7.4 (40 min., 4⁰C). Nadmiar przeciwciał odmywano trzykrotnie w buforze PD zawierającym 1 mM MgCl₂ i 1 mM CaCl₂ i 0,2% BSA (4⁰C). Komórki inkubowano następnie z owczym przeciwciałem rozpoznającym królicze IgG sprzężonym z biotyną (Rockland) w warunkach analogicznych do inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym. Po trzykrotnym przemyciu komórki utrwalono w 4% formaldehydzie w buforze PHEM (10 min. w 4⁰C i 20 min. w temp. pokojowej). Następne etapy procedury prowadzono w temperaturze pokojowej. Komórki przemywano w PHEM i poddano 5 minutom inkubacji z 50 mM NH₄Cl w PHEM w celu wyblokowania wolnych grup aldehydowych. Następnie, komórki inkubowano z 3% BSA w TBS oraz z 2 μ g/ml szczurzego przeciwciała anti-CD14 (Santa Cruz Biotechnology) w TBS z 0,2% BSA (obie inkubacje 30 min.). W celu uwidocznienia powierzchniowych TLR4 i CD14 przeprowadzono kolejną inkubację komórek w mieszaninie zawierającą Extrawidinę-FITC (Sigma) i osłe przeciwciało skierowane przeciwko szczurzym IgG wyznakowane Texas Red (Jackson ImmunoResearch). Obie inkubacje prowadzono w buforze TBS z 0,2% BSA przez 30 minut. W serii doświadczeń, w celu uwidocznienia filamentów aktynowych, komórki permeabilizowano przy użyciu 0,005% digitoniny/PHEM (10 min., temp. pokojowa) i inkubowano z 3% BSA/PHEM a następnie z falloidyną sprzężoną z TRITC (Sigma) lub Alexa Fluor 350 (Invitrogen, każda inkubacja trwała 60 minut i prowadzona była w TBS zawierającym 0,2% BSA) i jednokrotnie w H₂O. Ostatecznie na preparaty nanoszono kroplę mowiolu (PolyScience) zawierającego 2,5% DABCO (Sigma) i analizowano pod mikroskopem konfokalnym Leica (TCS SP5) z sekwencyjnym wzbudzaniem FITC i TRITC/Texas Red w celu uniknięcia nałożenia ich fluorescencji. Zbierano zwykle 10-12 przekrojów optycznych o grubości 0,15 μ m od strony grzbietowej do brzusznej komórki. Parametry wzbudzania i rejestracji obrazu ustawiano tak, aby w obu

kanałach rejestrować intensywność pikseli w podobnym zakresie. W próbkach kontrolnych pomijano etap inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi; stwierdzono w nich jedynie śladowy poziom fluorescencji. Współwystępowanie TLR4 i CD14 było oceniane przy pomocy programu Leica Application Suite AF poprzez obliczenie współczynnika korelacji Pearsona oraz współczynnika nakładania obrazu (po podjęciu wartości tła) dla co najmniej 40 komórek na próbkę [243]. Zliczano też populację komórek, w których widoczne było skupienie receptora CD14 i/lub TLR4 w lamelli wiodącej komórek. Tę analizę prowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon zliczając co najmniej 100 komórek w kilku polach widzenia dla każdego wariantu doświadczalnego.

5.13. Pomiary internalizacji LPS-AF488 i dekstranu-FITC za pomocą cytometrii przepływowej

Komórki osadzano z zawiesiny przez wirowanie (400xg, 3 min., temp. pokojowa), zawieszano w pożywce RPMI z 10% FBS i rozdzielano w ilości 1×10^6 na próbkę. Komórki zawieszano w 0,5 ml RPMI/10% FBS zawierającego 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS-AF488 (Invitrogen) lub 1 mg/ml dekstranu 40000 skoniugowanego z FITC (dekstran-FITC) i inkubowano 5-60 minut z delikatnym wytrząsaniem (37°C). Po zakończeniu inkubacji komórki przenoszono na lód, przemywano dwa razy buforem PD przez wirowanie (400xg, 3 min., 4°C). Próby dzielono na dwie części; w jednej z nich, w celu wygaszenia fluorescencji LPS-AF488 i dekstranu-FITC związanych do powierzchni komórek, zawieszano je w 200 μl 100 ng/ml błękitu trypanu w PBS i inkubowano 5 minut (4°C). Po odmyciu PBS, komórki obu frakcji utrwalano w 1% formaldehydzie w PBS (0,5 ml na próbę, 20 min., 4°C) i analizowano w cytometrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson) obsługiwany przez program CellQuest. Analizie poddawano 10 000 komórek z każdej próby, a od średniej geometrycznej intensywności fluorescencji odejmowano wartość otrzymaną dla komórek nieinkubowanych z LPS-AF488 lub dekstranem-FITC.

5.14. Pomiary internalizacji transferyny za pomocą cytometrii przepływowej

Komórki J774 były nanoszone na szalkę bez pokrycia w pożywce RPMI bez FBS i inkubowane 18 godzin w 37°C. Następnie, komórki (1×10^6 na próbkę) zawieszano w 500 μl RPMI bez FBS zawierającego 10 $\mu\text{g/ml}$ transferyny skoniugowanej z Alexa Fluor 647 (TfR-AF647, Invitrogen) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C w celu umożliwienia związania transferyny do receptorów na powierzchni komórki. Nadmiar transferyny usuwano przemywając komórki dwukrotnie buforem PD (400xg, 3 min., 4°C).

Osad komórek zawieszano ostatecznie w 250 μ l RPMI bez FBS i inkubowano 5 minut w temperaturze 37⁰C, pozwalając na internalizację TfR-AF647. Komórki przenoszono na lód i rozdzielano na dwie części, z których pierwszą utrwalano w 1% formaldehydzie w PBS (0,5 ml na próbę, 20 min., 4⁰C). Pozostałą część inkubowano w roztworze zawierającym 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 20 mM bufor octanowy, pH 4.6 (0,5 ml na próbę, 3 min., 4⁰C) w celu desorpcji TfR-AF647 z powierzchni błony komórkowej, i po odmyciu w buforze PD utrwalano jak wyżej. Fluorescencję prób mierzono w cytometrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson) obsługiwanym przez program CellQuest. Analizie poddawano 10 000 komórek z każdej próby, a od średniej geometrycznej intensywności fluorescencji odejmowano wartość otrzymaną dla komórek nieinkubowanych z TfR-AF647.

5.15. Pomiary internalizacji transferyny za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej

Komórki RAW 264.7 były nanoszone w ilości $2,5 \times 10^4$ na szkiełko nakrywkowe 15x15 mm, hodowane 3 godzin w pożywce RPMI/10%FBS, a następnie 18 godzin w pożywce RPMI bez FBS (37⁰C). Do doświadczenia na szkiełka nanoszono po 100 μ l świeżej pożywki RPMI bez FBS zawierającej 10 μ g/ml TfR-AF546 (Invitrogen) i inkubowano 30 minut w 4⁰C. Po odmyciu w buforze PD (4⁰C) na szkiełka nanoszono po 100 μ l RPMI i przenoszono na 5 minut do 37⁰C celem umożliwienia internalizacji transferyny przez komórki. Po ponownym odmyciu w PD (4⁰C) na szkiełka nawarstwiano roztwór zawierający 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 20 mM bufor octanowy, pH 4.6 (3 min., 4⁰C) w celu desorpcji transferyny-AF546 z powierzchni błony komórkowej i przemywano ponownie w buforze PD. Komórki utrwalano w 3% formaldehydzie/PHEM (10 min., 4⁰C i 20 min. w temp. pokojowej), odmywano w TBS i przygotowywano preparaty w mieszaninie mowiolu/2.5% DABCO. Próbki analizowano w mikroskopie fluoroscencyjnym Nikon wyposażonym w kamerę CCD DXM1200C obsługiwaną przez program NIS-Elements F. Na zebranych obrazach przy pomocy programu ImageJ obliczano średnią fluorescencję w około 100 komórkach w każdym wariancie doświadczalnym.

5.16. Nadprodukcja zmutowanej formy dynaminy-2 w komórkach

Wektor pCMV5 niosący cDNA zmutowanej, niezdolnej do wiązania GTP formy dynaminy-2 (K44A) z metką HA oraz marker oporności na ampicylinę został skonstruowany w laboratorium Marka McNivena (Mayo Clinic College of Medicine, Scottsdale, AZ) i pozyskany dzięki uprzejmości dr hab. Marty Miączyńskiej z Pracowni Biologii Komórki, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa. Wektor ten został wprowadzony do kompetentnego szczepu *Escherichia coli* DH5 α metodą rubidowo-wapniową; transformowane bakterie były przechowywane w 20% glicerolu w -80°C. Po rozmrożeniu i namnożeniu bakterii w pożywce LB zawierającej 100 μ g/ml ampicyliny (18 godzin, 37°C) plazmid był izolowany przy pomocy zestawu GenElute Endotoxin Free Plazmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich), w celu otrzymania DNA o wysokiej czystości, pozbawionego LPS. Jako wektora kontrolnego użyto plazmidu bez wstawki genu dynaminy, który był izolowany w ten sam sposób.

Plazmidy były wprowadzane do komórek RAW 264.7 za pomocą odczynnika Neofectin (BioLabs) według protokołu producenta. W tym celu na szalkę 60 mm do hodowli tkankowych nanoszono 1.5×10^6 komórek w 4,5 ml pożywki RPMI/10% FBS i hodowano 18 godzin w 37°C. Na godzinę przed transfekcją komórkom wymieniano pożywkę na 4,5 ml świeżej pożywki RPMI z 10% FBS. DNA przygotowano poprzez mieszanie 5 μ g plazmidu z 250 μ l RPMI bez surowicy i delikatne worteksowanie. Następnie roztwór DNA łączono z 15 μ l odczynnika Neofectin rozpuszczonego w 250 μ l RPMI bez surowicy. Otrzymaną mieszaninę worteksowano, pozostawiono na 15 minut w temperaturze pokojowej w celu uformowania kompleksów odczynnika z DNA, a następnie nanoszono kroplami na szalkę z komórkami. Po 24 godzinach inkubacji komórki były zbierane i przenoszone w ilości 2×10^4 na szkiełko nakrywkowe lub 1×10^5 na dołek płytki 96-dółkowej, w zależności od typu doświadczenia, po czym hodowane kolejne 24 godziny w 37°C. Efektywność transfekcji była sprawdzana poprzez jednoczesną transfekcję komórek wektorem pMAX-GFP (Lonza) i zliczanie transfekowanych komórek w mikroskopie fluorescencyjnym; przeciętnie transfekcji ulegało około 40% populacji komórek. Równolegle prowadzono też detekcję nadprodukowanego białka w lizatach komórkowych wykrywając techniką immunoblottingu metkę HA.

5.17. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna była przeprowadzana za pomocą programu GraphPad Prism. Test t-Studenta był wykorzystywany do oceny istotności statystycznej różnic pomiędzy grupami eksperymentalnymi i kontrolnymi. Wartości p poniżej 0,05 były uznawane za istotne.

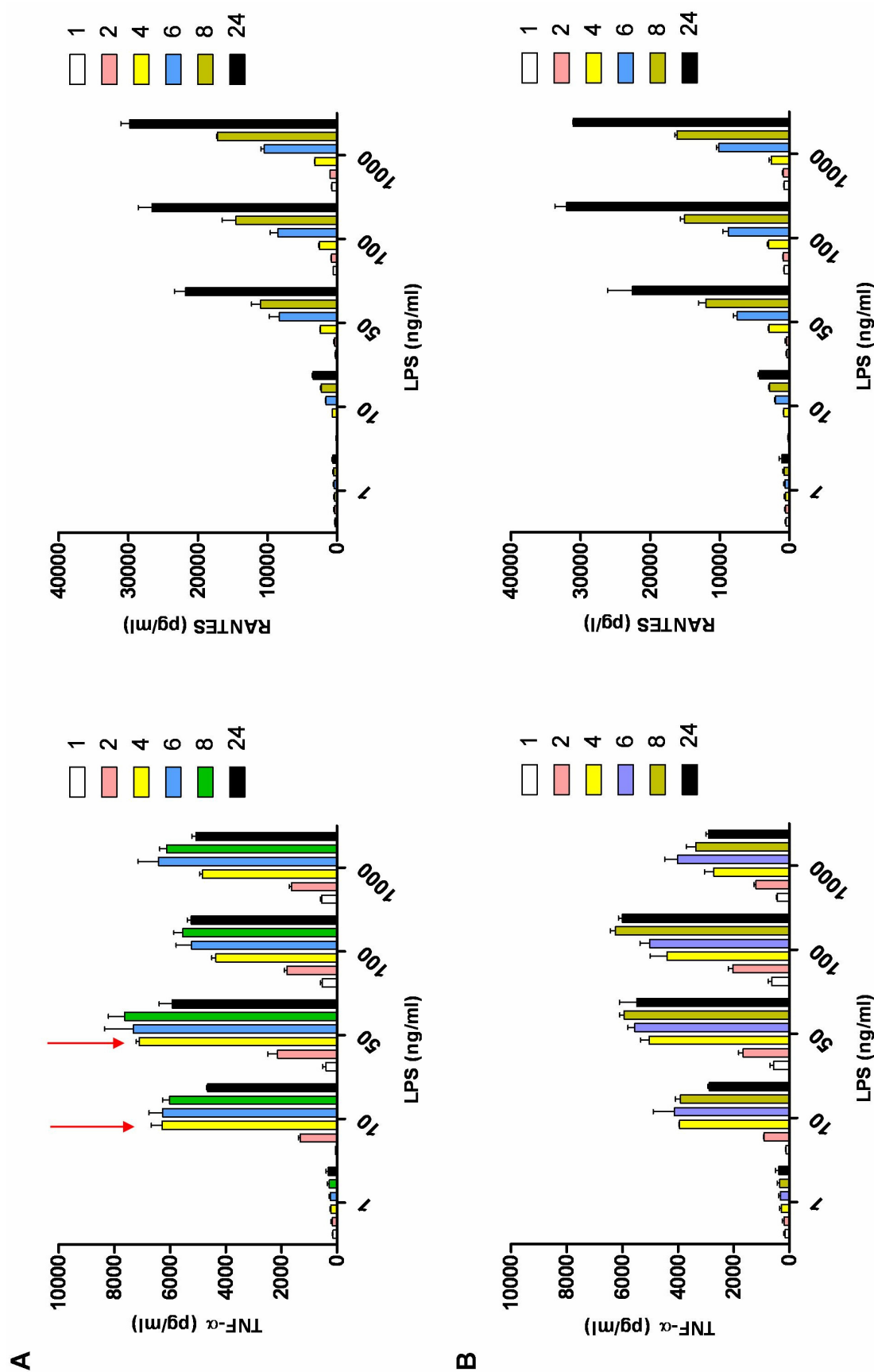
6. Wyniki

6.1. Produkcja cytokin indukowana przez LPS na ścieżce zależnej i niezależnej od MyD88 w komórkach J774

LPS stymuluje produkcję cytokin prozapalnych przez makrofagi wiążąc się do białek błony komórkowej - najpierw do białka CD14, a następnie do kompleksu białka MD-2 i receptora TLR4, który uruchamia kaskady sygnałowe. Dobór białek adaptorowych oddziałujących z TLR4 decyduje o dychotomii ścieżek sygnałowych generowanych przez ten receptor: jeden ze szlaków uruchamiany jest przy udziale białek adaptorowych MyD88 i TIRAP, drugi przez tandem adaptorów TRIF i TRAM (patrz 3.2.4.). W celu oceny dynamiki produkcji cytokin przez komórki makrofagopodobne linii J774 na obu tych szlakach, komórki poddano działaniu różnych stężeń lipopolisacharydu (1-1000 ng/ml) przez okres od 1 do 24 godzin (**Ryc. 6.1**). Następnie przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów do testów ELISA zmierzono poziom dwóch cytokin, TNF α oraz RANTES, w nadsączu zebranych z nad stymulowanych komórek. TNF α jest jedną z najważniejszych cytokin wydzielanych przez makrofagi, a jego produkcja stymulowana przez LPS zachodzi głównie na ścieżce zależnej od MyD88 (patrz 3.2.4.1.). Produkcja chemokiny RANTES/CCL5 (ang. *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted/Chemokine (C-C motif) ligand 5*) odbywa się natomiast na drodze aktywacji ścieżki sygnałowej zależnej od TRIF.

Maksymalną produkcję TNF α obserwowano przy niskich stężeniach LPS, 10-50 ng/ml, już po 4 godzinach stymulacji komórek (**Ryc. 6.1 A**, strzałki). Dłuższa aktywacja komórek nie powodowała zwiększenia poziomu produkowanego TNF α , a po okresie 24 godzin zauważalny był nieznaczny spadek ilości TNF α w nadsączu komórek. Wyższe stężenia lipopolisacharydu (100 i 1000 ng/ml) stymulowały produkcję TNF α słabiej niż stężenia niższe we wszystkich punktach czasowych (**Ryc. 6.1 A**).

Produkcja chemokiny RANTES miała inny przebieg niż produkcja TNF α (**Ryc. 6.1 A**). Poziom RANTES w nadsączu wzrastał wraz ze stężeniem LPS stosowanym do stymulacji komórek w zakresie od 1 do 100 ng/ml i osiągał plateau. Poziom RANTES wzrastał jednak nieprzerwanie w czasie stymulacji komórek przez wszystkie analizowane stężenia LPS. Produkcja RANTES była opóźniona w stosunku do produkcji TNF α : poziom uwalnianego przez komórki RANTES pozostawał na granicy detekcji przez pierwsze 2 godziny stymulacji, podnosił się po 4 godzinach i wzrastał aż do 24 godzin działania LPS.



Ryc. 6.1. Produkcja TNF α i RANTES przez komórki J774 w odpowiedzi na LPS. **A** – Produkcja cytokin w czasie 1-24 godzin (37°C) po stymulacji komórek wskazanymi stężeniami LPS poddanego intensywnemu worteksowaniu. **B** – Produkcja cytokin po stymulacji komórek wskazanymi stężeniami LPS poddanego worteksowaniu oraz sonikacji (1-24 godzin, 37°C). Strzałki wskazują optymalne warunki produkcji TNF α .

Sonikacja stanowi popularny sposób przygotowania lipopolisacharydu do doświadczeń [244], stosowany w celu uzyskania homogennej populacji micelli LPS. Wielkość micelli LPS może mieć wpływ na zdolność białka LBP do wiązania się z nimi, a przez to na efektywność przenoszenia monomerów LPS z micelli do receptorów CD14 i TLR4 makrofagów. W celu ustalenia optymalnych warunków aktywacji komórek przez LPS, zbadano wpływ sonikowanego LPS na produkcję TNF α i RANTES (**Ryc. 6.1 B**). Komórki stymulowane w obecności LPS poddanego wstępnej sonikacji charakteryzowały się nieco obniżoną produkcją TNF α w stosunku do LPS przygotowywanego przez worteksowanie z pominięciem etapu sonikacji. Maksimum produkcji TNF α przesunięte było w tych warunkach w stronę wyższych stężeń LPS (50-100 ng/ml), a wyraźne obniżenie produkcji było obserwowane dopiero przy 1000 ng/ml sonikowanego LPS (**Ryc. 6.1 B**). Dynamika produkcji chemokiny RANTES była podobna niezależnie od sposobu przygotowania LPS do stymulacji komórek (**Ryc. 6.1**, porównaj **A** i **B**). W dalszych doświadczeniach stosowano LPS bez wstępnej sonikacji, a poziom uwalnianych cytokin oznaczano po 4 godzinach stymulacji komórek przez LPS.

Podsumowując: produkcja obu analizowanych cytokin przez komórki J774 jest odmiennie stymulowana przez LPS. TNF α , produkowany na ścieżce zależnej od MyD88, jest wydzielany szybciej do środowiska; jego produkcja osiąga szczyt już po 4 godzinach stymulacji komórek przez niższe stężenia LPS (10-50 ng/ml). Dłuższa stymulacja oraz wyższe stężenia LPS prowadzą do obniżenia produkcji TNF α przez komórki. Natomiast produkowana na ścieżce TRIF-zależnej chemokina RANTES wydzielana jest z opóźnieniem w porównaniu z produkcją TNF α , ale jej poziom podnosi się wraz z czasem stymulacji. Produkcja RANTES rośnie w odpowiedzi na 1-100 ng/ml LPS i nie zmienia się przy wyższych stężeniach lipopolisacharydu użytych do stymulacji komórek.

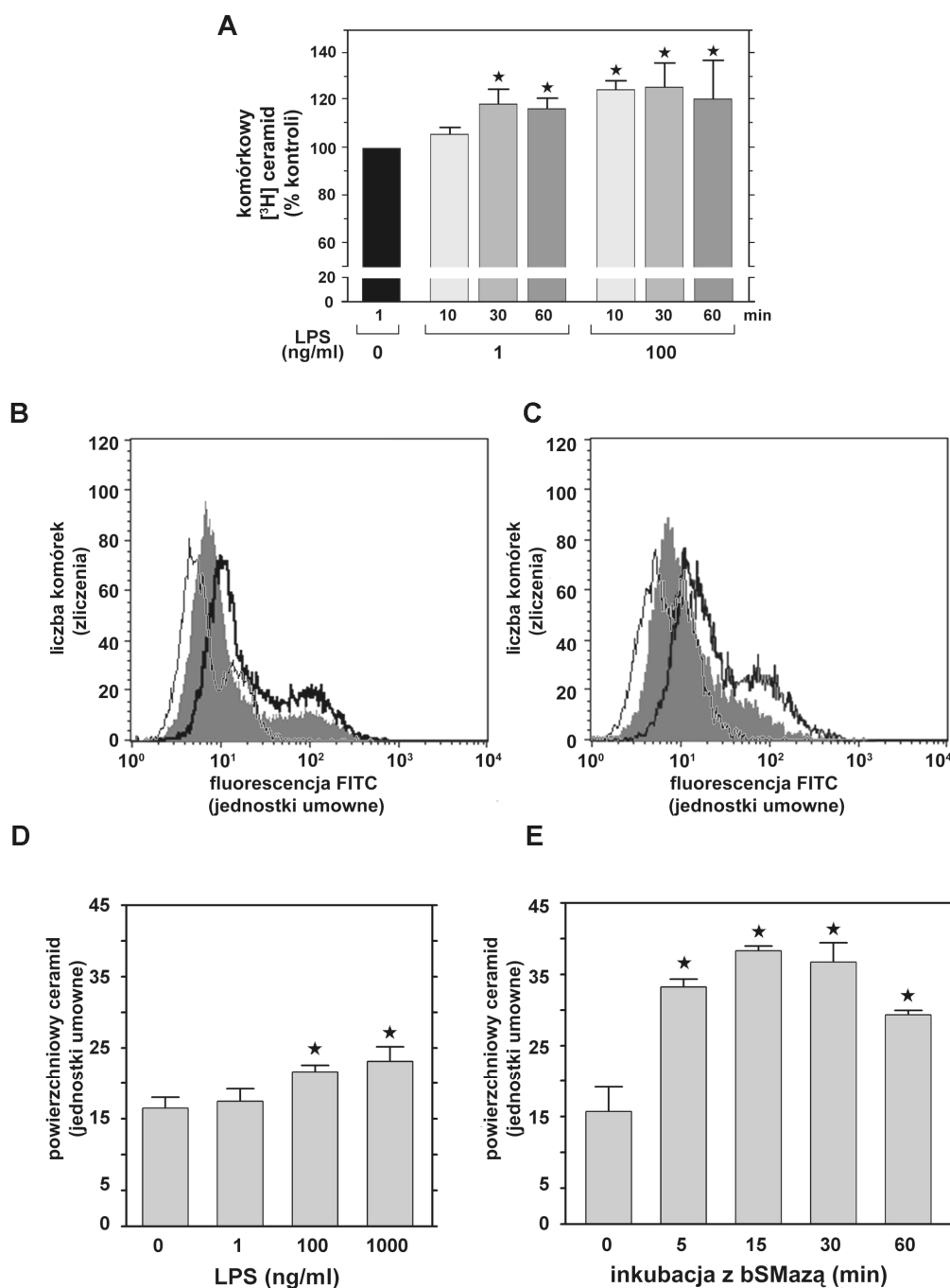
6.2. Stymulacja komórek przez LPS indukuje wzrost poziomu ceramidu

Zmniejszanie produkcji TNF α przez komórki stymulowane wyższymi stężeniami LPS (**Ryc. 6.1**) wskazywało na włączające się w tych warunkach mechanizmy negatywnie regulujące szlak(i) sygnałowe receptora TLR4. Takie mechanizmy wyciszające odpowiedź prozapalną zasługują na szczególną uwagę, ponieważ nadmierna reakcja organizmu na LPS prowadzi do sepsy, potencjalnie zagrażającej życiu. W polu naszego zainteresowania czynnikami regulującymi odpowiedź makrofagów na LPS znalazł się lipid błony komórkowej - ceramid, który generowany jest w wyniku hydrolizy sfingomieliny przez

sfingomielinazy i kontroluje aktywność szeregu receptorów komórek układu odpornościowego, takich jak CD95/receptor FAS (limfocyty T), CD40 (limfocyty B) i receptor FcγIIA (monocyty) [245-248]. Istniejące dotąd doniesienia na temat roli sfingomielinaz i ceramidu w regulacji odpowiedzi na LPS były nieliczne i często sprzeczne, sugerowały jednak możliwość jego działania jako negatywnego regulatora aktywacji komórek [165, 166, 168-170]. W celu określenia roli ceramidu w odpowiedzi komórek J774 na LPS zbadano, czy poziom tego lipidu w komórkach zmieniał się w czasie ich stymulacji (**Ryc. 6.2 A**). Pomiary ceramidu wyznakowanego trytem dokonane za pomocą metody TLC wykazały, że po 60 minutach stymulacji komórek przez 1 i 100 ng/ml LPS poziom ceramidu wzrastał w nich, odpowiednio, o 18% i o 27% w stosunku do komórek niestymulowanych. W komórkach poddanych działaniu 100 ng/ml LPS poziom ceramidu podnosił się szybciej osiągając plateau już po 10 minutach (**Ryc. 6.2 A**).

Ceramid generowany jest w czasie aktywacji szeregu receptorów błony komórkowej w wyniku hydrolizy sfingomieliny katalizowanej przez sfingomielinazy, kwaśną i neutralną, (odpowiednio ASMaza i NSMaza), nazywane tak w zależności od odczynu środowiska optymalnego dla aktywności tych enzymów. Sfingomielina występuje głównie w zewnętrznej warstwie błony komórkowej [249], dlatego jej hydroliza prowadzi do generacji ceramidu wykrywanego na powierzchni komórek. W celu analizy ilości ceramidu w zewnętrznej warstwie błony plazmatycznej komórki inkubowano z przeciwciałem IgM swoistym wobec ceramidu, a następnie z przeciwciałem anti-IgM znakowanym FITC, a pomiary fluorescencji przeciwciał związanych z komórkami przeprowadzono za pomocą cytometrii przepływowej (**Ryc. 6.2 B-E**). Analiza ta pozwoliła zaobserwować istotny wzrost ilości ceramidu na powierzchni komórek J774 w odpowiedzi na stymulację wyższymi stężeniami LPS (100-1000 ng/ml), który sięgał 40% po 10 minutach stymulacji. Efekt ten był znacznie słabszy (wzrost o około 6%) po stymulacji komórek przez 1 ng/ml LPS (**Ryc. 6.2 D**). Specyficzność stosowanej metody została potwierdzona poprzez pomiar ilości ceramidu pojawiającego się w zewnętrznej warstwie błony komórkowej w odpowiedzi na inkubację komórek z bakteryjną sfingomielinazą. W tych warunkach stwierdzono przejściowy wzrost poziomu powierzchniowego ceramidu, osiągający po 15 minutach działania enzymu ponad dwukrotną wartość w stosunku do poziomu ceramidu w komórkach kontrolnych (**Ryc. 6.2 E**).

Otrzymane wyniki wskazują na szybki i istotny wzrost poziomu ceramidu w komórkach poddanych działaniu 100-1000 ng/ml LPS.

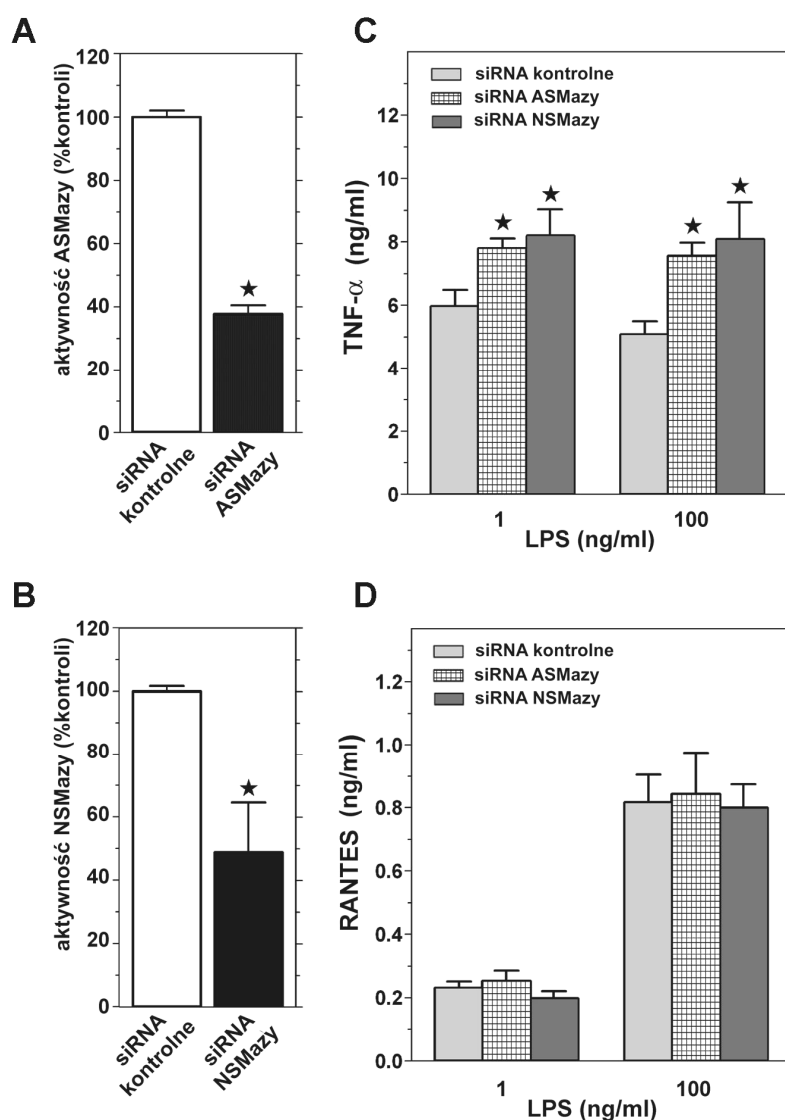


Ryc. 6.2. Produkcja ceramidu w odpowiedzi na stymulację komórek lipopolisacharydem. **A** - Całkowity poziom ceramidu w komórkach znakowanych [³H]-seryną i stymulowanych przez 1 i 100 ng/ml LPS, oznaczony metodą chromatografii cienkowarstwowej. Radioaktywność została znormalizowana względem zawartości białka w lizatach komórkowych. Przedstawione wyniki są średnią z trzech lub czterech doświadczeń. **B** i **C** - Poziom powierzchniowego ceramidu analizowany za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach wyznakowanych przeciwciałami anti-ceramid-IgM/anty-IgM-FITC; **B** - Komórki stymulowane przez 100 ng/ml LPS, 10 min., 37°C, **C** - Komórki inkubowane z 0.5 U/ml bakteryjnej sfingomielinazy, 15 min., 4 °C. Biały histogram przedstawia kontrolny poziom fluorescencji po znakowaniu komórek niespecyficznym przeciwciałem IgM i IgM-FITC; szary histogram oznacza poziom ceramidu w komórkach spoczynkowych; histogram z grubą czarną linią - poziom ceramidu w komórkach stymulowanych. **D** i **E** - Poziom powierzchniowego ceramidu mierzony przy użyciu cytometrii przepływowej w komórkach (**D**) stymulowanych przez 1-1000 ng/ml LPS, 10 min., 37°C i (**E**) inkubowanych 0.5 U/ml bSMazy przez 5-60 min., 4°C. Przedstawiono średnie wartości z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie względem kontroli („0 LPS”) przy p < 0.05.

6.3. Wyciszanie ekspresji kwaśnej i neutralnej sfingomielinazy prowadzi do zwiększonej produkcji TNF α w odpowiedzi na LPS

Jak wspomniano powyżej, ceramid może powstawać w czasie aktywacji komórek w wyniku hydrolizy sfingomieliny przy udziale kwaśnej i neutralnej sfingomielinazy. Istniejące doniesienia sugerowały, że obserwowana przez nas generacja ceramidu w komórkach stymulowanych lipopolisacharydem może zachodzić na drodze aktywacji tych enzymów [165, 166]. W celu weryfikacji udziału obu sfingomielinaz w odpowiedzi komórek na LPS posłużono się techniką transfekcji siRNA, która prowadzi do wyciszenia ekspresji genów ASMazy i NSMazy. Efektem transfekcji było obniżenie poziomu ekspresji obu enzymów w komórkach, o czym świadczyła zmniejszona aktywność kwaśnej i neutralnej sfingomielinazy mierzona w lizatach komórkowych, odpowiednio, o 62% i 53% (Ryc. 6.3 A, B).

Ryc. 6.3. Wpływ wyciszenia ekspresji genów kwaśnej i neutralnej sfingomielinazy na produkcję cytokin w odpowiedzi na LPS. **A** i **B** - Aktywność sfingomielinaz mierzona przy pH 5,0 (**A**) i pH 7,4 (**B**) po 48 godzinach od transfekcji komórek siRNA ASMazy (**A**) i NSMazy (**B**). Aktywność podana jest jako procent aktywności sfingomielinazy wykrywanej w komórkach transfekowanych kontrolnym siRNA. **C** i **D** - Produkcja TNF α (**C**) i RANTES (**D**) w komórkach transfekowanych kontrolnym siRNA oraz siRNA ASMazy i NSMazy i stymulowanych lipopolisacharydem przez 4 godziny (37°C). Wykresy przedstawiają uśrednione wyniki z trzech doświadczeń.
* - Statystycznie istotna różnica względem kontroli przy $p < 0.05$.



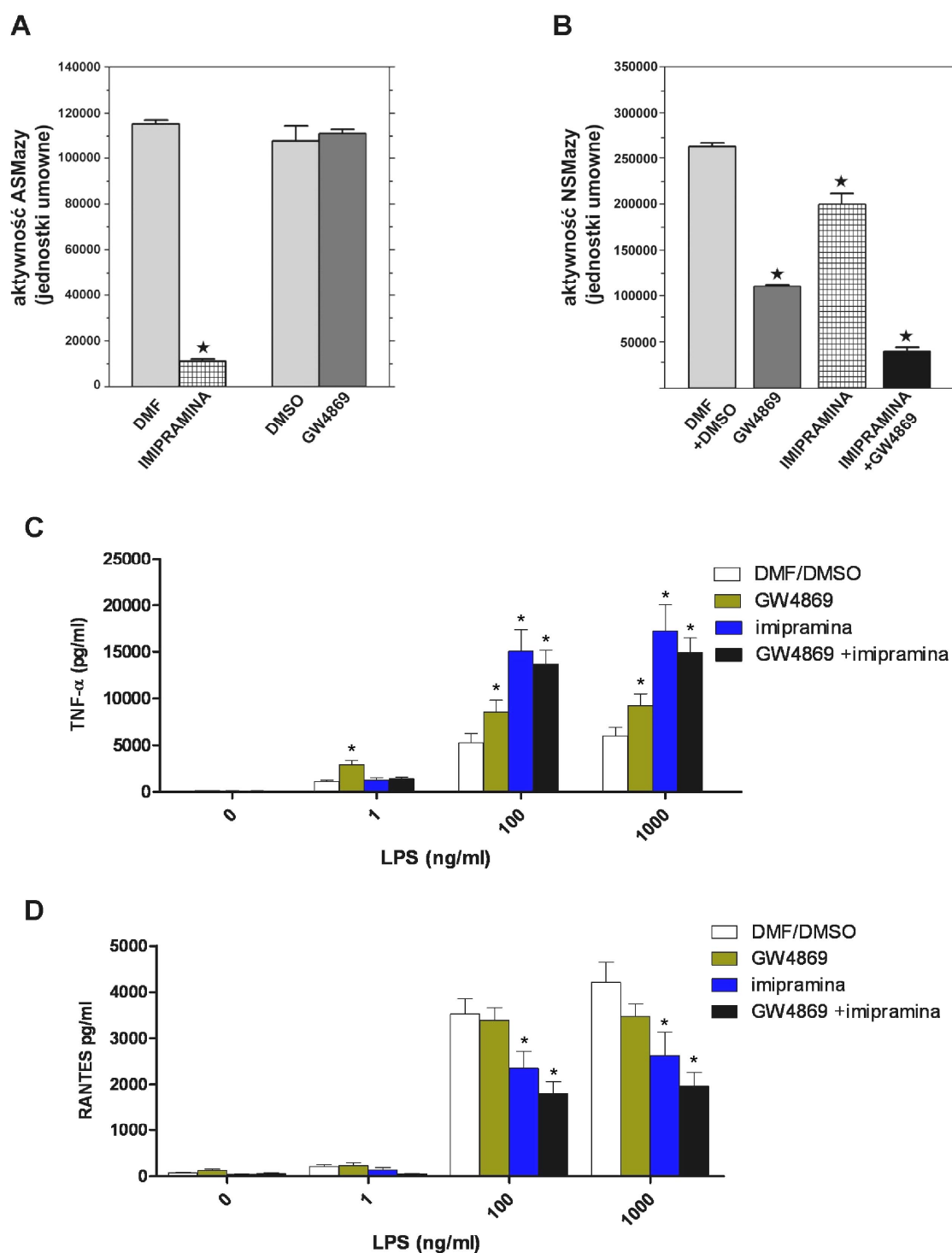
Wykryliśmy, że po wyciszeniu ekspresji genu ASMazy lub NSMazy produkcja TNF α uległa zwiększeniu o około 33% po stymulacji komórek przez 1 ng/ml LPS i o około 58% w komórkach poddanych działaniu 100 ng/ml LPS (**Ryc. 6.3 C**). Wyciszanie aktywności sfingomielinaz nie wpłynęło na produkcję RANTES stymulowaną przez 1 i 100 ng/ml LPS.

Należy zaznaczyć, że w tej serii doświadczeń produkcja TNF α stymulowana przez 1 ng/ml LPS była wysoka, kształtując się na poziomie osiąganym przy 100 ng/ml LPS. Może ona być skutkiem odmiennych warunków hodowania komórek (hodowlę prowadzono w zawiesinie), a także większej gęstości komórek podczas ich stymulacji lipopolisacharydem.

6.4. Hamowanie aktywności kwaśnej i neutralnej sfingomielinazy odmiennie reguluje aktywację komórek na ścieżce zależnej i niezależnej od MyD88 w odpowiedzi na LPS

W celu weryfikacji udziału obu sfingomielinaz w odpowiedzi komórek na stymulację przez LPS zastosowano farmakologiczne inhibitory tych enzymów. Imipramina jest czynnikiem lizosomotropowym, który dezintegruje lizosomy indukując proteolityczną degradację kwaśnej sfingomielinazy (będąc jednocześnie silnym lekiem antydepresyjnym z grupy dibenzazepin). GW4869 jest inhibitorem aktywności enzymatycznej neutralnej sfingomielinazy.

Działanie obu związków zostało zweryfikowane przez pomiary aktywności ASMazy i NSMazy w lizatach otrzymanych z komórek poddanych przyżyciowo działaniu tych inhibitorów. Inkubacja komórek w obecności 100 μ M imipraminy powodowała silny, sięgający 90% spadek aktywności ASMazy mierzony w lizatach komórkowych przy pH 5,0 - optymalnym dla aktywności tego enzymu (**Ryc. 6.4 A**). GW4869 używany w stężeniu 14 μ M hamował natomiast selektywnie NSMazę, obniżając jej aktywność mierzoną przy pH 7,4 o 60%, nie wywierając jednocześnie wpływu na aktywność ASMazy (**Ryc. 6.4 A, B**). Z drugiej strony, aktywność sfingomielinaz mierzona przy neutralnym pH była redukowana o 27% przez imipraminę, wskazując, że ASMaza może być aktywna także w środowisku o tym odczynie (**Ryc. 6.4 B**). Zgodnie z tym, użycie obu inhibitorów powodowało dalszy, sięgający 85%, spadek aktywności sfingomielinazy mierzonej przy neutralnym pH (**Ryc. 6.4 B**).



Ryc. 6.4. Wpływ hamowania aktywności kwaśnej i neutralnej sfingomielinazy na produkcję cytokin stymulowaną przez LPS.

A - Aktywność sfingomielinazy mierzona przy pH 5,0 w lizatach komórek J774 inkubowanych ze 100 μ M imipraminą lub 14 μ M GW4869 (80 min., 37°C)

B - Aktywność sfingomielinazy mierzona przy pH 7,4 w lizatach komórek J774 po inkubacji ze 100 μ M imipraminą, 14 μ M GW4869, lub mieszaniną inhibitorów (80 min., 37°C).

C i D - Produkcja TNF α (**C**) i RANTES (**D**) przez komórki J774 poddane wstępnie działaniu 70 μ M imipraminy i/lub 14 μ M GW4869 (80 min., 37°C), a następnie stymulowane przez 1-1000 ng/ml LPS w obecności inhibitorów (4 godz., 37°C). Wyniki zostały znormalizowane względem ilości komórek w poszczególnych wariantach. Przedstawiono uśrednione wyniki z 3 doświadczeń,

* - Różnica istotna statystycznie względem kontroli (komórki inkubowane z rozpuszczalnikami inhibitorów) przy $p < 0.05$

Obecność inhibitorów ASMazy i NSMazy miała istotny, pozytywny wpływ na produkcję TNF α przez komórki poddane działaniu 100-1000 ng/ml LPS (**Ryc. 6.4 C**). Pod wpływem imipraminy, produkcja TNF α w odpowiedzi na 100 ng/ml LPS uległa zwiększeniu o około 2,7 razy w stosunku do wartości kontrolnych. W obecności 1000 ng/ml LPS efekt ten był jeszcze bardziej wyraźny, a produkcja TNF α wzrastała trzykrotnie. Słabszy efekt obserwowano natomiast poddając komórki działaniu inhibitora NSMazy, GW 4869. W tym przypadku produkcja cytokiny wzrastała o około 60% przy 100 ng/ml LPS i o 35% przy 1000 ng/ml LPS. Użycie mieszaniny obu inhibitorów miało natomiast podobny skutek do działania samej imipraminy. Należy też zwrócić uwagę, że podczas aktywacji komórek niskim stężeniem LPS, 1 ng/ml, imipramina nie wpływała na produkcję TNF α , natomiast GW4869 powodował jej dwukrotny wzrost (**Ryc. 6.4 C**).

Hamowanie aktywności neutralnej sfingomielinazy przy użyciu inhibitora GW4869 nie wywierało wpływu na produkcję cytokiny RANTES (**Ryc. 6.4 D**), co korespondowało z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi po wyciszeniu ekspresji genu kodującego ten enzym (patrz **Ryc. 6.3 D**). Natomiast inkubacja komórek w obecności imipraminy powodowała spadek produkcji RANTES o 27-30% podczas stymulacji komórek przez 1-1000 ng/ml LPS, a użycie imipraminy w połączeniu z GW4869 pogłębiało ten hamujący efekt do około 50% (**Ryc. 6.4 D**).

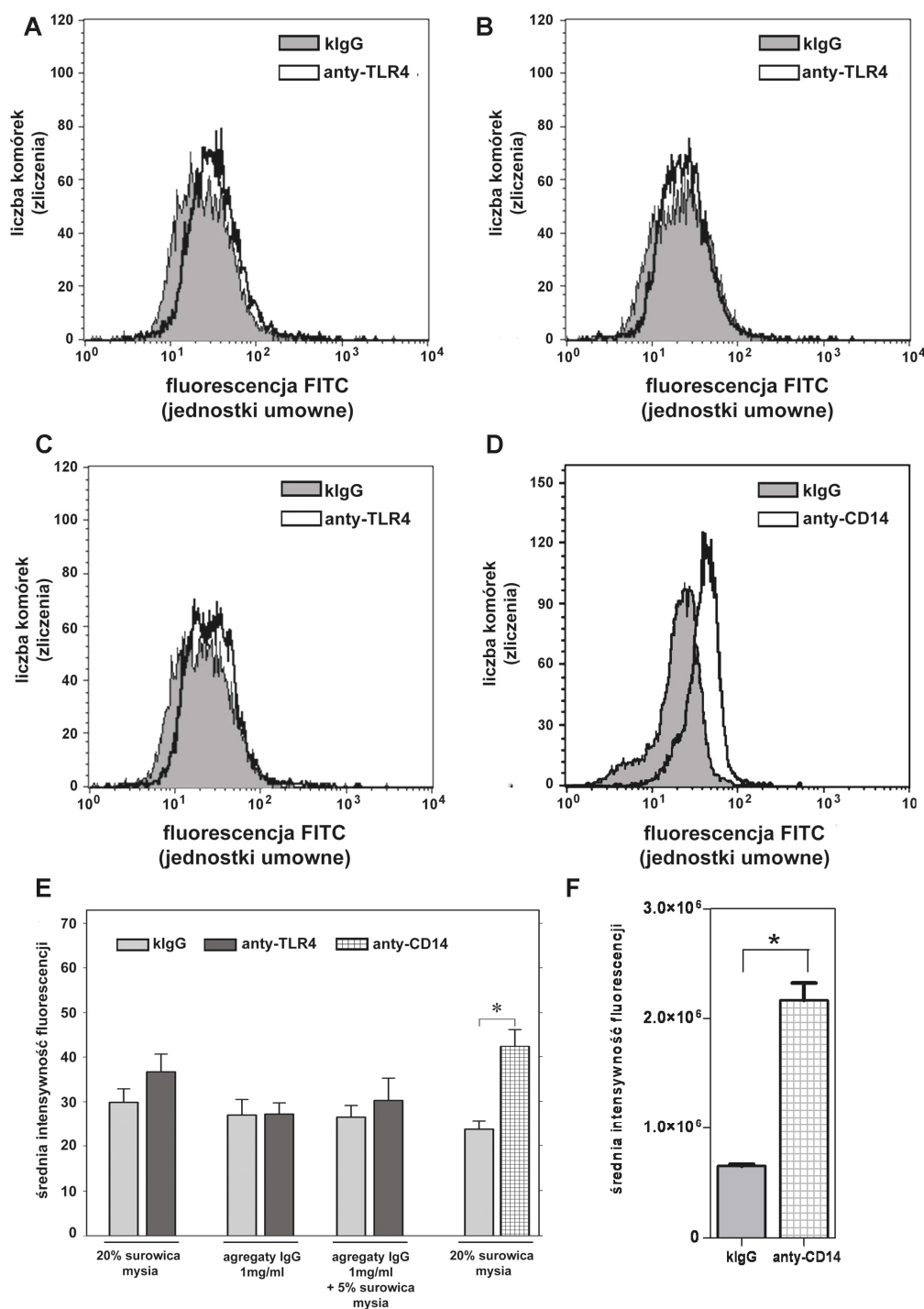
Wydaje się, że uwidoczniona w obecności imipraminy, ale nie swoistego siRNA, redukcja uwalniania chemokiny RANTES wynikała z dużo silniejszego hamującego wpływu imipraminy na aktywność ASMazy, niż wyciszenie ekspresji genu kodującego ten enzym (o odpowiednio 95% i 63%, porównaj **Ryc. 6.4 A** z **6.3 A**). To z kolei wiązało się zapewne z faktem, że transfekcji siRNA ulegała mniejsza pula komórek niż była podatna na działanie inhibitora. Niewykluczone jest też, że w komórkach poddanych wyciszeniu genu przez 48 godzin brak aktywności ASMazy kompensowany był przez aktywność innej sfingomielinazy.

Przedstawione dane sugerują, że produkcja ceramidu przez sfingomielinazy ma istotne znaczenie w regulacji odpowiedzi komórek na LPS. Zahamowanie aktywności ASMazy i NSMazy (zarówno przy użyciu siRNA jak i inhibitorów) powoduje wzrost produkcji TNF α . Efekt ten jest odmienny w odniesieniu do produkcji chemokiny RANTES, która wydaje się wymagać udziału ceramidu, generowanego przypuszczalnie przez kwaśną sfingomielinazę. Możliwe jest, że ceramid jest wymagany dla sprawnego przebiegu procesów warunkujących uruchomienie ścieżki sygnałowej zależnej od TRIF, takich jak internalizacja receptora TLR4 (problem ten omówiono w Dyskusji).

6.5. Ocena poziomu CD14 i TLR4 na powierzchni komórek przy użyciu cytometrii przepływowej i skaningowej

Internalizacja receptorów prowadzi do obniżenia ich poziomu na powierzchni komórek i jest jednym ze sposobów negatywnej regulacji sygnału, występującym w odpowiedzi na wiele agonistów [127, 250]. Nie jest obecnie pewne, czy zjawisko takie ma znaczenie dla regulacji sygnałów indukowanych przez LPS. W celu zbadania tego problemu oznaczono poziom powierzchniowej ekspresji dwóch głównych receptorów lipopolisacharydu, CD14 i TLR4, w czasie stymulacji komórek J774 przez różne stężenia LPS.

Powszechnie stosowaną metodą pomiarów poziomu białek na powierzchni komórek jest ich analiza w cytometrze przepływowym po uprzednim wyznakowaniu swoistymi przeciwciałami skoniugowanymi z fluoroforem. Nasze badania wykazały jednak, że technika ta nie pozwala na oznaczenie poziomu powierzchniowego TLR4 w komórkach J774. Różnica pomiędzy sygnałem uzyskiwanym z komórek inkubowanych z przeciwciałem swoistym wobec TLR4 i z komórek kontrolnych, inkubowanych z niespecyficznymi króliczymi IgG, była minimalna. Wyniki takie uzyskiwano pomimo blokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał przez wstępną inkubację komórek z 20% surowicą mysią lub agregatami mysich IgG (**Ryc. 6.5 A-C**). W próbach poddanych działaniu 20% surowicy mysiej różnica pomiędzy specyficznym i niespecyficznym znakowaniem TLR4 sięgała 20%, ale była nieistotna statystycznie (**Ryc. 6.5 E**). Agregaty IgG (a także roztwór monomerycznych IgG w innej serii doświadczeń) użyte były z uwagi na potencjalny udział receptorów Fc γ , zarówno o niskim, jak i o wysokim powinowactwie do fragmentów Fc immunoglobulin G, w niespecyficznym wiązaniu przeciwciał do powierzchni komórek. Obecność mysich IgG w mieszaninie blokującej, także w połączeniu z surowicą mysią, nie poprawiała jednak poziomu specyficznego znakowania receptora TLR4 (**Ryc. 6.5 B, C, E** oraz dane nie prezentowane). Jedną z przyczyn słabego swoistego znakowania receptora TLR4 może być stosunkowo niewielka ilość tego receptora na powierzchni komórek J774, która wymagała zastosowania bardziej czułych metod jego detekcji.



Ryc. 6.5. Pomiary poziomu receptorów TLR4 i CD14 na powierzchni komórek metodami cytometrycznymi. Komórki były inkubowane z przeciwciałami anti-TLR4 (A, B, C), anti-CD14 (D, F) lub kontrolnymi króliczymi IgG (kIgG), a następnie z przeciwciałami skierowanymi przeciw króliczym IgG skoniugowanymi z FITC. Przed reakcją z przeciwciałami komórki były inkubowane w mieszaninach blokujących zawierających 20% surowicy mysiej (A, D), 1 mg/ml agregatów mysich IgG (B) lub mieszaniny agregatów przeciwciał i mysiej surowicy (C). A-D – Reprezentatywne wyniki pomiarów poziomu TLR4 i CD14 na powierzchni komórek metodą cytometrii przepływowej. E – Analiza intensywności fluorescencji uzyskana w wyniku pomiarów metodą cytometrii przepływowej i odzwierciedlająca poziom TLR4, CD14 i znakowania prób kontrolnych; F – Wyniki znakowania receptora CD14 na powierzchni komórek uzyskane metodą laserowej cytometrii skaningowej, przy blokowaniu niespecyficznych oddziaływań przeciwciał z komórkami w pożywce DMEM z 10% FBS. Uśrednione wartości z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie względem kontroli przy $p < 0.05$.

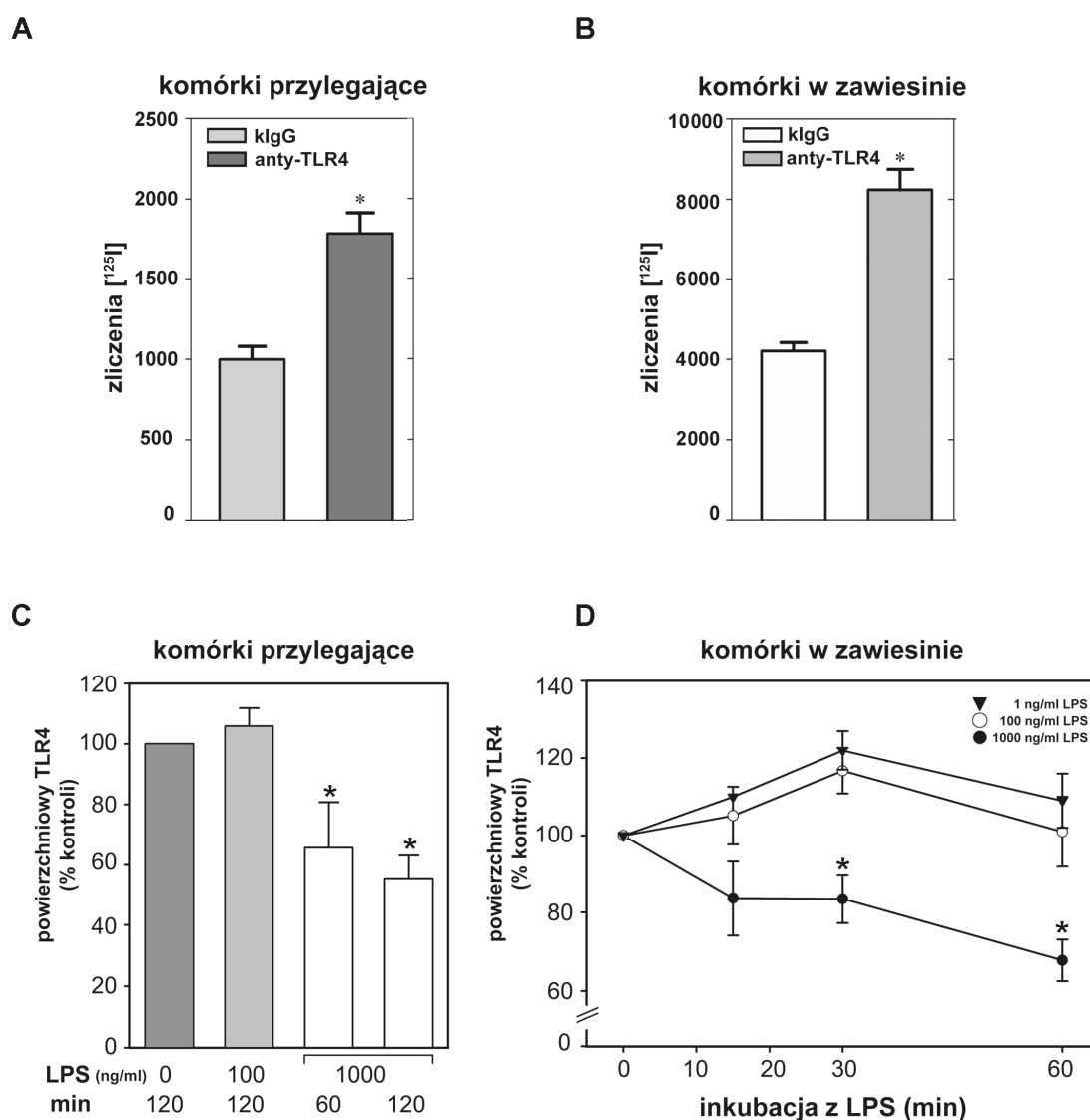
Cytometria przepływowa okazała się natomiast przydatną metodą pomiaru poziomu CD14, występującego w dużych ilościach na powierzchni komórek J774. Uzyskany sygnał swoisty dla CD14 przekraczał 1,86 razy sygnał wykrywany w próbkach kontrolnych (**Ryc. 6.5 D, E**).

Wyniki takie uzyskiwano stosując przeciwciała królicze anti-CD14 i drugorzędowe przeciwciała anti-królicze IgG-FITC, użyte wcześniej przy analizie poziomu TLR4. Podobne rezultaty dawało zastosowanie szczurzych przeciwciał swoistych wobec CD14 i odpowiednich przeciwciał drugorzędowych, a także użycie różnych mieszanin blokujących, w tym DMEM z 10% FBS (dane nie prezentowane).

Analiza fluorescencji komórek w cytometrze przepływowym wymagała przeniesienia komórek do zawiesiny. Stwierdziliśmy, że analiza fluorescencji komórek adherentnych, inkubowanych z przeciwciałami swoistymi wobec CD14 prowadzona techniką laserowej cytometrii skaningowej także pozwalała na swoistą detekcję tego receptora (**Ryc. 6.5 F**). Technika ta nie umożliwiała jednak pomiaru TLR4 na powierzchni komórek (dane nie prezentowane). Obie metody cytometryczne pomiaru ilości CD14 na powierzchni komórek adherentnych i suspendowanych były stosowane w dalszych doświadczeniach.

6.6. Poziom TLR4 na powierzchni komórek może zostać oznaczony techniką izotopową

Cytometria przepływowa i skaningowa nie przyniosła satysfakcjonujących wyników pomiaru poziomu receptora TLR4 na powierzchni komórek J774 (patrz **Ryc. 6.5 B-E**), dlatego też posłużono się w tym celu inną, bardziej czułą techniką izotopową. W tym celu komórki inkubowano przyżyciowo z króliczym przeciwciałem anti-TLR4, a następnie z radioaktywnym przeciwciałem wyznakowanym izotopem jodu ^{125}I , skierowanym przeciwko króliczym IgG. Po odpłukaniu nadmiaru przeciwciał mierzono radioaktywność w lizatach otrzymanywanych z wyznakowanych komórek. Używając tej metody udało się osiągnąć specyficzne znakowanie TLR4, z odczytami dla prób inkubowanych z przeciwciałami anti-TLR4 większymi około 1,8 razy od odczytów dla prób kontrolnych, inkubowanych w obecności niespecyficznych króliczych IgG (**Ryc. 6.6 A**).



Ryc. 6.6. Pomiary poziomu TLR4 na powierzchni komórek metodą izotopową.

A, B – Znakowanie komórek J774 przylegających do podłoża (**A**) i suspendowanych (**B**) inkubowanych z przeciwciałem anti-TLR4 i drugorzędowym przeciwciałem skierowanym przeciwko króliczym IgG skoniugowanym z ¹²⁵I. Wyniki podane w formie zliczeń CPM izotopu ¹²⁵I dla 1,5 x 10⁶ komórek; średnia z 3 lub 4 doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie względem komórek inkubowanych z niespecyficznymi króliczymi IgG (kIgG), p < 0.05.

C – Poziom powierzchniowego TLR4 w komórkach przylegających do podłoża, stymulowanych przez 100 i 1000 ng/ml LPS (60 lub 120 min., 37°C).

D – Poziom powierzchniowego TLR4 w komórkach suspendowanych, stymulowanych przez 1, 100 i 1000 ng/ml LPS (60 min., 37°C); wartości uśrednione z 3 doświadczeń. Wartości prezentowane w (**C**) i (**D**) przedstawiają dane otrzymane po odjęciu wartości sygnału wykrytego w próbach kontrolnych inkubowanych z nieswoistym króliczym IgG w miejsce przeciwciał anti-TLR4.

* - Różnica istotna statystycznie względem komórek niestymulowanych, p < 0.05.

Z uwagi na fakt, że część doświadczeń przeprowadzano na komórkach J774 przeniesionych w stan zawiesiny, zweryfikowano przydatność metody izotopowej do pomiaru poziomu powierzchniowego receptora TLR4 także w tych warunkach. Przy

znakowaniu komórek w zawiesinie stwierdzono ponownie, że sygnał swoisty dla TLR4 był 2 razy wyższy od sygnału próby kontrolnej (**Ryc. 6.6 B**). Należy zauważyć, że dla komórek w zawiesinie uzyskiwano kilkukrotnie (około 4 razy) wyższy poziom sygnałów, zarówno swoistego jak i kontrolnego, niż w przypadku komórek przylegających do podłoża (**Ryc. 6.6, porównaj A i B**).

Możliwą przyczyną tego zjawiska jest mniej efektywne odmywanie przeciwciał w zawiesinie komórek, ale także ekspozycja powierzchni brzusznej komórek po ich suspendowaniu, która staje się dostępna dla przeciwciał.

6.7. Poziom TLR4 na powierzchni komórek spada podczas stymulacji wysokim stężeniem LPS

Używając techniki izotopowej wykryliśmy, że inkubacja komórek przylegających do podłoża w obecności LPS w stężeniu 100 ng/ml czasie do 2 godzin nie powodowała spadku poziomu powierzchniowego TLR4 (**Ryc. 6.6 C**). Natomiast w przypadku inkubacji z 1000 ng/ml LPS obserwowany był znaczny, sięgający 35% spadek poziomu TLR4 na powierzchni komórek adherentnych już po 60 minutach (**Ryc. 6.6 C**). Przedłużenie inkubacji do 2 godzin powodowało dalszy ubytek poziomu powierzchniowego TLR4, sięgający 45% w stosunku do poziomu TLR4 w komórkach niestymulowanych LPS (**Ryc. 6.6 C**).

Podobnie do komórek przylegających do podłoża, stymulacja komórek suspendowanych przez 1000 ng/ml LPS prowadziła do stopniowego ubytku TLR4 z ich powierzchni, który wyniósł około 32% po 1 godzinie inkubacji (**Ryc. 6.6 D**). LPS w stężeniu 1-100 ng/ml także w tych warunkach nie indukował spadku poziomu TLR4, a nawet powodował jego przejściowy wzrost, sięgający 20% po 30 minutach działania. Po 1 godzinie stymulacji komórek przez 1 i 100 ng/ml LPS poziom TLR4 wracał do wartości wyjściowych (**Ryc. 6.6 D**).

Podsumowując, wyniki te wskazują, że stymulacja komórek przez wysokie stężenie LPS, 1000 ng/ml, prowadzi do stopniowego ubytku TLR4 z ich powierzchni.

Biorąc pod uwagę udział ceramidu w kontrolowaniu odpowiedzi komórek na stymulację przez LPS (patrz 6.2 -6.4) podjęto wstępne próby ustalenia, czy lipid ten może kontrolować poziom receptora TLR4 na powierzchni komórek. Stwierdzono, że zahamowanie produkcji ceramidu przez wyciszenie ASMazy nie wpływało na ilość receptora TLR4 wykrywanego na powierzchni komórek niestymulowanych (dane nie

prezentowane). Określenie udziału ceramidu w zmianach poziomu powierzchniowego TLR4 po stymulacji przez LPS wymaga dalszych badań.

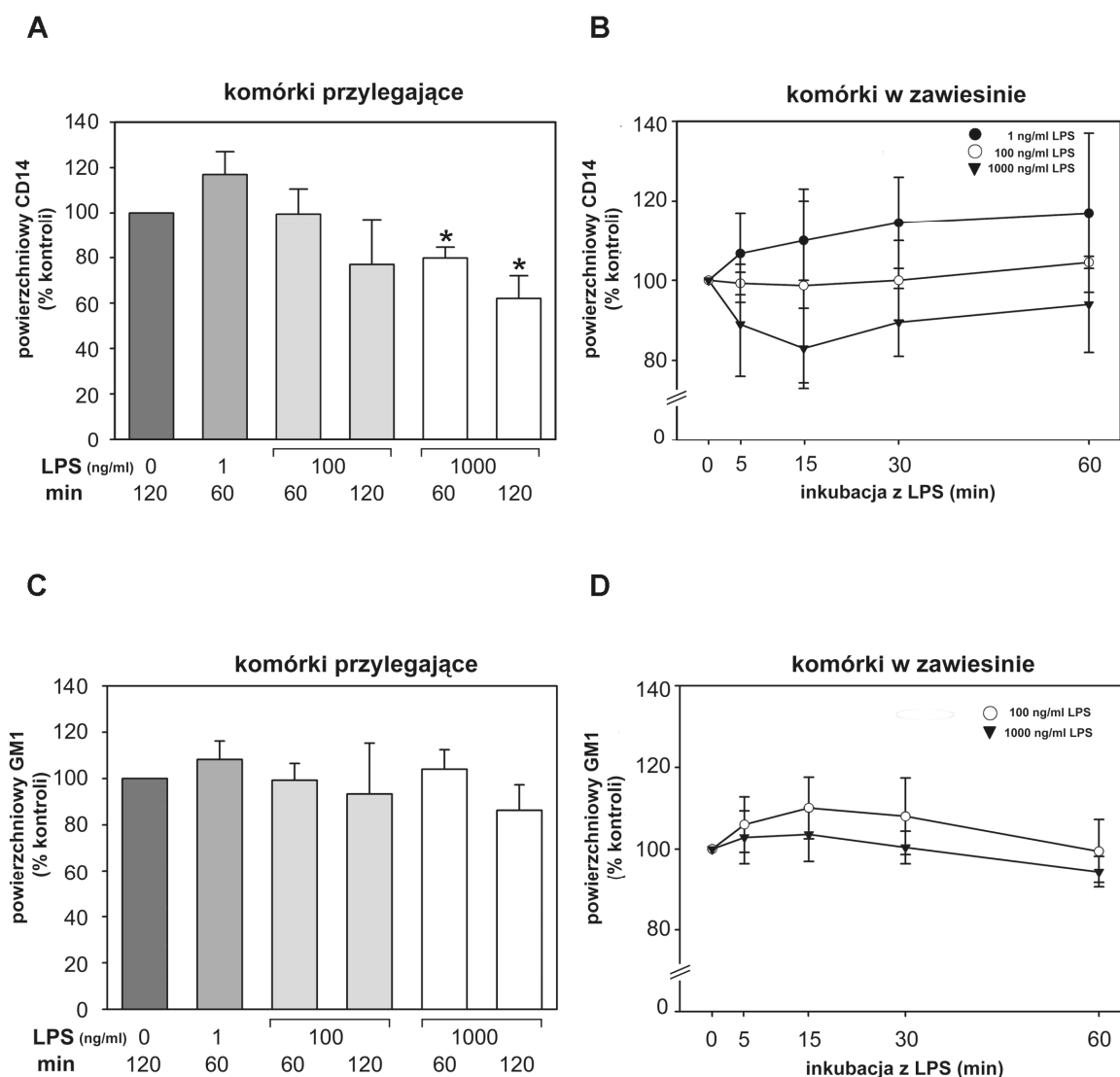
6.8. Poziom CD14 na powierzchni komórek przylegających do podłoża spada podczas stymulacji wysokim stężeniem LPS

Receptor CD14 odgrywa istotną rolę w rozpoznawaniu lipopolisacharydu przenosząc go na receptor TLR4. Może on także pełnić funkcje związane z negatywną regulacją odpowiedzi komórek na LPS poprzez jego internalizację i detoksykację (patrz 3.2.5-6.). Jako że znakowanie powierzchni komórek za pomocą przeciwciał swoistych wobec CD14 pozwoliło na specyficzną detekcję tego receptora za pomocą cytometrii przepływowej oraz laserowej cytometrii skaningowej (patrz 6.5), metody te zostały użyte do oceny zmian poziomu CD14 w błonie komórkowej w odpowiedzi na LPS.

Detekcja fluorescencji wyznakowanych komórek przylegających do podłoża pozwoliła zaobserwować, że godzinna stymulacja komórek przez 100 ng/ml LPS nie powodowała istotnych zmian poziomu CD14 na powierzchni komórek, jednak wydłużenie inkubacji do 2 godzin zaowocowało zmiennym, sięgającym średnio 23% spadkiem ilości CD14 (**Ryc. 6.7 A**). Istotne zmiany obserwowano natomiast w komórkach stymulowanych przez 1000 ng/ml LPS; wykrywano powtarzalny, około 20% spadek poziomu CD14 na powierzchni komórek po 1 godzinie inkubacji z tym stężeniem LPS, a po 2 godzinach - dalszy spadek poziomu powierzchniowego CD14 sięgający około 38% w stosunku do komórek kontrolnych. W odpowiedzi na stymulację przez 1 ng/ml LPS wykrywano nieznaczny wzrost ekspresji CD14 na powierzchni komórek (**Ryc. 6.7 A**).

W przypadku komórek stymulowanych przez LPS w zawiesinie stwierdzono duże oscylacje poziomu błonowego CD14. Niemniej jednak, uzyskane dane sugerują podobny sposób regulacji ekspresji powierzchniowego CD14 do obserwowanego w komórkach adherentnych, tj. niewielki wzrost poziomu powierzchniowego CD14 w odpowiedzi na 1 ng/ml LPS i spadek tego poziomu przy stymulacji komórek przez 1000 ng/ml LPS. Wobec dużych odchyłeń różnice te nie są jednak istotne statystycznie (**Ryc. 6.7 B**).

Receptor CD14 jest białkiem zakotwiczonym w błonie komórkowej poprzez łącznik GPI, który decyduje o jego akumulacji w obrębie mikrodomen błony zwanymi „tratwami lipidowymi” (patrz 3.2.3). Postuluje się udział tratw lipidowych w formowaniu kompleksu sygnałowego CD14/TLR4/MD-2 w odpowiedzi na LPS [251]. W celu stwierdzenia, czy stymulacja komórek przez LPS indukuje ogólne zmiany składu tratw lipidowych, oceniono



Ryc. 6.7. Pomiary poziomu CD14 i GM1 na powierzchni komórek metodami cytometrii skaningowej (A, C) i przepływowej (B, D).

A, B – Poziom powierzchniowego CD14 w komórkach przylegających (A) i oderwanych od podłoża (B), stymulowanych przez 1, 100 i 1000 ng/ml LPS (5-120 min., 37°C), a następnie inkubowanych z przeciwciałem anti-CD14 i drugorzędowym przeciwciałem skierowanym przeciwko króliczym IgG skoniugowanym z FITC.

C, D - Poziom powierzchniowego GM1 w komórkach przylegających (C) i oderwanych od podłoża (D) stymulowanych przez 1, 100 i 1000 ng/ml LPS (5-120 min., 37°C), a następnie inkubowanych z podjednostką B toksyny cholery skoniugowaną z FITC. Przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie względem komórek niestymulowanych, $p < 0.05$.

poziom powierzchniowego gangliozydu GM1 (monosialotetraheksozylogangliozyd) rozpoznawanego przez podjednostkę B toksyny cholery (CTX-FITC) [84].

Pomiary błonowego GM1 w komórkach przylegających do podłoża nie wykryły istotnych zmian w poziomie tego glikolipidu podczas inkubacji komórek z 1, 100 i 1000 ng/ml LPS (Ryc. 6.7 C). Różnice nie uwidaczniały się nawet w warunkach, które

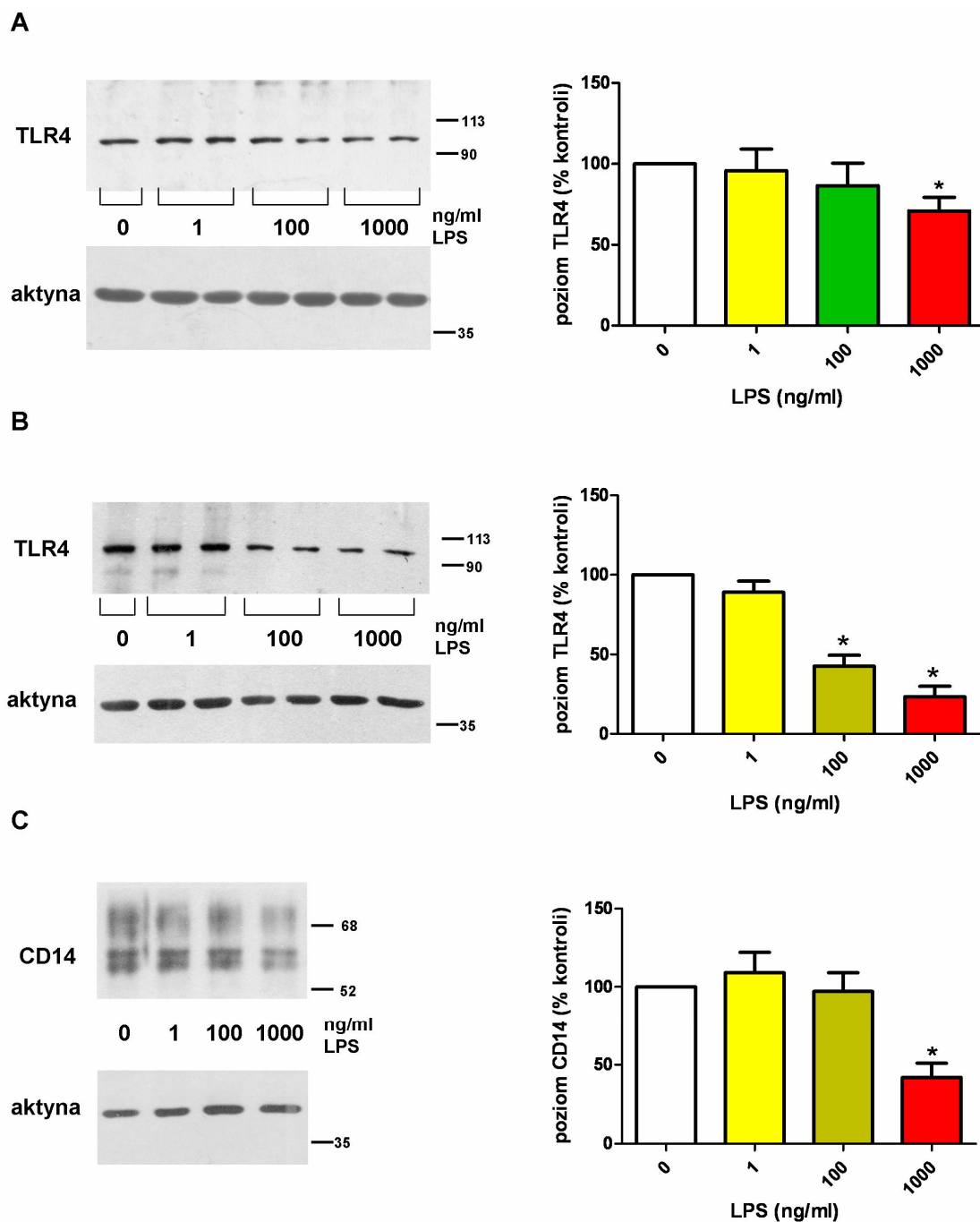
skutkowały istotnym obniżeniem poziomu powierzchniowego CD14, tj. po 2 godzinach inkubacji komórek z 1000 ng/ml LPS. Również w przypadku komórek stymulowanych w zawiesinie przez 100 i 1000 ng/ml LPS nie wykryto statystycznie istotnych różnic w poziomie GM1 (**Ryc. 6.7 D**).

Otrzymane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że stymulacja komórek przez 1000 ng/ml LPS powoduje powolne zanikanie białka CD14 na powierzchni komórek. Działanie dużego stężenia LPS - 1000 ng/ml – wpływa zatem na obniżenie powierzchniowego poziomu obu głównych receptorów tej endotoksyny. Zmiany te nie są skorelowane z ogólną zmianą kompozycji traw lipidowych na powierzchni błony komórkowej.

6.9. Całkowity poziom TLR4 i CD14 w komórkach spada dopiero podczas przedłużonej inkubacji z lipopolisacharydem

Obserwowany przez nas ubytek TLR4 i CD14 z powierzchni komórek podczas ich inkubacji z wysokim stężeniem LPS może być efektem wzmożonej internalizacji receptorów, prowadzącej potencjalnie do ich proteolitycznej degradacji. W celu zweryfikowania czy inkubacja komórek z lipopolisacharydem wpływa na całkowity poziom tych receptorów w komórce posłużono się techniką immunoblottingu. Lizaty komórek stymulowanych przez LPS rozdzielano w 10% żelu poliakryloamidowym, a następnie dokonano transferu białek na membranę nitrocelulozową. Za pomocą specyficznych przeciwciał oraz przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z peroksydazą chrzanową wykrywano białko o masie cząsteczkowej około 100 kDa, odpowiadający TLR4 (**Ryc. 6.8**). Membranę wyznakowano także za pomocą przeciwciał swoistych wobec aktyny, w celu weryfikacji ilości materiału w próbkach.

Doświadczenia prowadzone na komórkach inkubowanych z 1000 ng/ml LPS przez 2 godziny pozwoliły na zaobserwowanie istotnego statystycznie spadku ilości TLR4 w komórkach, który sięgał 30% w stosunku do komórek kontrolnych (**Ryc. 6.8 A**). W komórkach stymulowanych przez 1 i 100 ng/ml LPS nie stwierdzono znaczących różnic w poziomie TLR4. Wyraźny ubytek całkowitej ilości TLR4 wykryto w komórkach poddanych działaniu LPS przez około 18 godzin (**Ryc. 6.8 B**). W tych warunkach spadek całkowitej ilości TLR4 sięgał 50% i 70% w obecności, odpowiednio, 100 i 1000 ng/ml LPS, w stosunku do ilości TLR4 w komórkach niestymulowanych kontrolnych (**Ryc. 6.8 B**). Użycie 1 ng/ml LPS nie powodowało istotnych statystycznie efektów.



Ryc. 6.8. Poziom receptorów TLR4 (**A, B**) i CD14 (**C**) w komórkach spada podczas ich długotrwałej stymulacji przez LPS. Komórki inkubowano ze wskazanymi stężeniami LPS przez 2 godziny (**A**) lub 18 godzin (**B, C**) w temp. 37°C, poddawano lizie, a białka lizatów rozdzielano elektroforetycznie i analizowano techniką immunoblottingu pod względem zawartości TLR4 (**A, B**) i CD14 (**C**). Dolne panele przedstawiają ilość aktyny w analizowanych próbkach w celu weryfikacji równomiernej zawartości białka. Po prawej stronie przedstawiono pozycję standardów białkowych w kDa. Wykresy przedstawiają wyniki pomiarów densytometrycznych poziomu TLR4 (**A, B**) i CD14 (**C**) znormalizowanych wobec poziomu aktyny. * - Różnica istotna statystycznie względem komórek niestymulowanych przy $p < 0.05$.

W przypadku białka CD14 wpływ długotrwałej inkubacji na obniżenie ilości białka był wyraźny jedynie w przypadku użycia wysokiego stężenia LPS; 18 godzin stymulacji komórek przez 1000 ng/ml LPS powodowało spadek poziomu komórkowego CD14 o około 60% (**Ryc. 6.8 C**). W przeciwieństwie do TLR4 nie zauważono jednak spadku ilości receptora przy użyciu niższych stężeń LPS. Nie obserwowano również obniżenia poziomu CD14 w komórkach stymulowanych przez 2-4 godziny, nawet przy użyciu 1000 ng/ml LPS (dane nie prezentowane).

Podsumowując, inkubacja komórek z wysokim stężeniem lipopolisacharydu, 1000 ng/ml, powoduje znaczny spadek poziomu powierzchniowego TLR4 i nieco mniejszy ubytek CD14 z powierzchni komórek, zauważalny już po 1-2 godzinach stymulacji (**Ryc. 6.6 i 6.7**). Efekt ten jest skorelowany w pewnym stopniu z ubytkiem całkowitej ilości TLR4 (**Ryc. 6.8**). Dopiero jednak wielogodzinna aktywacja komórek przez LPS prowadzi do wyraźnej redukcji ilości TLR4 i CD14. Efekt ten uwidaczniał się głównie w przypadku stymulacji komórek przez wysokie stężenie LPS.

6.10. Przejściowe współwystępowanie TLR4 i CD14 w komórkach stymulowanych lipopolisacharydem

Stymulacja komórek przez LPS wpływała na ilość TLR4 i CD14 na powierzchni komórek. W celu dalszej analizy rozmieszczenia obu receptorów na powierzchni komórek w trakcie odpowiedzi na LPS posłużyliśmy się techniką mikroskopii fluorescencyjnej. Receptory zostały uwidocznione w komórkach za pomocą specyficznych przeciwciał oraz drugorzędowych przeciwciał koniugowanych z barwnikami FITC (TLR4) i Texas Red (CD14).

Niestymulowane komórki J774 były zaokrąglone, a receptory TLR4 i CD14 były widoczne na ich całej powierzchni (**Ryc. 6.9 a-a**). Aktualnie nie możemy stwierdzić, czy obserwowana mikroagregacja obu białek odzwierciedla ich rozmieszczenie w błonie czy też jest wywołana/spotęgowana samą procedurą immunolokalizacji tych receptorów, której szczegóły opisano w Metodach (patrz 4.8).

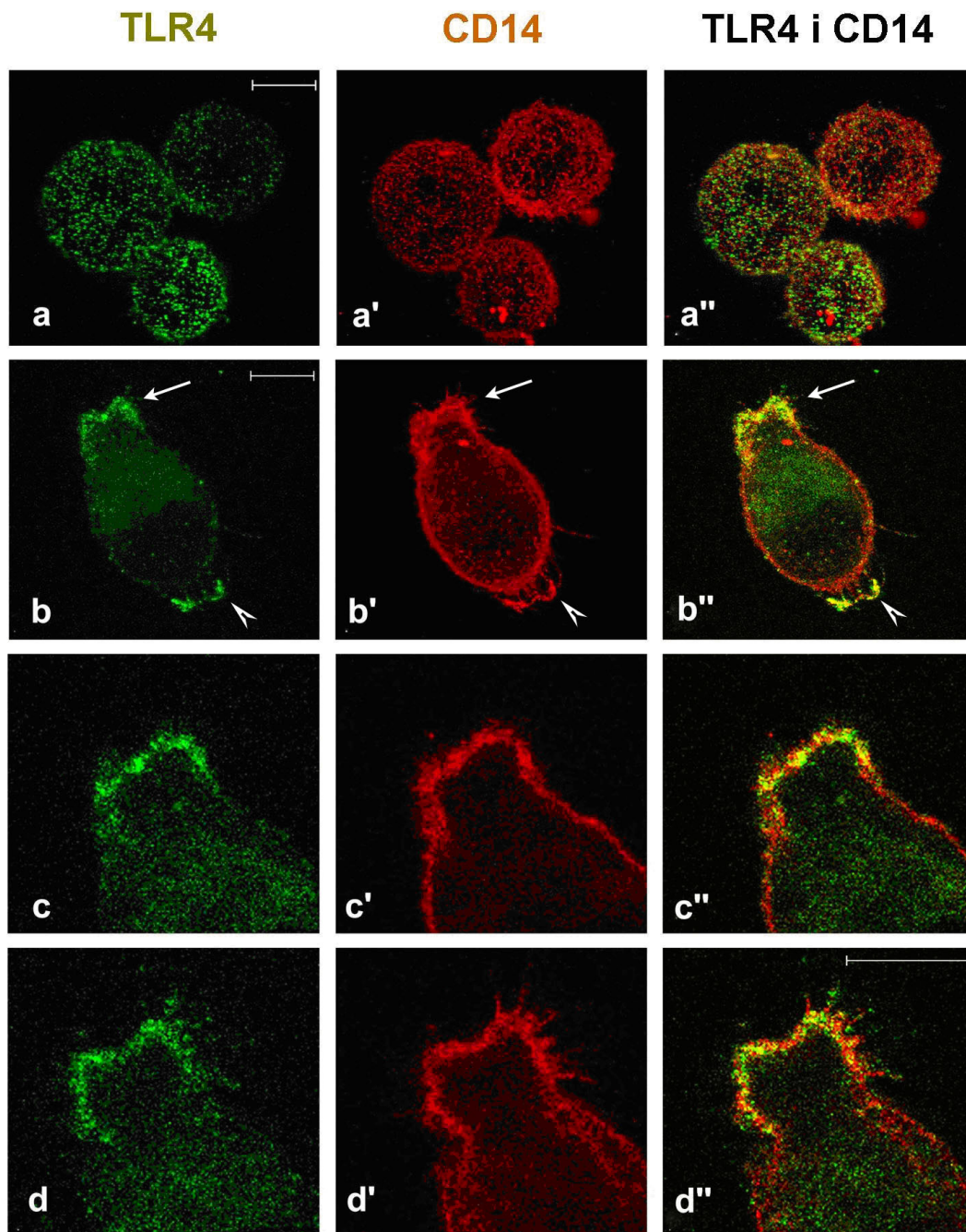
Pod wpływem stymulacji przez 100-1000 ng/ml LPS w czasie 20-30 minut komórki wydłużały się i polaryzowały, wykształcając wyraźną lamellę wiodącą (**Ryc. 6.9 b-d**). Jednocześnie receptory TLR4 i CD14 przemieszczały się w płaszczyźnie błony komórkowej i zbierały się w czole spolaryzowanych komórek. Taką akumulację TLR4 w obszarze lamelli wiodącej stwierdzono w 42,0%, a CD14 w 34,8% komórek

stymulowanych w czasie 30 minut przez 100 ng/ml LPS. Obecność obu receptorów, TLR4 i CD14, w rejonie lamelli wykrywano w 26,1% komórek (**Tabela 1**). Stymulacja komórek przez wyższe stężenie LPS, 1000 ng/ml, także prowadziła do redystrybucji TLR4 i CD14 w błonie komórkowej, chociaż zagęszczenie CD14 w obszarze lamelli wiodącej wykrywano w nieco mniejszej liczbie komórek (24,4%) niż przy stymulacji przez 100 ng/ml LPS (**Tabela 6.1**).

Zbieranie się receptorów TLR4 i CD14 w czole spolaryzowanych komórek w czasie stymulacji lipopolisacharydem skorelowane było z lokalną polimeryzacją aktyny (**Ryc. 6.10**). Przejawiało się to znacznym nagromadzeniem mikrofilamentów w lamelli wiodącej komórek znakowanych falloidyną skoniugowaną z barwnikami TRITC lub Alexa Fluor 350 (**Ryc. 6.10 B, F**). Obserwacje te zgodne są z doniesieniami, że aktywacja receptora TLR4 przez LPS indukuje ruch komórek zależny od aktywnej roli cytoszkieletu aktynowego [252].

W komórkach stymulowanych przez 100 ng/ml LPS (30 minut) przeprowadzono analizę ilościową lokalizacji TLR4 i CD14 w swoim bezpośrednim sąsiedztwie (współwystępowanie). Miarą współwystępowania badanych białek jest współczynnik korelacji Pearsona oraz współczynnik nakładania obrazów. Współczynnik korelacji Pearsona informuje o podobieństwie kształtów dwu obrazów, w tym przypadku rozkładu sygnałów fluorescencji obrazujących CD14 i TLR4, bez względu na intensywność sygnałów; maksymalnie osiąga on wartość 1 [243]. W badanych próbkach współczynnik ten wynosił $0,48 \pm 0,02$ dla TLR4 i CD14 w obszarze lamelli, wskazując na istotny stopień współwystępowania tych receptorów. Dla porównania, współczynnik Pearsona obliczony dla TLR4 i CD14 na całej powierzchni komórki był niższy i wynosił $0,39 \pm 0,01$, co było wartością bliską do tej oszacowanej w komórkach przed stymulacją ($0,32 \pm 0,04$). Drugi z analizowanych parametrów, współczynnik nakładania obrazów, osiągnął wartość $0,57 \pm 0,02$ dla TLR4 i CD14 w błonie lamelli w porównaniu z $0,47 \pm 0,01$ w błonie całej komórki (maksymalna wartość tego współczynnika równa się 1). Podsumowując, analizowane parametry wskazują, że gromadzenie się TLR4 i CD14 w czole spolaryzowanych komórek wiąże się ze zwiększonym współwystępowaniem tych białek, odzwierciedlając prawdopodobnie interakcję TLR4 i CD14 indukowaną przez LPS.

Przedłużenie inkubacji komórek w obecności 100 ng/ml LPS do 1 godziny nie wpływało znacząco na obecność TLR4 w przedniej części komórki (stwierdzona w 43,6% populacji komórek względem 42,0% po 30 minutach). W tym czasie obserwowano jednak



Ryc. 6.9. Współwystępowanie TLR4 i CD14 na powierzchni lamelli wiodącej komórek stymulowanych przez LPS. TLR4 został uwidoczniiony przez zieloną fluorescencję swoistych przeciwciał (pierwsza kolumna), CD14 przez fluorescencję czerwoną (druga kolumna). Trzecia kolumna przedstawia nałożenie obrazów, na których kolor żółty wskazuje na miejsca współwystępowania TLR4 i CD14.

a – Komórki niestymulowane.

b-d – Komórki stymulowane przez 100 ng/ml LPS, 20 min., 37°C.

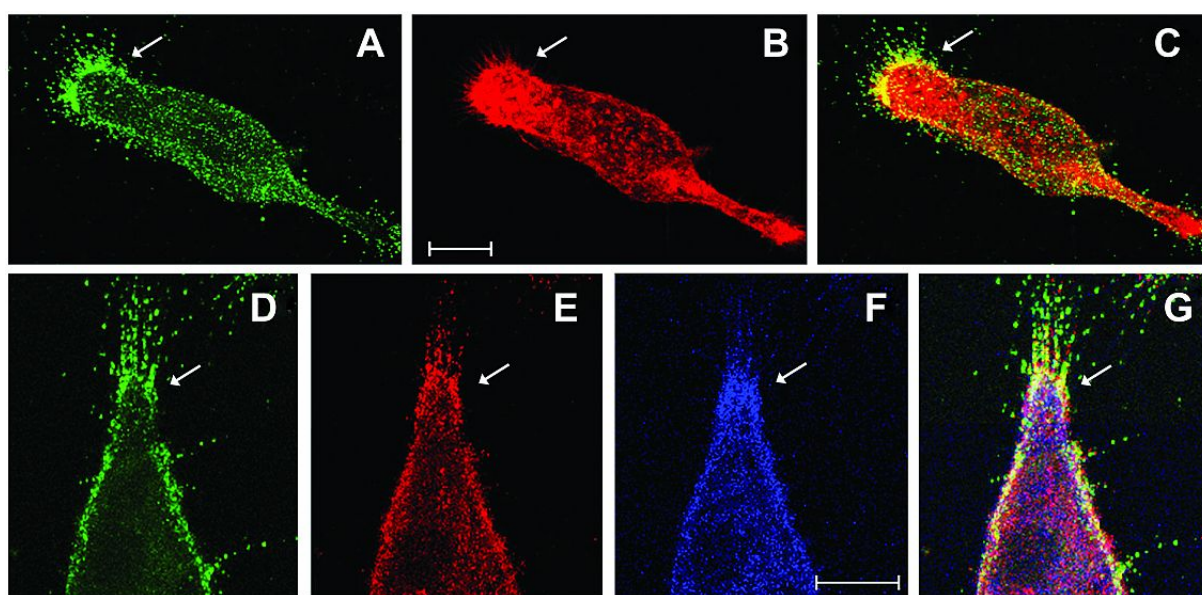
c i d – Powiększone obrazy lamelli wiodącej komórki uwidaczniające pojedyncze przekroje optyczne przez jej część środkową (**c**) i brzusznią (**d**).

Skala - 10 μm . Strzałki wskazują lamellę wiodącą, groty strzałek tylną część komórki.

receptor stymulacja	TLR4	CD14	TLR4 i CD14
100 ng/ml LPS 30 min	42,0 ± 3,1	34,8 ± 0,9	26,1 ± 0,6
100 ng/ml LPS 60 min	43,6 ± 4,0	19,8 ± 1,1	12,9 ± 0,9
1000 ng/ml LPS 30 min	43,0 ± 2,9	24,4 ± 2,6	20,9 ± 1,1
1000 ng/ml LPS 60 min	22,5 ± 3,8*	15,5 ± 2,0	7,0 ± 0,05

Tabela 6.1. Procentowy udział w populacji komórek wykazujących nagromadzenie receptorów TLR4 i CD14 w lamelli wiodącej podczas stymulacji komórek przez wskazane stężenia LPS.

* - Obniżone znakowanie TLR4 na powierzchni komórek w wyniku długotrwałej stymulacji przez LPS.



Ryc. 6.10. Nagromadzenie filamentów aktynowych w lamelli wiodącej komórek stymulowanych przez 100 ng/ml LPS (20 min., 37°C). Receptor TLR4 na powierzchni komórek uwidoczniony został przez zieloną fluorescencję swoistych przeciwciał (A i D), a białko CD14 przez fluorescencję czerwoną (E). Po permeabilizacji komórek, filamety aktynowe lokalizowano za pomocą falooidyny skoniugowanej z TRITC (B) lub z Alexa Fluor 350 (F). (C) i (G) ukazują nałożenie odpowiednio 2 lub 3 obrazów, wskazując na współwystępowanie TLR4 i CD14 oraz akumulację filamentów aktynowych w lamelli wiodącej komórek (strzałki). Skala - 10 μm.

niemal dwukrotny spadek akumulacji CD14 w tym rejonie komórki (widoczna w 19,8% komórek). Może to sugerować, że CD14 jest wycofywany z obszaru lamelli wiodącej wraz z upływem czasu stymulacji komórek przez LPS. Godzinna stymulacja komórek przez wysokie stężenie LPS, 1000 ng/ml, obok zubożenia CD14 w obszarze lamelli prowadziła też do ogólnego obniżenia znakowania TLR4 na powierzchni komórek. W konsekwencji, nagromadzenie TLR4 na froncie komórki obserwowano zaledwie w 22,5% komórek, a łączną obecność obu receptorów w lamelli wykryto tylko w 7% komórek (**Tabela 6.1**).

Z danych tych wynika, że w toku odpowiedzi na lipopolisacharyd receptory TLR4 i CD14 zbierają się w rejonie krawędzi wiodącej komórek, gdzie współwystępują. Współwystępowanie to jest jednak przejściowe, wskazując na dużą dynamikę interakcji obu receptorów indukowaną przez LPS. Obserwacje mikroskopowe zgadzają się też z opisanymi wcześniej wynikami badań nad poziomem receptora TLR4 i CD14 na powierzchni komórek. Łącznie dane te wskazują, że zmniejszenie poziomu TLR4 i CD14 na powierzchni komórek stymulowanych przez duże stężenia LPS może być jednym z mechanizmów wyciszających odpowiedź prozapalną makrofagów.

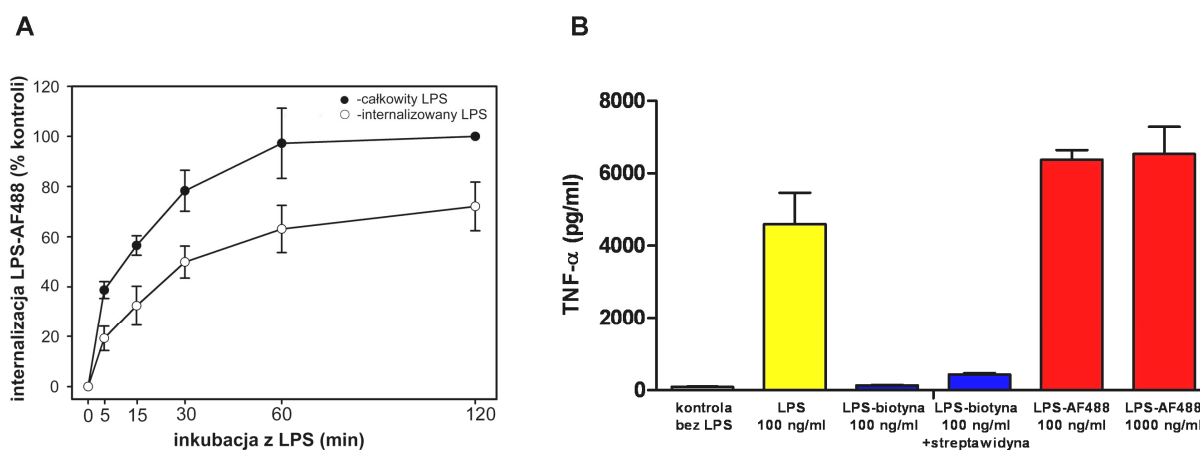
6.11. Internalizacja lipopolisacharydu przez komórki J774

Obniżanie poziomu receptorów TLR4 i CD14 na powierzchni komórek poddanych działaniu wyższego stężenia LPS (1000 ng/ml) może wynikać z udziału tych receptorów w internalizacji lipopolisacharydu prowadzącej do jego usuwania i detoksykacji. W celu zbadania tego zagadnienia określono najpierw dynamikę pobierania dużego stężenia LPS przez komórki linii J774. Komórki inkubowano z 1000 ng/ml lipopolisacharydu skoniugowanego z barwnikiem Alexa Fluor 488, a następnie poddano analizie za pomocą cytometru przepływowego (**Ryc. 6.11 A**).

Używając tej techniki byliśmy w stanie stwierdzić, że komórki J774 wiążą i akumulują duże ilości LPS. Tempo tego procesu rosło szybko w ciągu pierwszych 30 minut inkubacji z LPS i stabilizowało się po około 1 godzinie (**Ryc. 6.12 A**, czarne symbole). Jako że cytometr przepływowy jest w stanie wykryć świecenie LPS zarówno związanego na powierzchni komórek jak i pobranego do ich wnętrza, komórki inkubowano ze 100 ng/ml błękitu trypanu w celu wygaszenia powierzchniowej fluorescencji i detekcji sygnału internalizowanego LPS-AF488 [253]. Ustalono, że po 5 minutach około 50% LPS-AF488 było związane z powierzchnią komórek, a 50% było zinternalizowane. Ilość pobranego

LPS-AF488 wzrastała do 64% po 30-60 minutach i do 72% po 2 godzinach inkubacji (Ryc. 6.12 A, białe symbole).

Ustaliliśmy, że LPS-AF488 używany w doświadczeniach zachowywał wysoką aktywność biologiczną mierzoną zdolnością do stymulacji produkcji $\text{TNF}\alpha$, która nawet nieznacznie przekraczała wartości otrzymane przy użyciu standardowo używanego nieznakowanego LPS (Ryc. 6.11 B). Dla porównania, niektóre inne testowane koniugaty LPS, np. LPS biotynylowany, nie były w stanie aktywować komórek (Ryc. 6.11 B).



Ryc. 6.11. LPS-AF488 ulega internalizacji i jest aktywny biologicznie.

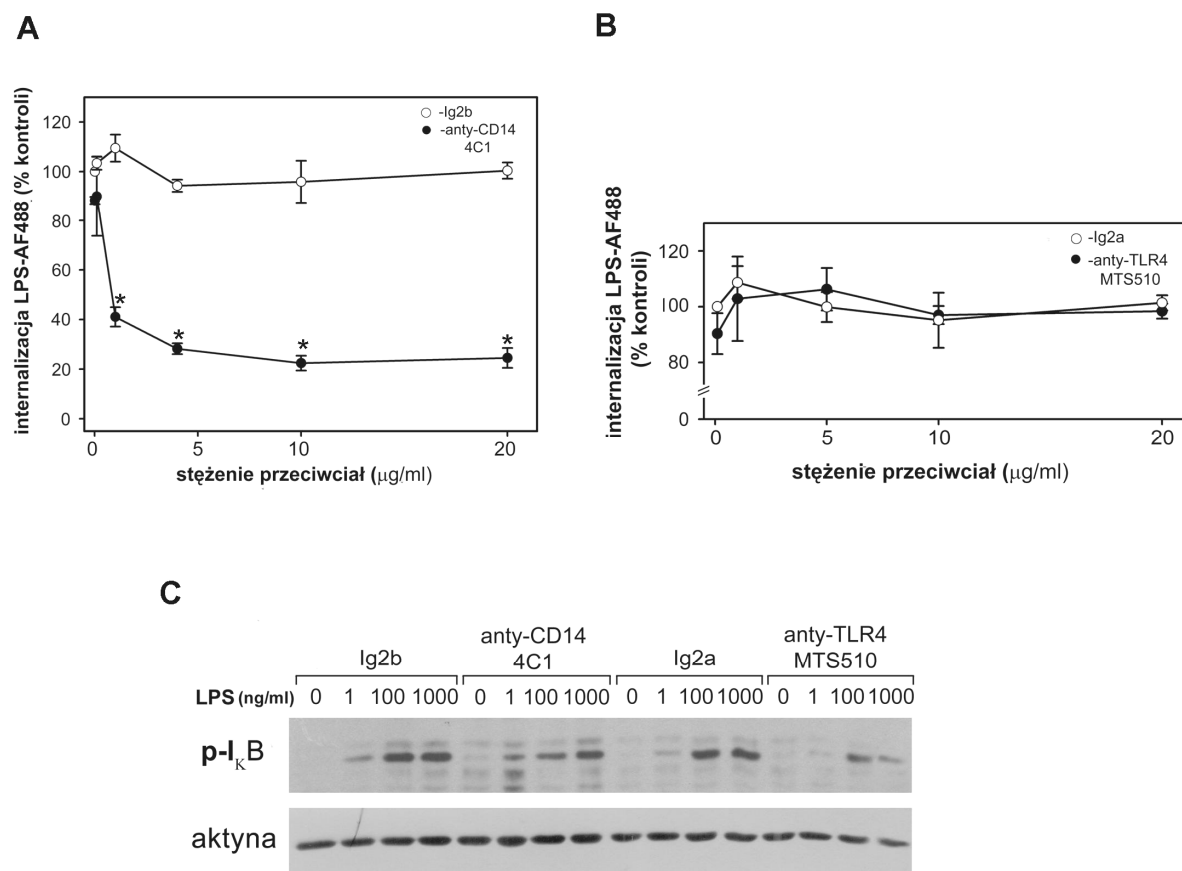
A - Internalizacja lipopolisacharydu przez komórki J774. Komórki były inkubowane przez wskazany czas z 1000 ng/ml LPS-AF488, utrwalane i analizowane w cytometrze przepływowym. W celu rozróżnienia LPS internalizowanego (białe kółka) od całkowitego LPS, tj. związanego do powierzchni i internalizowanego przez komórki (czarne kółka) komórki przed pomiarem inkubowano z błękitem trypanu w celu wygaszenia fluorescencji na powierzchni komórek. Wykres przedstawia uśrednione wyniki z trzech doświadczeń. 100% - całkowita ilość LPS związanego i internalizowanego przez komórki po 120 minutach inkubacji.

B - Produkcja $\text{TNF}\alpha$ po 4 godzinach inkubacji komórek w 37°C z: LPS bez znacznika (używanym rutynowo w doświadczeniach), LPS skoniugowanym z biotyną, z LPS-biotyną, a następnie ze streptawidyną, oraz z ml LPS-AF488. Wyniki zostały znormalizowane względem liczby komórek w poszczególnych wariantach.

6.12. Internalizacja dużych stężeń lipopolisacharydu wymaga udziału CD14, ale nie TLR4

W celu zbadania zaangażowania receptorów TLR4 i CD14 w internalizację dużych stężeń lipopolisacharydu przez komórki makrofagopodobne J774 posłużyliśmy się opisaną powyżej metodą z użyciem LPS-AF488 oraz cytometrii przepływowej. W tej serii doświadczeń blokowaliśmy wiązanie LPS do tych receptorów inkubując komórki z monoklonalnymi szczurzymi przeciwciałami anti-CD14, klon 4C1 lub anti-TLR4, klon MTS510. Ustalono wcześniej, że te klony przeciwciał reagują swoiście z mysimi

receptorami CD14 lub TLR4, wiążąc się do wybranych epitopów w receptorach w sposób uniemożliwiający ich interakcję z LPS [254, 255].



Ryc. 6.12. Wpływ blokowania aktywności receptorów TLR4 i CD14 na internalizację lipopolisacharydu. **A, B** – Wpływ przeciwciał blokujących wiązanie LPS do receptora CD14, klon 4C1 (ciemne kółka) (**A**) i do receptora TLR4, klon MTS510 (**B**), lub kontrolnych przeciwciał o odpowiednich izotypach (białe kółka). Komórki preinkubowano 30 min. ze wskazanymi stężeniami przeciwciał, a następnie inkubowano przed 60 min. z 1000 ng/ml LPS-AF488 w obecności przeciwciał. Kontrolę (100%) stanowił poziom LPS-AF488 internalizowanego przez komórki po 60 min. inkubacji bez przeciwciał.

C – Wpływ przeciwciał blokujących na aktywację komórek przez LPS mierzona fosforylacją białka I_κB. Komórki preinkubowano 30 min. z 10 μg/ml przeciwciała anty-CD14 (4C1), 20 μg/ml anty-TLR4 (MTS510) lub z równą ilością przeciwciał kontrolnych, a następnie przez 30 min. z podanymi stężeniami LPS w obecności przeciwciał. Komórki poddawano lizie, a białka lizatów rozdzielano elektroforetycznie i analizowano techniką immunoblottingu pod względem zawartości ufosforylowanej formy I_κB. Dolny panel przedstawia ilość aktyny w analizowanych próbkach w celu weryfikacji równomiernej ilości białka.

* - Różnica istotna statystycznie przy $p < 0,05$.

Komórki poddano 30-minutowej preinkubacji z przeciwciałami blokującymi bądź z izotypowymi przeciwciałami kontrolnymi, a następnie 60-minutowej inkubacji z 1000 ng/ml LPS-AF488, również w obecności przeciwciał. Po utrwaleniu i barwieniu błękitem

trypanu komórki były analizowane w cytometrze przepływowym w celu określenia ilości pobranego LPS-AF488.

Blokowanie receptora CD14 przy użyciu przeciwciał 4C1 wywierało silny, hamujący efekt na internalizację LPS (**Ryc. 6.12 A**). Przy stężeniu 0,1 $\mu\text{g/ml}$ przeciwciała internalizacja 1000 ng/ml LPS-AF488 hamowana była o 20%; przeciwciała użyte w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ redukowało pobieranie LPS-AF488 o 60%, a przy stężeniu 4 $\mu\text{g/ml}$ – o około 76%. Podniesienie stężenia przeciwciała 4C1 do 10 $\mu\text{g/ml}$ nie miało już dalszego hamującego wpływu na internalizację LPS. Kontrolne przeciwciała, szczurze Ig2b, nie wpływało istotnie na pobieranie LPS przez komórki (**Ryc. 6.12 A**).

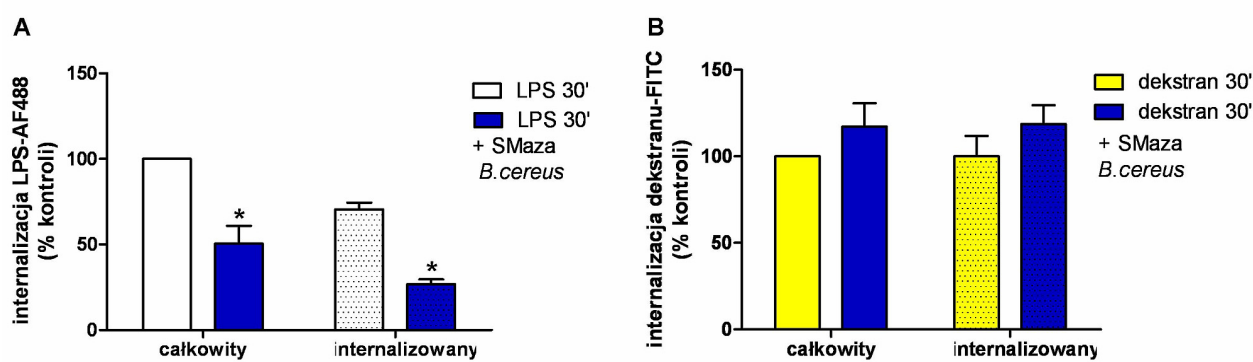
W odróżnieniu od blokowania CD14, blokowanie wiązania LPS do receptora TLR4 przy użyciu przeciwciał MTS510 nie miało wpływu na internalizację 1000 ng/ml LPS. Przeciwciała te, niezależnie od stosowanego stężenia w granicach 1-20 $\mu\text{g/ml}$, nie wywarło wpływu na internalizację LPS-AF488, podobnie jak kontrola izotypowa (**Ryc. 6.12 B**).

Sprawdziliśmy, czy oba przeciwciała wiązały się do receptorów wpływając na proces przekazywania sygnału prozapalnego indukowanego przez LPS. Za pomocą techniki immunoblottingu sprawdzano fosforylację białka I κ B w lizatach z komórek poddanych 30-minutowej preinkubacji z 10 $\mu\text{g/ml}$ anty-CD14 4C1, 20 $\mu\text{g/ml}$ anty-TLR4 MTS510 lub z równą ilością przeciwciał kontrolnych, a następnie stymulowanych 30 minut z różnymi stężeniami LPS w zakresie od 1-1000 ng/ml (**Ryc. 6.12 C**). W próbkach kontrolnych obserwowano zauważalną fosforylację I κ B przy 1 ng/ml LPS i bardzo silną przy 100 i 1000 ng/ml LPS. W próbkach preinkubowanych z anty-CD14 4C1 fosforylacja I κ B ulegała osłabieniu, co było szczególnie dobrze widoczne przy 1-100 ng/ml LPS. Preinkubacja z anty-TLR4 MTS510 również prowadziła do częściowego zniesienia fosforylacji tego białka (**Ryc. 6.12 C**).

Opierając się na tych danych można stwierdzić, że zarówno CD14 jak i TLR4 są zaangażowane w aktywację sygnałów prozapalnych w komórkach przez LPS, jednak tylko białko CD14 pełni istotną rolę w internalizacji dużych stężeń LPS. Zanikanie TLR4 z powierzchni komórek poddanych działaniu 1000 ng/ml LPS może towarzyszyć internalizacji LPS, ale nie jest wymagane aby ten proces zaszedł.

W celu wstępnej charakterystyki procesu internalizacji dużych stężeń LPS zbadano udział cytoszkieletu aktynowego i sfingomieliny w tym procesie. Stwierdziliśmy, że internalizacja 1000 ng/ml LPS-AF488 prowadzona w obecności 3 μM cytochalazyny D była hamowana o 57,2% po 5 minutach, o 42,7% po 15 minutach i o 33,0% po 1 godzinie.

Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, sugerującymi, że internalizacja LPS zachodzi na drodze wymagającej udziału cytoszkieletu aktynowego [96, 97]. Ostatnie dane sugerują, że wiele procesów endocytozy niezależnej od klatryny (patrz **Tabela 3.1**) kontrolowana jest przez poziom sfingolipidów, zwłaszcza sfingomieliny w błonie komórkowej. Zbadaliśmy wpływ hydrolizy sfingomieliny do ceramidu w błonie komórkowej na internalizację 1000 ng/ml LPS-AF488, poddając komórki działaniu egzogennej sfingomielinazy z bakterii *Bacillus cereus*. Enzym ten należy do rodziny neutralnych sfingomielinaz i katalizuje hydrolizę błonowej sfingomieliny do ceramidu i fosfocholiny.



Ryc. 6.13. Wpływ egzogennej bakteryjnej sfingomielinazy na internalizację lipopolisacharydu (A) i dekstranu 40000 (B). Komórki były wstępnie inkubowane przez 30 minut (4°C) z 0,5 U/ml sfingomielinazy z *Bacillus cereus*, a następnie przez 30 minut z 1 µg/ml LPS-AF488 lub 1 mg/ml dekstranu-FITC w 37°C. W części komórek wygaszono powierzchnię fluorescencją przy pomocy błękitu trypanu, a następnie poddawano analizie w cytometrze przepływowym. Kontrolę stanowił poziom internalizacji cząsteczek przez komórki nietraktowane sfingomielinazą. Wykresy przedstawiają uśrednione wyniki z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie przy $p < 0,05$

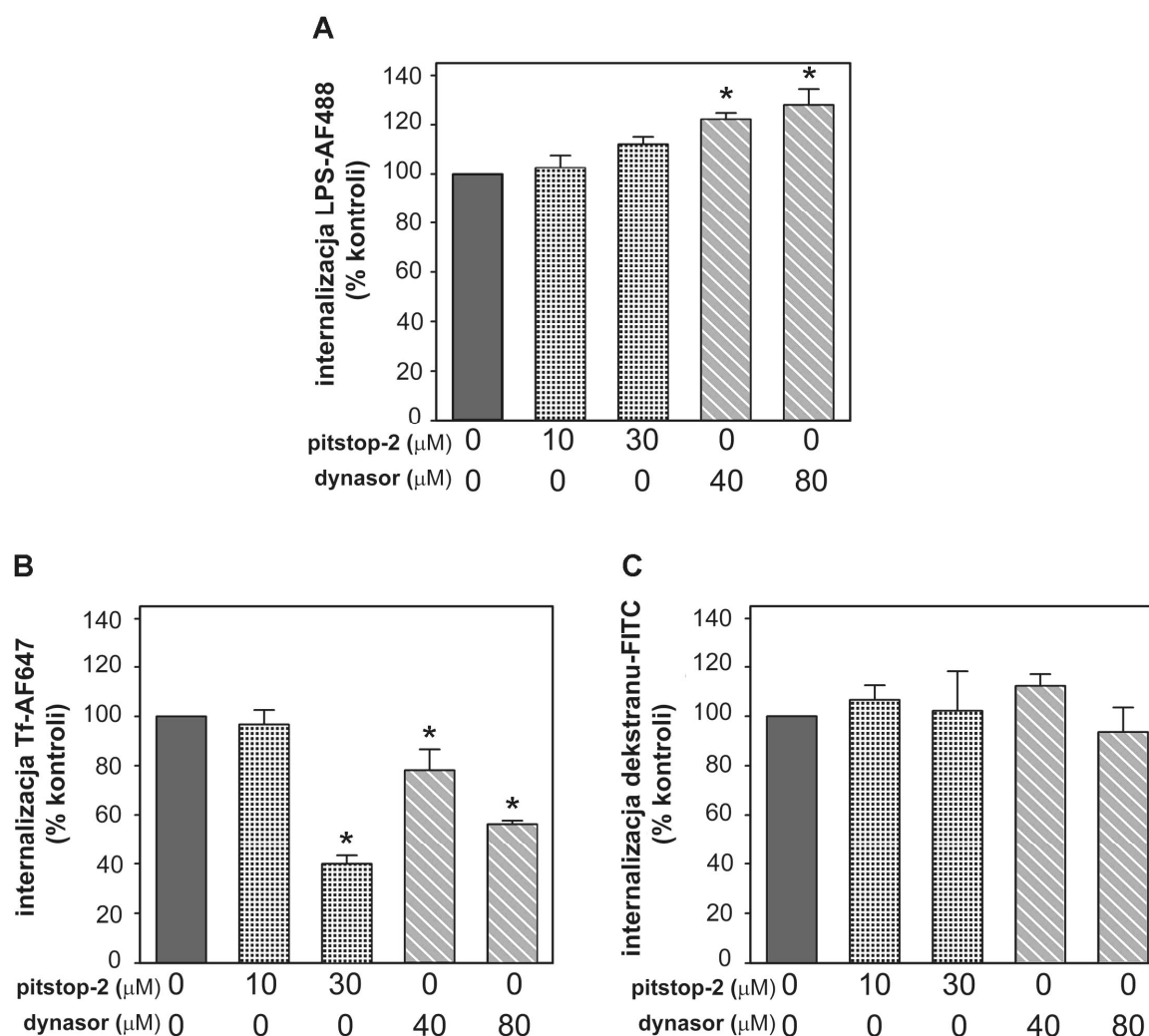
W komórkach preinkubowanych przez 30 minut z 0,5 U/ml bakteryjnej sfingomielinazy stwierdzono znaczącą redukcję internalizacji LPS-AF488, spadek ten sięgał 65%. (**Ryc. 6.13 A**). Dla porównania, bakteryjna sfingomielinaza nie była w stanie zahamować internalizacji 1 mg/ml dekstranu 40000 (skoniugowanego z FITC), pobieranego jako część fazy płynnej głównie na drodze makropinocytozy (**Ryc. 6.13 B**).

6.13. Zahamowanie endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy stymuluje internalizację wysokich stężeń lipopolisacharydu przez komórki

W celu zbadania mechanizmów internalizacji LPS zastosowaliśmy inhibitory różnych szlaków endocytarnych. Nieliczne dane literaturowe sugerują, że endocytoza zależna od dynaminy-2, białka o aktywności GTPazy, może też być drogą internalizacji receptora TLR4 (i LPS?), umożliwiającą aktywację ścieżki niezależnej od MyD88 (patrz 3.2.4.3.). Posłużyliśmy się zatem niedawno zsyntetyzowanym związkiem, dynasorem, który jest inhibitorem aktywności enzymatycznej dynaminy i blokuje szlaki internalizacyjne od niej zależne [256]. Nieoczekiwanie, dynasor w stężeniu 40-80 μM zwiększał internalizację 1000 ng/ml LPS-AF488 o około 20-30% (**Ryc. 6.14 A**). Z uwagi na udział dynaminy w endocytozie zależnej i niezależnej od klatryny zastosowaliśmy inny inhibitor, pitstop-2, który utrudnia interakcję ciężkiego łańcucha klatryny z białkami pomocniczymi - amfifizyną, AP180 i synaptojaniną 1 - i blokuje wybiórczo endocytozę zależną od tego białka [257]. Inkubacja komórek z pitstop-2 w stężeniu 30 μM zwiększała internalizację 1000 ng/ml LPS-AF488, chociaż efekt ten był słabszy niż działanie dynasoru (**Ryc. 6.14 A**). Otrzymane dane wskazują, że duże ilości LPS nie są pobierane przez komórki na ścieżce endocytarnej zależnej od dynaminy i klatryny. Hamowanie tej ścieżki wpływa dodatnio na internalizację LPS, być może wskutek kompensacyjnej aktywacji innych szlaków endocytozy.

Dla porównania, inkubacja komórek z 80 μM dynasorem hamowała o 44% internalizację transferyny, a pod wpływem 30 μM pitstop-2 internalizacja transferyny była zmniejszona o 60%. Internalizację transferyny badano po 5 minutach inkubacji komórek z tym związkiem w temperaturze 37⁰C (po uprzednim wiązaniu transferyny do komórek w temp. 4⁰C). Wstępne badania wykazały, że w tym czasie gromadziła się ona w komórkach w największych ilościach, po czym jej ilość zmniejsza się na skutek powrotu kompleksu transferyna/receptor na powierzchnię komórek (dane nie prezentowane). Transferyna jest klasycznym przykładem cząsteczki pobieranej do komórek na ścieżce zależnej od klatryny i dynaminy-2. Ani dynasor ani pitstop-2 nie miały natomiast wpływu na pobieranie przez komórki dekstranu-FITC internalizowanego na drodze makropinocytozy (**Ryc. 6.14 B, C**). Te wyniki wskazują na specyficzność stosowanych inhibitorów, chociaż ich hamujący wpływ na internalizację transferyny był mniejszy niż oczekiwano. Według producentów, w testowanych stężeniach inhibitory wykazują pełną aktywność [256, 257], a wyższe ich stężenia były toksyczne. Opisany efekt może być cechą charakterystyczną dla

makrofagów, komórek, w których procesy internalizacji zachodzą bardzo intensywnie, nie wykluczając pobierania transferyny w sposób niekanoniczny.



Ryc. 6.14. Wpływ inhibitorów klatryny i dynaminy na internalizację lipopolisacharydu, transferyny i dekstranu 40000. Komórki inkubowano wstępnie przez 30 min. ze wskazanymi stężeniami pitstop-2 lub dynasoru w obecności 1% FBS, a następnie inkubowano w obecności inhibitorów z 1000 ng/ml LPS-AF488 (30 min., 37°C, **A**), 10 μg/ml transferyny-AF647 (10 min., 4°C i 5 min. 37°C, **B**) lub 1 mg/ml dekstranu-FITC (30 min., 37°C, **C**). Po wygaszeniu powierzchniowej fluorescencji przy pomocy błękitu trypanu (**A**, **C**) lub odmyciu transferyny z powierzchni komórek buforem o kwasowym odczynie (**B**) komórki utrwalano i analizowano w cytometrze przepływowym. Kontrolę stanowił poziom internalizacji cząsteczek przez komórki nietraktowane inhibitorami. Wykresy przedstawiają uśrednione wyniki z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie przy $p < 0,05$.

6.14. Inhibicja endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy prowadzi do obniżenia produkcji cytokin w odpowiedzi na LPS

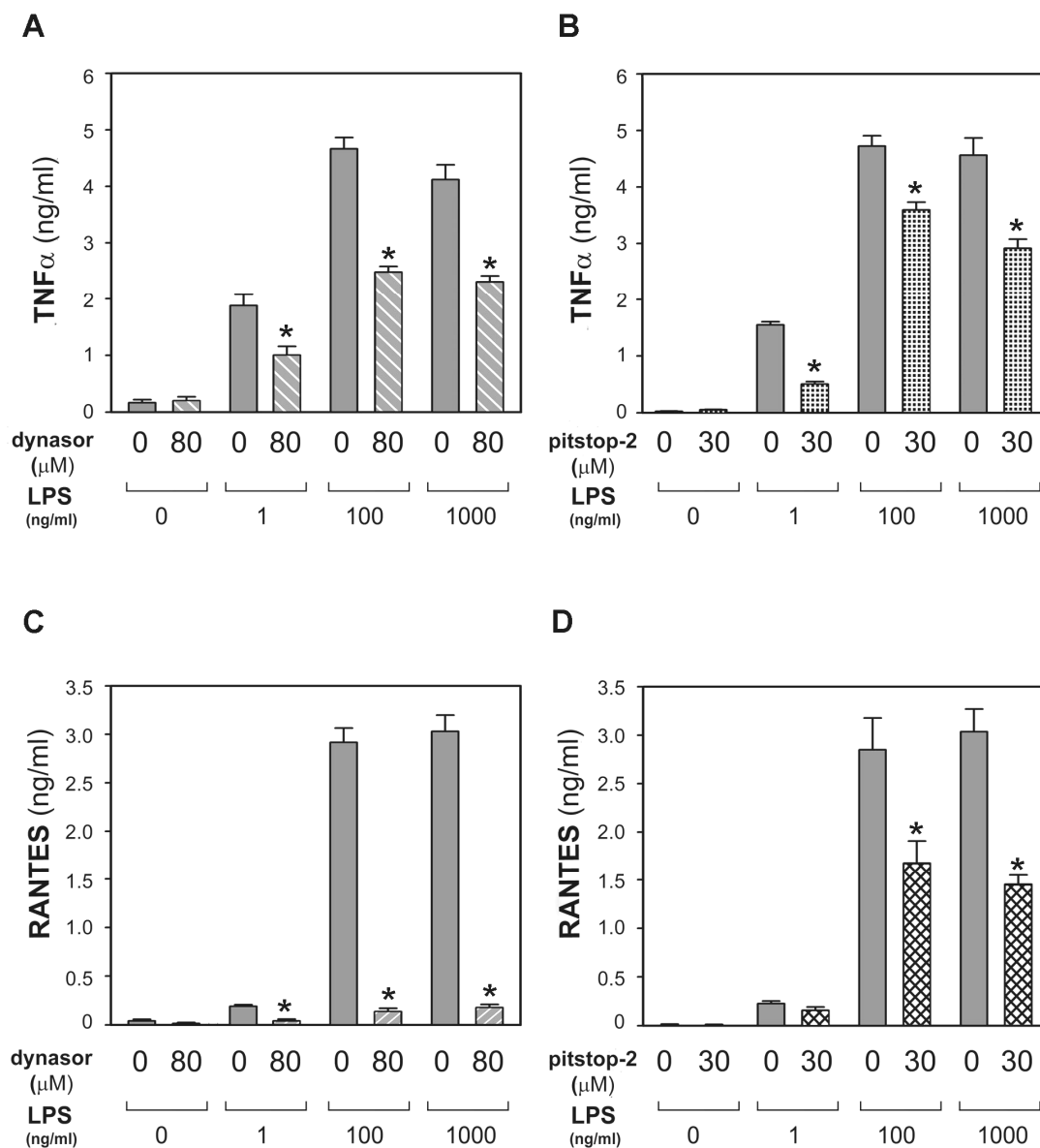
Posługując się inhibitorami klatryny i dynaminy zbadaliśmy wpływ udziału endocytozy zależnej od tych białek w produkcji cytokin stymulowanej przez LPS. Po 30 minutach wstępnej inkubacji w obecności 80 μ M dynasoru i 30 μ M pitstop-2 komórki były stymulowane przez 1-1000 ng/ml LPS (4 godziny). W nadsączu komórkowym oznaczano ilość TNF α i RANTES, cytokin produkowanych w wyniku aktywacji dwóch ścieżek sygnałowych receptora TLR4 (patrz **Ryc. 6.1**).

Obecność dynasoru i pitstop-2 hamowała produkcję cytokin indukowanych przez LPS na obu ścieżkach sygnałowych (**Ryc. 6.15 A-D**). Dynasor w stężeniu 80 μ M redukował produkcję TNF α stymulowaną przez 1-1000 ng/ml LPS o 43-47%. (**Ryc. 6.15 A**). Inhibitor ten niemal całkowicie znosił produkcję chemokiny RANTES. W przypadku stymulacji komórek przez 100-1000 ng/ml LPS zaobserwowano śladową produkcję RANTES w ilościach sięgających 5-10% ilości obserwowanych w komórkach niepoddanych działaniu inhibitora (**Ryc. 6.15 C**).

Pitstop-2 naśladował działanie dynasoru, chociaż jego hamujący wpływ na produkcję RANTES był słabszy i sięgał 35-54% (**Ryc. 6.15 C, D**).

Podsumowując, inhibicja klatryny i dynaminy prowadzi do silnego zahamowania produkcji cytokin w odpowiedzi na lipopolisacharyd. Był to efekt przeciwny do wywieranego przez oba inhibitory na internalizację dużych stężeń LPS (1000 ng/ml, patrz **Ryc. 6.14 A**), sugerując istnienie wzajemnej zależności między tymi procesami

Stosowane inhibitory hamowały szczególnie silnie produkcję chemokiny RANTES, co potwierdza rolę endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy w uruchamianiu ścieżki niezależnej od MyD88 [102]. Niemniej jednak, hamujący wpływ inhibitorów na produkcję TNF α również był wyraźny. Może to odzwierciedlać blokowanie tzw. późnej aktywacji NF κ B zachodzącej na ścieżce TRIF-zależnej, lub świadczyć o innych efektach związanych z użyciem tych inhibitorów.



Ryc. 6.15. Wpływ blokowania endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy na produkcję cytokin w odpowiedzi na LPS. Komórki poddawano 30 min. preinkubacji z 80 μM dynasorem (**A**, **C**) lub 30 μM pitstop-2 (**B**, **D**) w obecności 1% FBS, a następnie stymulowano przez 1-1000 ng/ml LPS w obecności inhibitorów (4 godz., 37°C). W nadsączu hodowlanym mierzono poziom TNF-α (**A**, **B**) i RANTES (**C**, **D**). Wyniki zostały znormalizowane względem ilości komórek w poszczególnych wariantach. Wykresy przedstawiają uśrednione wyniki z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie względem produkcji cytokin w komórkach kontrolnych traktowanych DMSO w miejsce inhibitorów przy $p < 0,05$.

6.15. Hamowanie aktywności dynaminy powoduje spadek poziomu TLR4 w komórkach

Hamujący wpływ dynasoru wywierany na produkcję cytokin na obu szlakach sygnałowych receptora TLR4, skłonił nas do zbadania wpływu tego inhibitora na poziom TLR4 na powierzchni komórek J774.

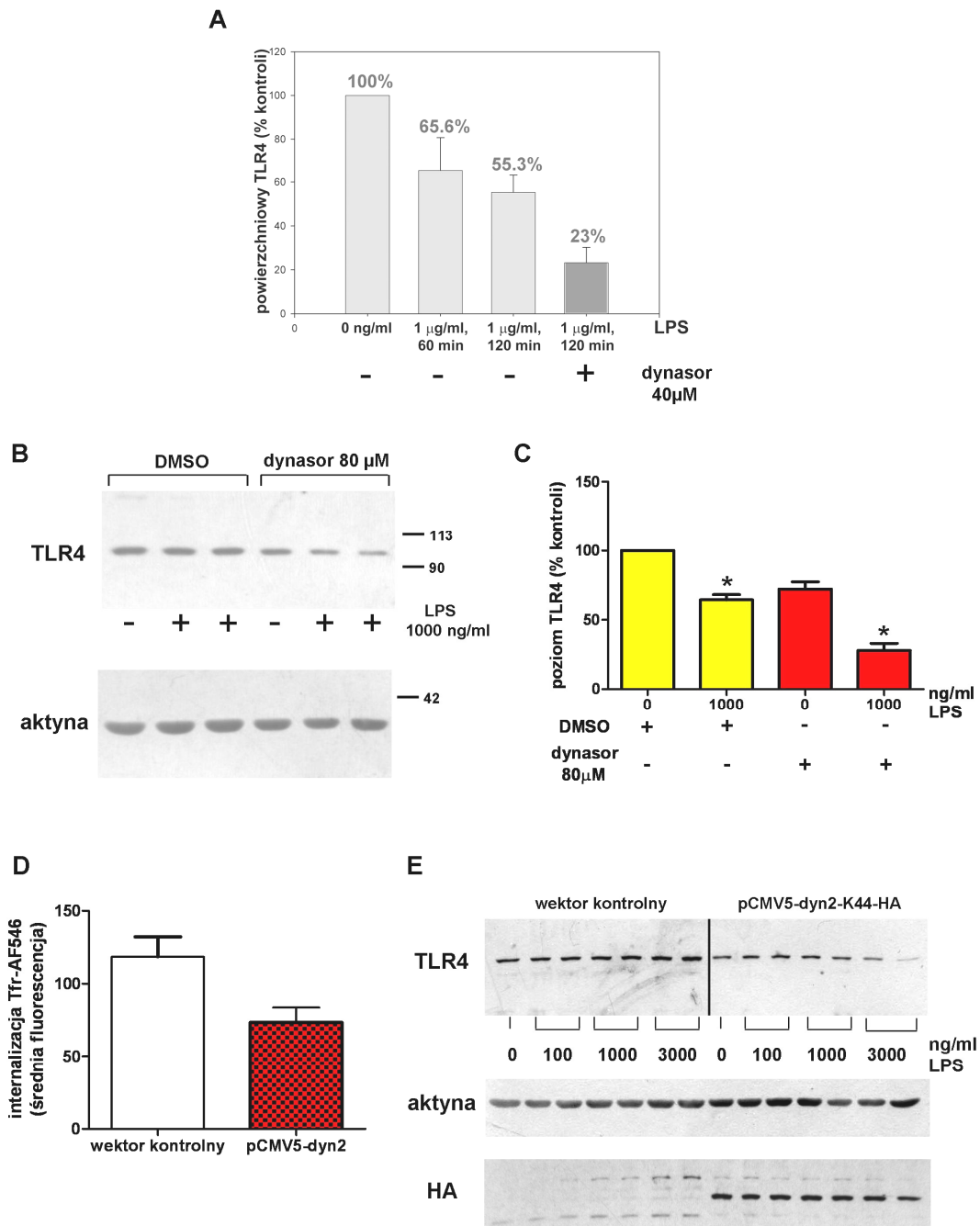
Ku naszemu zaskoczeniu, poziom powierzchniowego TLR4 mierzony techniką izotopową (patrz 6.7) w komórkach preinkubowanych z 40 μ M dynasorem, a następnie stymulowanych 1000 ng/ml LPS okazał się niższy niż w komórkach nietraktowanych inhibitorem (**Ryc. 6.16 A**). Podczas gdy dwugodzinna inkubacja z samym lipopolisacharydem powodowała spadek poziomu receptora o około 45%, obecność dynasoru pogłębiała ten efekt, skutkując utratą ponad 75% powierzchniowego TLR4.

Dynasor przyspieszał też spadek całkowitego poziomu TLR4 w komórkach. Po dwóch godzinach stymulacji komórek przez 1000 ng/ml LPS w obecności dynasoru ubytek TLR4 sięgał 65% w porównaniu z 34% spadkiem poziomu TLR4 w komórkach kontrolnych, inkubowanych z DMSO (**Ryc. 16 B,C**).

W celu potwierdzenia, czy obserwowane efekty są wynikiem inhibicji aktywności dynaminy komórki transfekowaliśmy cDNA kodującym zmutowaną, nieaktywną formę tego białka. Wektor zawierający gen dyn2-K44A-HA został wprowadzony do komórek RAW 264.7, które charakteryzują się wyższą efektywnością i przeżywalnością transfekcji niż J774. Efektywność transfekcji była potwierdzona obecnością w komórkach dynaminy-2 z metką HA (**Ryc. 6.16 E**) oraz zmniejszoną zdolnością komórek do internalizacji transferyny skoniugowanej z Alexa Fluor 546, która spadała o około 35% w stosunku do komórek transfekowanych wektorem kontrolnym pcDNA (**Ryc. 6.16 D**).

W komórkach nadprodukcujących zmutowaną formę dynaminy przez 48 godzin obserwowano zmniejszony poziom receptora TLR4 (**Ryc. 6.16 E**, „0” LPS), który spadał nieznacznie podczas dwóch godzin stymulacji wysokimi stężeniami lipopolisacharydu. W przypadku tych doświadczeń zastosowano dodatkowo wyższe niż dotąd stężenie LPS (3000 ng/ml), gdyż komórki RAW 264.7 charakteryzowały się nieco odmienną dynamiką odpowiedzi na LPS niż komórki J774 (dane nie prezentowane).

Podsumowując, zahamowanie aktywności dynaminy prowadzi do zwiększonego spadku powierzchniowego i całkowitego poziomu TLR4 w komórkach. Może to sugerować, że zahamowanie szlaku endocytozy zależnej od dynaminy indukuje alternatywny szlak internalizacji TLR4, sprzyjający degradacji receptora.



Ryc. 6.16. Wpływ inkubacji komórek z dynasorem na poziom TLR4. **A** - Ubytek TLR4 z powierzchni komórek przylegających do podłoża, stymulowanych przez 1000 ng/ml LPS (60 lub 120 min., 37°C) w obecności 40 μM dynasoru, oznaczony za pomocą metody izotopowej. **B, C, E** – całkowity poziom TLR4 w komórkach poddanych działaniu 80 μM dynasoru (komórki J774, **B, C**) lub transfekowanych cDNA kodującym zmutowaną dynaminę dyn2-K44A-HA (komórki RAW 264.7, **E**), a następnie stymulowanych podanymi stężeniami LPS przez 120 min. Komórki poddawano lizie, a białka lizatów rozdzielano elektroforetycznie i analizowano techniką immunoblotingu pod względem zawartości TLR4. Dolne panele przedstawiają zawartość aktyny w analizowanych próbkach w celu weryfikacji równomiernej zawartości białka oraz detekcję metki hemaglutyniny (HA) przyłączonej do dyn2-K44A. **C** – Wyniki pomiarów densytometrycznych poziomu TLR4 znormalizowanych wobec poziomu aktyny. * - Różnica istotna statystycznie wobec komórek niestymulowanych przy $p < 0,05$. **D** – Internalizacja 10 μg/ml transferyny-AF546 (10 min., 4°C i 5 min. 37°C) w komórkach RAW 264.7 transfekowanych wektorem z cDNA kodującym zmutowaną dynaminę dyn2-K44A oraz wektorem kontrolnym, 48 godzin po transfekcji. Fluorescencja mierzona po usunięciu transferyny związanej na powierzchni komórek.

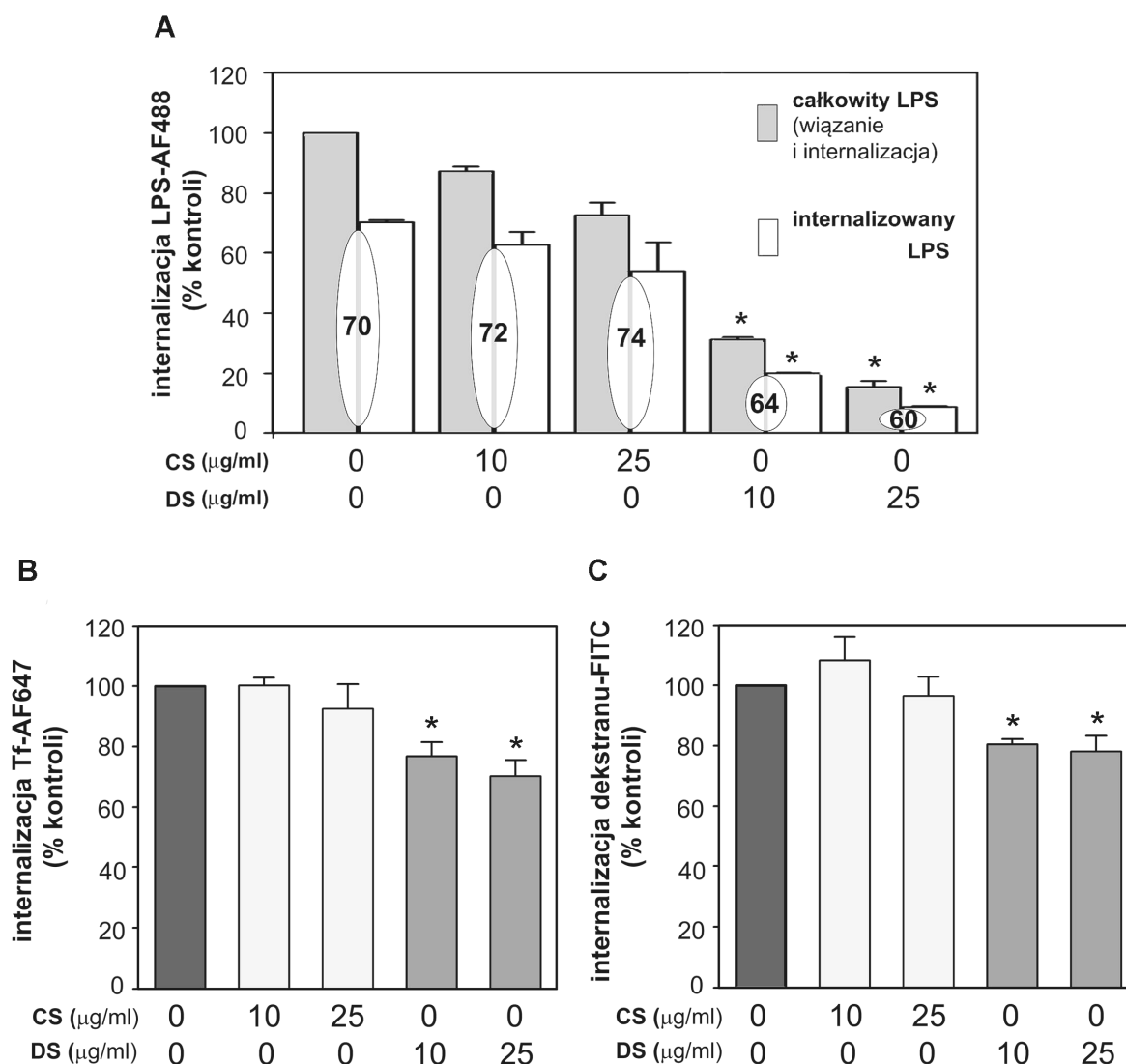
6.16. Blokowanie wiązania LPS do receptorów zmiataczy prowadzi do zahamowania jego internalizacji przez komórki

W toku dotychczasowych doświadczeń wykazano, że internalizacja dużego stężenia LPS (1000 ng/ml) nie zależy od receptora TLR4 i nie odbywa się na ścieżce zależnej od klatryny i dynaminy. Istotną rolę w tym procesie odgrywa natomiast białko CD14. Grupą receptorów o postulowanej roli w endocytozie i detoksykacji lipopolisacharydu są receptory zmiatacze (patrz 3.2.6.). Aby ocenić, czy w komórkach linii J774 ta klasa receptorów uczestniczy w internalizacji LPS posłużyliśmy się siarczanem dekstranu. Jest to obdarzona ładunkiem makrocząsteczka będąca preferowanym ligandem dla receptorów zmiataczy. Związanie siarczanu dekstranu do receptorów zmiataczy uniemożliwia ich interakcję ze swoistymi ligandami i z tego względu służy jako kompetycyjny inhibitor tych swoistych interakcji, jednocześnie utrzymując receptory zmiatacze w stanie aktywnym [258]. Natomiast zbliżony strukturalnie związek, siarczan chondroityny, wiąże się do receptorów zmiataczy z dużo mniejszym powinowactwem i został użyty jako negatywna kontrola działania siarczanu dekstranu. Zbadano wpływ obu związków na internalizację 1000 ng/ml LPS-AF488, a także 10 µg/ml transferyny-AF647 i 1 mg/ml dekstranu-FITC.

Zastosowanie siarczanu dekstranu miało znaczący wpływ na całkowitą ilość LPS-AF488 w komórkach (zarówno związanego jak i pobranego przez komórki), redukując ją o 72% przy 10 µg/ml i o 87% przy 25 µg/ml tego związku (**Ryc. 6.17 A**, czarne słupki). Efekt ten był specyficzny dla siarczanu dekstranu, gdyż w obecności 25 µg/ml siarczanu chondroityny całkowita ilość LPS-AF488 w komórkach była zredukowana tylko o 23% (**Ryc. 6.17 A**, czarne słupki). Wyniki tych badań sugerują istotną rolę receptorów zmiataczy w internalizacji lipopolisacharydu przez komórki J774.

W odróżnieniu od silnego hamującego wpływu siarczanu dekstranu na internalizację LPS-AF488, związek ten hamował endocytozę transferyny-AF647 o około 25-30%, a internalizację dekstranu-FITC o około 22% (**Ryc. 6.17 B, C**). Nie wykryto wpływu siarczanu chondroityny na te procesy (**Ryc. 6.17 B, C**).

Tak wyraźny wpływ siarczanu dekstranu na internalizację LPS skłonił nas do zbadania, czy związek ten hamuje wiązanie LPS do komórek, czy też raczej sam proces pobierania LPS do wnętrza komórki. Oceniliśmy zatem jaki procent wykrywanej fluorescencji pochodzi od LPS-AF488 internalizowanego do wnętrza komórek w obecności siarczanu dekstranu lub siarczanu chondroityny po wygaszeniu powierzchniowej fluorescencji LPS-AF488 za pomocą błękitu trypanu.



Ryc. 6.17. Udział receptorów zmiataaczy w internalizacji lipopolisacharydu, transferyny i dekstranu 40000. Komórki inkubowano wstępnie przez 30 min. ze wskazanymi stężeniami siarczanu dekstranu (DS) lub siarczanu chondroityny (CS), a następnie inkubowano w obecności inhibitorów z 1000 ng/ml LPS-AF488 (30 min., 37°C, **A**), 10 µg/ml transferyny-AF647 (10 min. 4°C i 5 min. 37°C, **B**) lub 1 mg/ml dekstranu-FITC (30 min., 37°C, **C**).

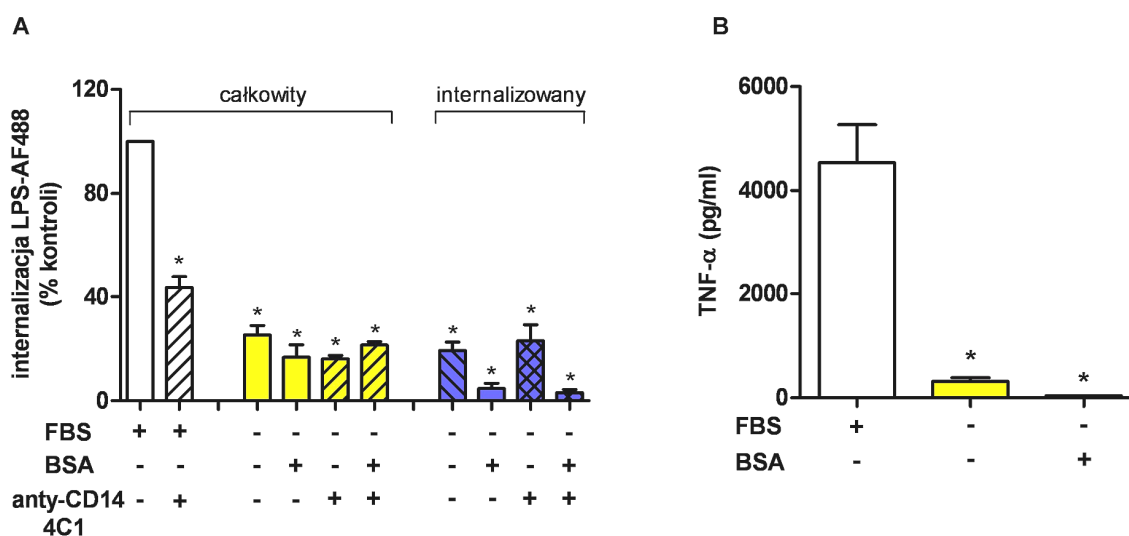
A - Komórki analizowano w cytometrze przepływowym mierząc całkowitą ilość LPS-AF488 związanego i pobranego przez komórki (czarne słupki), lub po wygaszeniu powierzchniowej fluorescencji LPS-AF488 przy pomocy błękitu trypanu - ilość LPS zinternalizowanego (jasne słupki). Elipsy obrazują jako procent całkowitego LPS-AF488 stanowił LPS zinternalizowany.

B - Przedstawia wyniki analizy cytometrycznej zinternalizowanej transferyny podmiocy transferyny z powierzchni komórek, (**C**) ilość dekstranu-FITC we wnętrzu komórek po wygaszeniu fluorescencji powierzchniowej błękitem trypanu.

Kontrolę stanowił poziom internalizacji cząsteczek przez komórki nietraktowane inhibitorami. Wykresy przedstawiają uśrednione wyniki z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie względem prób z analogicznym stężeniem siarczanu chondroityny przy $p < 0,05$.

Zgodnie z wcześniejszymi ustaleniami (patrz **Ryc. 6.11**), w komórkach nietraktowanych inhibitorami bądź inkubowanych z siarczanem chondroityny około 70% wykrywanej fluorescencji LPS-AF488 pochodziło z ich wnętrza (**Ryc. 6.17 A**, trzy pierwsze jasne słupki). W komórkach inkubowanych z 25 µg/ml siarczanu dekstranu frakcja wewnątrzkomórkowego LPS była tylko nieznacznie mniejsza (około 60%) pomimo znacznego obniżenia całkowitego wykrywanego sygnału LPS-AF488 (**Ryc. 6.17 A**, dwa ostatnie jasne słupki). Wyniki te sugerują, że siarczan dekstranu hamuje głównie wiązanie LPS do komórek, a nie sam proces jego internalizacji jako taki. Wynika z nich również, że receptory zmiatacze odpowiadają za wiązanie znacznej frakcji lipopolisacharydu na powierzchni komórek J774.

Na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że internalizacja dużych stężeń LPS przez komórki J774 wymaga współdziałania białka CD14 i receptorów zmiataczy. Dane literaturowe sugerują, że inkubacja LPS z albuminą prowadzi do powstania kompleksów, które internalizowane są przez receptory zmiatacze klasy B bez udziału CD14 i innych białek surowicy [62, 64]. Aby zbadać, czy taka ścieżka internalizacji LPS funkcjonuje w komórkach J774 poddawaliśmy je czterogodzinnemu głodzeniu w pożywce pozbawionej FBS, a następnie inkubowaliśmy z 1000 ng/ml LPS-AF488 w tych samych warunkach. Stwierdziliśmy 75% spadek ilości związanego i internalizowanego LPS-AF488 w stosunku do komórek inkubowanych w obecności FBS, i proporcja ta nie zmieniała się po zahamowaniu wiązania LPS do CD14 przy użyciu przeciwciała 4C1 (**Ryc. 6.18 A**). Po inkubacji komórek z LPS-AF488 w obecności 5 mg/ml BSA jego wiązanie do komórek nie zmieniało się, ale jego internalizacja była całkowicie zahamowana (**Ryc. 6.18 A**). Otrzymane dane wskazują, że w komórkach J774 efektywne wiązanie i internalizacja wysokich stężeń LPS wymaga udziału CD14, które pozyskuje lipopolisacharyd od LBP z surowicy i przekazuje go na receptory zmiatacze. Śladowe wiązanie i internalizacja LPS obserwowane bez udziału białek surowicy i bez CD14 zachodzić może dzięki aktywności innych białek błonowych zdolnych do wiązania tej endotoksyny, takich jak integryny [173].



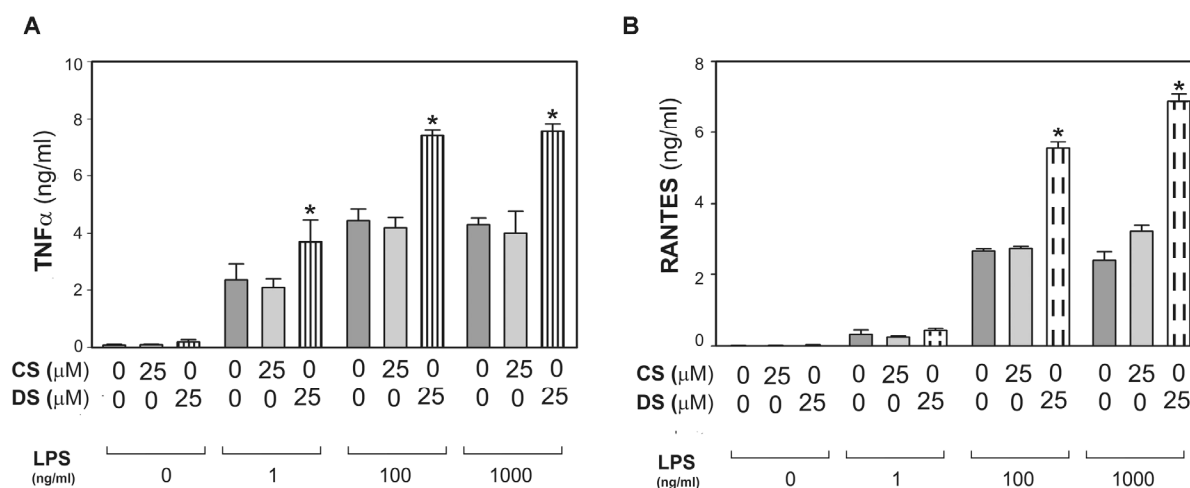
Ryc. 6.18. **A** - Obecność BSA nie rekompensuje braku białek surowicy w procesie internalizacji lipopolisacharydu. Komórki były inkubowane przez 4 godziny w pożywce RPMI bez FBS, następnie przez 30 minut w obecności 20 $\mu\text{g/ml}$ przeciwciał anti-CD14 4C1 lub równej ilości izotypowych przeciwciał kontrolnych (IgG2b) i ostatecznie z 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS-AF488. W zaznaczonych wariantach LPS-AF488 inkubowany był wstępnie przez 4 godziny z RPMI zawierającym 5 mg/ml BSA i w takiej formie podawany komórkom (37°C). W części wariantów (niebieskie słupki) wygaszono powierzchniową fluorescencję LPS-AF488, a następnie komórki poddawano analizie w cytometrze przepływowym. Kontrolę stanowił poziom internalizacji LPS-AF488 przez komórki inkubowane w obecności 10% FBS. **B** – produkcja TNF α po 4 godzinach (37°C) stymulacji komórek w pożywce bez FBS przez 100 ng/ml LPS lub LPS kompleksowany z BSA (j.w.). Jako kontrolę przedstawiono produkcję TNF α po inkubacji ze 100 ng/ml LPS w pożywce z 10% FBS. Wykresy przedstawiają uśrednione wyniki z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie przy $p < 0,05$.

6.17. Inkubacja komórek z siarczanem dekstranu prowadzi do zwiększonej produkcji cytokin w odpowiedzi na LPS

Przeprowadzone przez nas doświadczenia wykazały, że receptory zmiatacze są istotne dla pobierania dużych ilości LPS przez komórki (patrz 6.12). Posłużyliśmy się techniką blokowania wiązania LPS do receptorów zmiataczy przy użyciu siarczanu dekstranu w celu sprawdzenia wpływu tego procesu na aktywację komórek przez LPS.

Użycie siarczanu dekstranu prowadziło do istotnego wzrostu produkcji cytokin na obu ścieżkach sygnałowych receptora TLR4, kontrolujących produkcję TNF α i RANTES (**Ryc. 6.19**), co kontrastowało z silnym hamującym wpływem tego związku wywieranym na internalizację 1000 ng/ml LPS (patrz **Ryc. 6.17 A**). Pod wpływem siarczanu dekstranu indukowana przez 1-1000 ng/ml LPS produkcja TNF α wzrastała o 57%-75% i wzrost ten był najwyższy przy stymulacji komórek przez 1000 ng/ml LPS (**Ryc. 6.19 A**). W

odniesieniu do produkcji chemokiny RANTES, obecność siarczanu dekstranu powodowała około dwukrotny wzrost jej wydzielania przez komórki stymulowane przez 100 ng/ml i 1000 ng/ml LPS, podczas gdy wpływ siarczanu dekstranu na produkcję RANTES stymulowaną przez 1 ng/ml LPS był słabo zauważalny (Ryc. 6.19 B). Siarczan chondroityny nie powodował podobnych efektów (Ryc. 6.19 A, B).



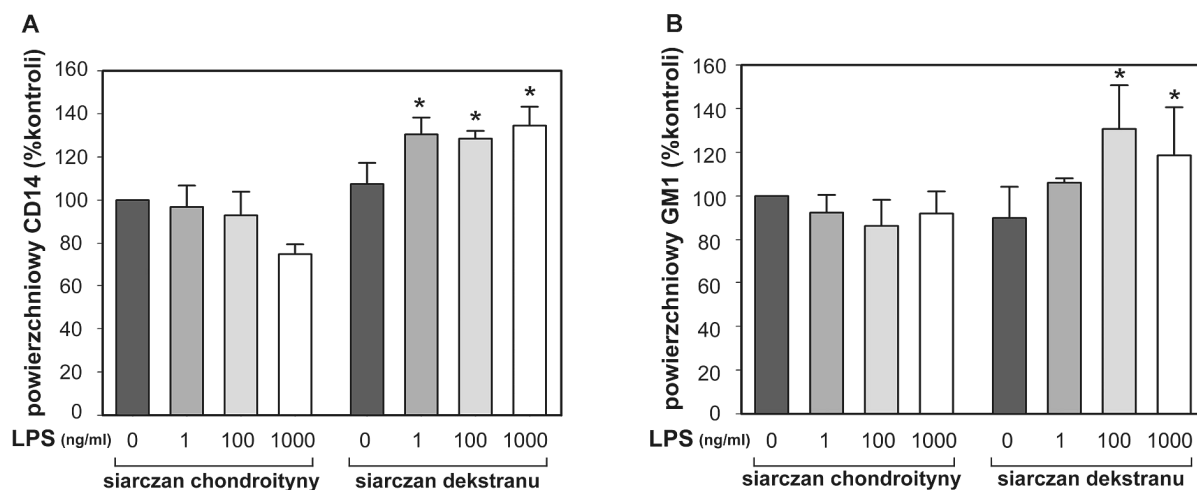
Ryc. 6.19. Pozytywny wpływ siarczanu dekstranu na produkcję cytokin indukowaną przez LPS. Komórki poddawano 30 minutowej preinkubacji z 25 μ g/ml siarczanu dekstranu (DS) lub siarczanu chondroityny (CS), a następnie 4 godzinnej inkubacji z podanymi stężeniami LPS w obecności DS lub CD. Nadsącz hodowlany został poddany testowi ELISA pod kątem obecności TNF α (A) i RANTES (B). Wyniki zostały znormalizowane względem ilości komórek w poszczególnych wariantach. Wykresy przedstawiają uśrednione wyniki z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie względem produkcji cytokin przez komórki stymulowane przez LPS bez obecności DS i DC $p < 0,05$.

W oparciu o wyniki omówione w ostatnich rozdziałach można stwierdzić, że receptory zmiatacze odgrywają istotną rolę w regulacji aktywacji komórek przez LPS uczestnicząc w internalizacji dużych stężeń tej endotoksyny bez indukowania odpowiedzi prozapalnej. Zablockowanie wiązania LPS do receptorów zmiataczy prowadzi do zahamowania internalizacji LPS z jednoczesnym wzmocnieniem produkcji cytokin prozapalnych. Podobną przeciwwagę szlaków aktywujących odpowiedź prozapalną komórek i internalizacji dużych stężeń LPS dawek wykryto przy użyciu inhibitorów endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy. Wykazaliśmy, że zahamowanie tego szlaku endocytozy obniżało produkcję cytokin prozapalnych i prowadziło do wzmożonego pobierania dużych stężeń LPS przez komórki.

6.19. Ekspresja CD14 i TLR4 na powierzchni komórek zwiększa się pod wpływem siarczanu dekstranu

Przedstawione powyżej dane wskazują, że hamowanie wiązania LPS do receptorów zmiataczy w obecności siarczanu dekstranu prowadziło do zwiększonej produkcji TNF α i RANTES (**Ryc. 6.19**). Biorąc pod uwagę, że skala odpowiedzi prozapalnej komórek na stymulację LPS może być uzależniona od ekspresji CD14 i TLR4 na powierzchni komórek, zbadaliśmy czy ekspresja ta zmienia się w komórkach traktowanych siarczanem dekstranu.

Stwierdziliśmy, że inkubacja komórek z 25 μ g/ml siarczanu dekstranu prowadziła do wzrostu ekspresji CD14 na ich powierzchni o około 7%, a następująca stymulacja komórek przez 1-1000 ng/ml LPS (1 godz.) podnosiła ten poziom o 29-35% w porównaniu z komórkami kontrolnymi, preinkubowanymi z 25 μ g/ml siarczanu chondroityny (**Ryc. 6.20 A**). Warto podkreślić, że godzinna inkubacja komórek z 1000 ng/ml LPS w obecności siarczanu chondroityny (próby kontrolne) indukowała spadek ilości CD14 na powierzchni komórek (**Ryc. 6.19 A**), zgodnie z opisanymi wcześniej obserwacjami (patrz **Ryc. 6.7 A**).



Ryc. 6.20. Inkubacja komórek z siarczanem dekstranu prowadzi do podniesienia poziomu CD14 i GM1 na powierzchni komórek. Komórki preinkubowano przez 30 minut (37°C) z 25 μ g/ml siarczanu dekstranu lub siarczanu chondroityny, a następnie stymulowano 1-1000 ng/ml LPS w obecności tych związków.

A - Ekspresja CD14 na powierzchni komórek. **B** - Poziom GM1 na powierzchni komórek oszacowany na podstawie wiązania CTX-FITC. Analiza wykonana na komórkach przylegających do podłoża techniką laserowej cytometrii skaningowej. Uśredniono wyniki z trzech doświadczeń. * - Różnica istotna statystycznie względem komórek niestymulowane przez LPS preinkubowanych z siarczanem chondroityny, $p < 0,05$.

Analiza ekspresji gangliozydu GM1, glikolipidu tratw lipidowych, wykazała, że w komórkach poddanych działaniu siarczanu dekstranu i stymulowanych przez 1-1000 ng/ml LPS ilość tego lipidu na powierzchni komórek także się zwiększała w granicach 10-20% (**Ryc. 19B**).

Pomiary poziomu TLR4 na powierzchni komórek w obecności siarczanu dekstranu i siarczanu chondroityny napotkały trudności techniczne. Oba związki prawdopodobnie zaburzały oddziaływanie specyficznego przeciwciała z receptorem TLR4, co prowadziło do znacznych rozrzutów pomiarów poziomu tego receptora na powierzchni komórek. Niemniej jednak, zauważalnym i powtarzalnym efektem działania siarczanu dekstranu (ale nie siarczanu chondroityny) był wzrost ilości receptora TLR4 na powierzchni komórek stymulowanych przez 1000 ng/ml LPS. Wzrost ten wynosił około 25-35% w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.

Łącznie nasze wyniki sugerują, że w obecności siarczanu dekstranu, ligandu receptorów zmiataczy, stymulacja komórek przez LPS prowadzi do zwiększenia poziomu TLR4, CD14 i GM1 na powierzchni komórek.

7. Dyskusja

Identyfikacja TLR4 jako receptora generującego szlaki sygnałowe w odpowiedzi na LPS [12] rozpoczęła okres intensywnych badań nad molekularnymi mechanizmami aktywacji komórek układu odpornościowego przez endotoksynę. Pomimo znaczącego postępu badań nasze zrozumienie tych procesów wciąż jest niepełne. Nagromadzone dane wskazują na istnienie złożonego, wielopoziomowego mechanizmu regulującego nasilenie i charakter odpowiedzi prozapalnej w zależności od stopnia infekcji. Internalizacja lipopolisacharydu może być jednym z mechanizmów utrzymujących równowagę pomiędzy korzystną, a przesadną i szkodliwą reakcją komórek układu odpornościowego na ten czynnik.

Celem badań przeprowadzonych w toku niniejszej pracy była próba wyjaśnienia roli internalizacji lipopolisacharydu jako mechanizmu regulującego odpowiedź komórek makrofagopodobnych linii J774 na stymulację przez LPS. Szczególna uwaga została poświęcona udziałowi receptorów lipopolisacharydu, TLR4 i CD14, a także receptorów z rodziny zmiataczy w tym procesie. Wyniki naszych badań pozwalają stwierdzić, że istotną rolę w internalizacji wysokich stężeń LPS (1000 ng/ml) pełni białko CD14 oraz receptory zmiatacze, ale nie receptor TLR4. Wskazuje to na niezależność tej ścieżki internalizacji lipopolisacharydu od wydarzeń sygnałowych skoncentrowanych wokół TLR4. Wysokie stężenia LPS są pobierane przez komórki na drodze wymagającej udziału aktywny i prawdopodobnie sfingomieliny, lecz niezależnej od klatryny i dynaminy, co nadaje jej cechy jednej z niekonwencjonalnych dróg internalizacji (**Tabela 3.1**). Zahamowanie tej ścieżki internalizacji LPS przy użyciu siarczanu dekstranu, kompetycyjnego inhibitora wiązania LPS do receptorów zmiataczy, powodowało znaczący wzrost produkcji cytokin. Te wyniki wskazują na istotną rolę internalizacji wysokich stężeń LPS w negatywnej regulacji odpowiedzi prozapalnej komórek na stymulację przez endotoksynę.

Wykazaliśmy jednocześnie, że w toku odpowiedzi na wysokie stężenia lipopolisacharydu receptory TLR4 i CD14 znikają z powierzchni komórek, przy czym TLR4 ulega degradacji, co prowadzi do zauważalnego ubytku całkowitej ilości receptora TLR4 w komórkach. Te procesy są skorelowane z zahamowaniem odpowiedzi prozapalnej komórek, a zatem internalizacja i obniżanie powierzchniowego poziomu TLR4 i CD14 może być sposobem wyciszenia odpowiedzi komórek J774 na stymulację przez LPS.

Z drugiej strony, przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że endocytoza zależna od klatryny i dynaminy wymagana jest do uruchomienia pełnej kaskady wydarzeń sygnałowych przez receptor TLR4. Wcześniejsze dane literaturowe sugerowały, że dynamina kontroluje endocytozę receptora TLR4 aktywowanego przez LPS [102, 129]. W naszych badaniach dynasor i pitstop-2 hamowały produkcję TNF α i niemal znosiły produkcję chemokiny RANTES indukowaną przez LPS. Jednocześnie, mimo zahamowania aktywacji komórek, związki te nasilały internalizację wysokich stężeń LPS (1000 ng/ml) przez komórki. Dane te wskazują ponownie na istnienie przeciwwagi pomiędzy odpowiedzią prozapalną komórek stymulowanych przez LPS i procesem pobierania przez nie wysokich dawek lipopolisacharydu.

7.1. Internalizacja lipopolisacharydu jako mechanizm regulacji odpowiedzi prozapalnej komórek

Kontekst komórkowy. Dostępne obecnie dane literaturowe przedstawiają niespójny obraz roli pobierania lipopolisacharydu przez komórki w procesach aktywacji i wyciszenia odpowiedzi prozapalnej. Wyniki i płynące z nich wnioski są często sprzeczne i wydają się zależeć od kontekstu komórkowo-tkankowego badań, co nie jest dziwne, zważywszy na stopień komplikacji systemu rozpoznającego lipopolisacharyd i liczbę czynników biorących udział w jego regulacji (patrz 3.2.5). Zwraca to jednak uwagę na konieczność precyzyjnego określania warunków przeprowadzania doświadczeń, zwłaszcza w kwestii hodowli i stymulacji komórek przez LPS. Jest wiadome, że poszczególne gatunki ssaków znacząco różnią się podatnością na infekcje bakteryjne, co często wiąże się z wrażliwością lub opornością komórek ich układu odpornościowego na lipopolisacharyd [259]. Dla przykładu, człowiek jest gatunkiem o wyjątkowej wrażliwości na LPS i już dawki rzędu 2-4 ng/kg masy ciała (około 25-50 pg/ml) wywołują objawy chorobowe, natomiast dawki rzędu 1-2 μ g/kg (około 15-30 ng/ml) mogą prowadzić do szoku septycznego i śmierci [260]. W porównaniu z ludźmi, myszy charakteryzują się znacznie większą opornością na LPS i ocenia się, że wywołanie objawów ciężkiego szoku septycznego u myszy wymaga od 1000 do 10 000 razy większej dawki lipopolisacharydu niż u ludzi [259]. Różnice we wrażliwości na LPS występujące pomiędzy gatunkami tłumaczą co najmniej dwie teorie. Pierwsza z nich zakłada, że odmienna wrażliwość na LPS jest wynikiem różnic w ekspresji białek na poziomie komórkowym [261, 262]. Zgodnie z tą teorią, niska ekspresja receptora TLR4 na powierzchni mysich leukocytów jest przyczyną ich niskiej wrażliwości na LPS [263, 264]. Według drugiej teorii, decydujące znaczenie mają różne składniki surowicy

krwi (takie jak przeciwciała, komplement i białka ostrej fazy), które mogą wzmacniać bądź osłabiać odpowiedź komórek na LPS [259, 265-267].

W celu oceny odpowiedzi mysich komórek makrofagopodobnych linii J774 na lipopolisacharyd oraz zbadania dynamiki ich aktywacji, posłużono się testami ELISA do oznaczenia poziomu produkowanych przez nie cytokin (patrz 5.5 i 6.1). Analizowano wydzielanie do środowiska dwóch cytokin, TNF α i RANTES, których produkcja jest stymulowana na ścieżkach, odpowiednio, zależnej od MyD88 i zależnej od TRIF (niezależnej od MyD88). Takie podejście jest istotne z punktu widzenia założeń niniejszej pracy, ze względu na postulowaną rolę internalizacji receptora TLR4 w generacji sygnału na ścieżce sygnałowej zależnej od TRIF [102].

Otrzymane wyniki wskazują, że dynamika odpowiedzi komórek na LPS na obu ścieżkach sygnałowych receptora TLR4 jest odmienna (**Ryc. 6.1**). Produkcja TNF α aktywowana jest szybciej i stabilizuje się po upływie około czterech godzin, podczas gdy produkcja RANTES rośnie w ciągu 24 godzin stymulacji komórek. Co więcej, produkcja TNF α jest silniej stymulowana przez niskie stężenia LPS, rzędu 10-50 ng/ml, a obecność wyższych stężeń LPS daje odpowiedź obniżoną. W przypadku RANTES nie występuje efekt redukcji produkcji tej chemokiny przez wyższe stężenia LPS, niemniej jednak wydzielanie RANTES do środowiska osiąga plateau przy około 100 ng/ml LPS. Wydzielanie TNF α wydaje się zatem podlegać silniejszej negatywnej kontroli niż produkcja RANTES. Biologiczny sens tych obserwacji może wydawać się oczywisty, gdyż TNF α wykazuje silne, szerokie i potencjalnie niebezpieczne działanie na organizm gospodarza, w przeciwieństwie do chemotaktycznego działania RANTES. Wyniki badań prowadzonych w naszej Pracowni wykazały jednak, że inna chemokina – MIP-2, cechuje się zbliżoną dynamiką produkcji do TNF α , i podobnie jak TNF α , produkcja MIP-2 regulowana jest negatywnie przez ceramid. Z drugiej strony, wydzielanie tlenu azotu, czynnika bakteriobójczego, swoim przebiegiem i zależnością od stężenia LPS przypominało produkcję RANTES [268]. Dane te sugerują, że łączny efekt różnorodnych czynników negatywnie regulujących odpowiedź komórek na długotrwałą stymulację przez wyższe stężenia LPS przejawia się silniej w odniesieniu do produkcji cytokin na ścieżce zależnej od MyD88 (TNF α , MIP-2), niż zależnej od TRIF (RANTES, indukowana synteza tlenu azotu). Spośród badanych przez nas mechanizmów taką selektywność wykazywał ceramid (jak omówiono poniżej), podczas gdy internalizacja wysokich stężeń LPS wydaje się wyciszać obie ścieżki sygnałowe receptora TLR4.

Endocytoza klatryno- i dynamino-zależna jest wymagana dla produkcji cytokin prozapalnych. Wykryliśmy, że komórki inkubowane w obecności wysokich stężeń LPS-AF488, 1000 ng/ml, już w ciągu paru minut wiążą go do powierzchni i internalizują, a po około godzinie proces ten osiąga plateau (**Ryc. 6.11**). Zidentyfikowaliśmy kilka czynników, które mają znaczny udział w internalizacji wysokich stężeń lipopolisacharydu przez komórki. Należy do nich białko CD14, receptory zmiatacze, białka surowicy oraz aktyna. Natomiast w proces ten nie jest zaangażowany TLR4 - główny receptor LPS odpowiedzialny za generację sygnału. Blokowanie wiązania LPS do tego receptora nie wpłynęło na pobieranie LPS-AF488 przez komórki (**Ryc. 6.12**). Wynik ten stoi w pozornej sprzeczności z danymi literaturowymi, które postulują internalizację kompleksu TLR4/MD-2 wraz ze związanym lipopolisacharydem jako warunek niezbędny do inicjacji ścieżki niezależnej od MyD88. Dowodzą też współwystępowania TLR4 i fluorescencyjnego LPS w endosomach monocytów i komórek HEK293 transfekowanych cDNA receptora TLR4, białka CD14 i MD-2 [102, 129]. Z drugiej strony, badania prowadzone na monocytach pochodzących z myszy pozbawionych TLR4 wykazały, że receptor ten nie uczestniczy w internalizacji LPS [179]. Te rozbieżności da się pogodzić przyjmując, że w komórkach takich jak monocyty i makrofagi istnieją co najmniej dwie drogi internalizacji lipopolisacharydu. W przypadku obecności dużych ilości LPS w środowisku, większość endotoksyny jest pobierana do komórek na ścieżce zmierzającej do detoksykacji, która nie angażuje receptora TLR4 i nie jest powiązana z generacją sygnału. Natomiast pula „sygnałowa” LPS, która internalizowana jest łącznie z receptorem TLR4 i prowadzi do uruchomienia TRIF-zależnej ścieżki sygnałowej receptora z błony endosomów, jest prawdopodobnie stosunkowo mała w porównaniu z ilościami LPS pobieranymi na ścieżce detoksykacyjnej. Przemawia za tym relatywnie niskie stężenie LPS wymagane do pełnej aktywacji komórek (do 100 ng/ml) oraz dane wskazujące na niewielką ilość receptora TLR4 na ich powierzchni. Szacuje się, że na powierzchni ludzkich komórek dendrytycznych i monocytów występuje, odpowiednio, kilkaset-kilka tysięcy cząsteczek TLR4 w stosunku do około 100 000 cząsteczek CD14. Na istnienie dwóch dróg internalizacji LPS wskazywał Kitchens i współautorzy badający pobieranie LPS przez transfekowane komórki THP-1 wyrażające CD14 stosując technikę mikroskopii elektronowej. Analiza ilościowa cząstek złota koloidalnego obrazującej lokalizację LPS wykazała, że komórki internalizują LPS zarówno w pęcherzykach nieopłaszczonych jak i opłaszczonych klatryną, przy czym droga zależną od klatryny stanowi tylko 1/10 całej puli internalizowanego LPS [97].

Związek tej ostatniej ścieżki z internalizacją receptora TLR4 na drodze generacji sygnału wydaje się prawdopodobny, ze względu na dane wskazujące na udział w nim dynaminy, innego białka kluczowego dla tego procesu [102]. W naszych badaniach hamujący wpływ na produkcję cytokin prozapalnych stymulowaną przez LPS wykazywał dynasor, inhibitor aktywności GTPazy dynaminy, a także pitstop-2, inhibitor interakcji ciężkiego łańcucha klatryny z białkami pomocniczymi (**Ryc. 6.15**). Wyniki te wskazują na udział klatryny i dynaminy w procesie generacji sygnałów przez receptor TLR4 i pozwalają na powiązanie internalizacji aktywowanego receptora TLR4 z klasyczną endocytozą receptorową (patrz **Tabela 3.1**). Silne hamowanie produkcji chemokiny RANTES przez dynasor było zgodne z wcześniejszymi wynikami wykazującymi, że uruchomienie ścieżki zależnej od TRIF wiąże się z endocytozą aktywowanego TLR4. Uważa się, że proces ten skorelowany jest z dysocjacją tandemu adaptorów TIRAP-MyD88 od domen TIR receptora, co stwarza możliwość interakcji z nimi kolejnej pary adaptorów – TRAM i TRIF. Czynnikiem kontrolującym asocjację/dysocjację pierwszej pary adaptorów TIRAP-MyD88 z receptorem TLR4 wydaje się być wysoki poziom PI(4,5)P₂ w błonie komórkowej. Spadek poziomu PI(4,5)P₂ w błonie endosomów prowadzi do uwolnienia białek TIRAP i MyD88. Asocjacja drugiej pary adaptorów TRAM-TRIF z receptorem TLR4 w błonie endosomów jest z kolei ułatwiona przez mirystoilację białka TRAM [102, 269, 270].

Inkubacja komórek z dynasorem i pitstop-2 wywierała negatywny wpływ nie tylko na produkcję RANTES, ale też na produkcję TNF α , która aktywowana jest na ścieżce MyD88-zależnej i nie powinna zależeć od internalizacji TLR4. Należy jednak pamiętać, że na ścieżce zależnej od TRIF również dochodzi do aktywacji (późnej) czynnika transkrypcyjnego NF κ B, kontrolującego ekspresję genu kodującego TNF α , dlatego też wyłączenie tej ścieżki może znaleźć odbicie w niższej produkcji TNF α (patrz 3.2.4.2). Z drugiej strony, nasza analiza poziomu receptora TLR4 na powierzchni komórek oraz całkowitej ilości tego białka w komórkach poddanych działaniu dynasoru wskazuje, że w tych warunkach LPS przyspiesza zanikanie TLR4 z powierzchni komórek i degradację receptora (**Ryc. 6.16**). Te efekty mogą prowadzić do osłabienia odpowiedzi prozapalnej na obu ścieżkach sygnałowych receptora TLR4. Wynik ten jest sprzeczny z doniesieniami Kagana i współpracowników [102], według których inkubacja makrofagów mysich pochodzących ze szpiku kostnego z dynasorem przeciwdziałała internalizacji TLR4, utrzymując jego stały poziom na powierzchni komórek poddanych działaniu LPS. W chwili obecnej nie potrafimy wyjaśnić przyczyn tej sprzeczności. Niemniej jednak

wykazaliśmy, że nadprodukcja nieaktywnej enzymatycznie dynaminy-2 K44A także prowadziła do obniżenia poziomu TLR4 w komórkach RAW264, nawet bez ich stymulacji przez LPS (**Ryc. 6.16**). Wyniki badań z użyciem dynasoru i zmutowanej dynaminy, aczkolwiek wstępne, sugerują, że ingerencja w ścieżkę endocytozy zależnej od dynaminy sprzyja degradacji receptora. Może to wynikać z „przekierowania” receptora TLR4 ze ścieżki endocytozy zależnej od dynaminy i klatryny, na inną, sprzyjającą jego intensywnej degradacji. Istnieją nieliczne dane wskazujące, że tego typu „niekanoniczna” endocytoza ułatwia degradację proteolityczną receptora EGF oraz TGF- β . Receptory te pobierane w obrębie pęcherzyków opłaszczonych przez klatrynę aktywują komórki, podczas gdy pobrane drogą alternatywną (zależną od kaweoli w przypadku receptora TGF- β) ulegają wzmożonej degradacji [271, 272].

Znamienne jest również, że żaden ze stosowanych inhibitorów endocytozy dynamino- i klatryno-zależnej nie zahamował internalizacji wysokiego stężenia lipopolisacharydu; wręcz przeciwnie, w ich obecności obserwowany był prawie 30% wzrost pobierania 1000 ng/ml LPS-AF488 przez komórki (**Ryc. 6. 14**). Potwierdza to, że ścieżka detoksykacyjna lipopolisacharydu nie jest zależna od klatryny i dynaminy i nie wymaga udziału TLR4. Co więcej, wyniki te stanowią pierwszą poszlakę, że obie ścieżki internalizacji LPS są ze sobą powiązane i podlegają wzajemnej regulacji.

Internalizacja wysokich stężeń LPS. Internalizacja wysokiego stężenia, 1000 ng/ml, LPS-AF488 przez komórki J774 była hamowana o około 70-80% w obecności siarczanu dekstranu, kompetycyjnego inhibitora blokującego wiązanie LPS do receptorów zmiataczy. Podobnie silnie internalizacja była hamowana przez przeciwciało 4C1, uniemożliwiające wiązanie LPS do CD14 (**Ryc. 6.12 A i 6.17 A**). Przy tak znacznej redukcji internalizacji LPS przez oba czynniki można założyć, że CD14 i receptory zmiatacze nie są w stanie wzajemnie kompensować swojego udziału w internalizacji LPS i prawdopodobnie współpracują ze sobą w tym procesie.

CD14. Na udział białka CD14 w internalizacji LPS wskazywały wspomniane już wcześniej wyniki badania nad pobieraniem LPS przez transfekowane komórki THP-1 wyrażające CD14 [97]. Z drugiej strony, pobieranie LPS przy udziale receptorów zmiataczy zachodzi także w komórkach bez ekspresji CD14, takich jak komórki endotelialne [179, 183]. Wydaje się więc zasadne wnioskować, że opisany w niniejszej pracy mechanizm internalizacji wysokich stężeń LPS wymagający współpracy CD14 i receptorów zmiataczy jest typowy dla komórek takich jak makrofagi, wyposażonych w CD14 i receptory zmiatacze. Sugestię tę popierają wyniki prac prowadzonych na

monocytach izolowanych z myszy pozbawionych ekspresji CD14, w których internalizacja LPS była silnie upośledzona [179].

Internalizacja 1000 ng/ml LPS przez komórki J774 w znacznym stopniu uzależniona była też od obecności białek surowicy. Pobieranie LPS było zredukowane o około 70% podczas stymulacji komórek w pożywce pozbawionej FBS (Ryc. 6.18 A); blokowanie wiązania LPS do CD14 w tych warunkach nie przynosiło już dalszego spadku internalizacji LPS. Śladowe wiązanie i internalizacja LPS obserwowane bez udziału białek surowicy i CD14 zachodzić może przy udziale wybranych receptorów zmiataczy klasy A, zdolnych wiązać agregaty LPS bądź innych białek, takich jak integryny [173]. Wśród białek surowicy decydującą rolę w ułatwianiu internalizacji wysokich stężeń LPS ma prawdopodobnie LBP, na co wskazuje wspomniana wcześniej rola w białka CD14 – głównego akceptora LPS związanego z białkiem LBP w surowicy [76]. W tym świetle, w komórkach takich jak J774 mniejszą rolę w internalizacji endotoksyny wydaje się mieć bezpośrednia interakcja LPS z receptorami zmiataczami, potencjalnie ułatwiona przez asocjację LPS z lipoproteinami obecnymi w surowicy [184, 185]. Podobnie, inkubacja LPS z albuminą, zdolną ułatwiać transport LPS do receptora Cla-1, receptora zmiatacza klasy B [62], nie umożliwiała efektywnej internalizacji LPS. Wyniki naszych badań zgodne są z koncepcją, że wiązanie LPS przez CD14 wymaga uprzedniego utworzenia kompleksu lipopolisacharydu z LBP w surowicy [79, 273]. Związane przez CD14 monomery LPS mogą następnie trafić do receptorów zmiataczy.

Bardzo dobrze udokumentowany jest udział białek LBP i CD14 w aktywacji komórek przez LPS (patrz 3.2.3.2 oraz [92-94]). Badania prowadzone na myszach pozbawionych ekspresji CD14 wykazały, że udział CD14 jest niezbędny, aby uruchomić produkcję cytokin prozapalnych na obu ścieżkach sygnalizacyjnych receptora TLR4 w odpowiedzi na iniekcję LPS chemotypu „gładkiego”, używanego także w naszych doświadczeniach [68]. Szczegółowe prace prowadzone na hodowlach makrofagów i komórek dendrytycznych wyizolowanych z myszy oraz na komórkach HEK293 transfekowanych cDNA obu receptorów LPS ujawniły, że przy stężeniu powyżej 100 ng/ml „gładki” LPS jest w stanie częściowo aktywować TLR4 bez udziału CD14 prowadząc do uruchomienia produkcji cytokin na ścieżce sygnałowej zależnej od MyD88 [95, 274]. Udział CD14 wydaje się jednak niezbędny do uruchomienia drugiej ze ścieżek sygnałowych receptora TLR4, zależnej od udziału białka adaptorowego TRIF [68, 95]. Te zależności potwierdziły prace prowadzone równoległe w naszej Pracowni, które ujawniły, że blokowanie wiązania LPS do białka CD14 prowadzi do około 80% hamowania produkcji TNF α stymulowanej przez

10 ng/ml LPS, mniejszego hamowania (około 35%) w obecności 100 ng/ml LPS oraz bardzo wyraźnego, 50-70% hamowania produkcji chemokiny RANTES niezależnie od stężenia LPS użytego do stymulacji komórek (dane nie prezentowane).

Udział białka CD14 zarówno w aktywacji odpowiedzi prozapalnej komórek J774 przez LPS jak i „niesygnalowej” internalizacji wysokich stężeń tej endotoksyny pozwala umieścić CD14 w centrum interakcji pomiędzy receptorem TLR4 i receptorami zmiataczami. Przypuszczamy, że po związaniu LPS CD14 przenosi endotoksynę na TLR4, a jej nadmiar na receptory zmiatacze. Kiedy wiązanie LPS do receptorów zmiataczy jest blokowane, na przykład w obecności siarczanu dekstranu, zwiększona aktywacja TLR4 może powodować silny wzrost produkcji TNF α i RANTES, sięgający, odpowiednio, 75% i 100% (patrz Ryc. 6.19).

Receptory zmiatacze. Silne zahamowanie internalizacji wysokiego stężenia (1000 ng/ml) LPS w obecności siarczanu dekstranu wskazuje na udział receptorów zmiataczy w internalizacji dużych dawek tej endotoksyny. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi danymi wskazującymi na udział tych receptorów w neutralizacji LPS [180, 182]. Na szczególną uwagę zasługują nasze wyniki, które wskazują, że zablokowanie wiązania LPS do receptorów zmiataczy w obecności siarczanu dekstranu prowadzi do wzmożenia produkcji TNF α i RANTES (patrz Ryc. 6.19). Są one kolejną wskazówką, że w komórkach J774 szlak „niesygnalowej” internalizacji wysokich stężeń LPS jest powiązany zwrotnie ze ścieżkami aktywującymi odpowiedź prozapalną.

Pozytywny wpływ siarczanu dekstranu na produkcję cytokin prozapalnych może być skutkiem kilku zjawisk, które należy wziąć pod uwagę podczas analizy wyników. Pierwszym jest możliwe zanieczyszczenie siarczanu dekstranu endotoksyną bądź innymi produktami bakteryjnymi o aktywności prozapalnej [275]. Druga możliwość to potencjalna zdolność siarczanu dekstranu do tworzenia kompleksów z LPS i ułatwienia jego transportu do receptora TLR4. Zastosowane kontrole pozwalają jednak z dużą dozą pewności wykluczyć wpływ tych efektów na obserwowane zjawiska. Nie stwierdzono istotnie podwyższonej produkcji cytokin przez komórki inkubowane z siarczanem dekstranu bez lipopolisacharydu, ani też inkubowane z analogiem strukturalnym tego inhibitora, siarczanem chondroityny (patrz Ryc. 6.19). Można zatem stwierdzić, że podwyższona aktywacja komórek w obecności siarczanu dekstranu jest skutkiem hamowania wiązania lipopolisacharydu do receptorów zmiataczy, co może intensyfikować przenoszenie lipopolisacharydu z CD14 na TLR4.

Dane literaturowe wskazują na kilka receptorów zmiataczy z klasy B, które mogą być zaangażowane w te procesy, m.in. CD36, LIMP-2 i SR-B1 (oraz jego ludzki ortolog, Cla-1). Należy jednak zauważyć, że białkom tym przypisuje się także udział w fagocytozie bakterii i generacji sygnału prozapalnego [62, 64, 276, 277]. Receptor CD36 współwystępuje z białkiem CD14 w czasie stymulacji komórek lipopolisacharydem, na co wskazuje analiza wykonana za pomocą techniki rezonansowego przeniesienia energii fluorescencji (FRET), a zatem CD36 może być potencjalnym „partnerem” CD14 w pobieraniu LPS [278]. Kierując się tą przesłanką przeprowadziliśmy wstępne badania przy użyciu przeciwciała blokującego wiązanie LPS do CD36 i nie stwierdziliśmy zahamowania internalizacji 1000 ng/ml LPS-AF488 w jego obecności (dane nie prezentowane). Ponadto, w odniesieniu do CD36 i receptora SR-B1/Cla-1 istnieją dane wskazujące, że receptory te aktywują odpowiedź prozapalną w wyniku stymulacji przez LPS, niezależnie od TLR4 [64, 276]; podobnie, LIMP-2 wydaje się promować odpowiedź prozapalną na infekcję makrofagów przez *Listeria monocytogenes* [277]. Taka autonomiczna, prozapalna aktywność wymienionych receptorów nie była obserwowana w toku przeprowadzanych przez nas doświadczeń. Nie bez znaczenia jest też fakt, że CD36 nie wiąże siarczanu dekstranu i związek ten nie jest preferowanym ligandem dla receptorów zmiataczy klasy B [279].

Podążając tym tropem, receptorów odpowiedzialnych za internalizację wysokich stężeń LPS przez komórki J774 należy poszukiwać wśród receptorów o udokumentowanym wiązaniu siarczanu dekstranu. Należą do nich receptory zmiatacze klasy A, a także receptor LOX-1 (ang. *lectin-type oxidized LDL receptor 1*), SREC-1 (ang. *scavenger receptor expressed by endothelial cell-1*) i SR-PSOX/CXCL16 (ang. *scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein/chemokine (C-X-C motif) ligand 16* z klasy E, F i G receptorów zmiataczy [63, 258, 280]. Badania prowadzona w naszej Pracowni wykazały, że przeciwciała neutralizujące SR-PSOX znosiło częściowo pozytywne działanie siarczanu dekstranu wywierane na produkcję TNF α stymulowaną przez 100 ng/ml LPS [280].

Szczególnie interesujące wydają się doniesienia, które opisują interakcje receptorów TLR ze zmiataczami klasy A, głównie z SR-A1 (CD204) i MARCO (ang. *macrophage receptor with collagenous structure*), odpowiedzialnymi m.in. za niezależną od opsonin fagocytozę bakterii i innych cząstek przez makrofagi i komórki dendrytyczne [275, 281, 282]. Większość dostępnych danych sugeruje udział obu tych receptorów w regulacji odpowiedzi prozapalnej stymulowanej przez ligandy receptorów TLR. Udział obu tych

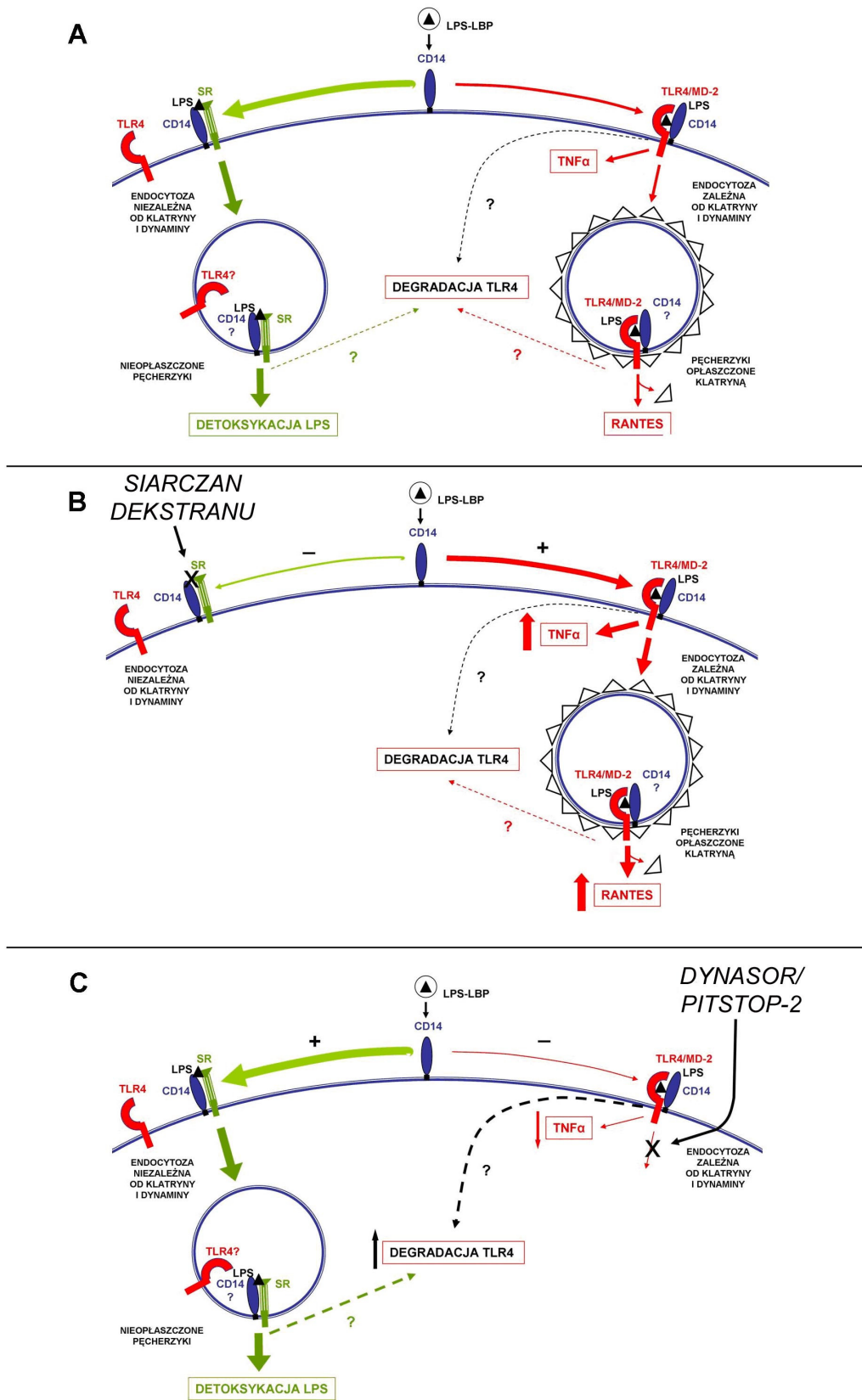
receptorów jest jednak inny, pomimo strukturalnego podobieństwa i zdolności do wiązania tych samych ligandów przez SR-A i MARCO [283]. Receptor MARCO zdaje się współuczestniczyć w produkcji cytokin prozapalnych stymulowanej przez LPS oraz dwumykolan trehalozy, składnik ściany komórkowej *Mycobacterium tuberculosis*; w tym drugim przypadku współdziałając z receptorami CD14 i TLR2 [283, 284]. Makrofagi izolowane z myszy pozbawione ekspresji MARCO produkowały mniej IL-12 w odpowiedzi na stymulację LPS, a także mniej TNF α , IL-6 i IL-1 β w odpowiedzi na stymulację przez dwumykolan trehalozy [284]. Natomiast dane dotyczące udziału receptora SR-A1 w aktywacji makrofagów sugerują raczej jego rolę przeciwną do roli receptora MARCO, przypisując SR-A funkcję negatywnego regulatora reakcji prozapalnej. W makrofagach SR-A1^{-/-} i organizmach myszy SR-A1^{-/-} obserwowano bowiem zwiększoną produkcję TNF α oraz IL-6 i IL-12 [283, 285, 286]; podobne efekty wykryto również w komórkach dendrytycznych [287]. Bazując na tych spostrzeżeniach receptorowi SR-A można przypisać rolę protekcyjną wobec nadmiernej stymulacji komórek przez LPS, która wynika ze zdolności SR-A do internalizacji wysokich stężeń LPS; taka też była interpretacja roli SR-A proponowana przez innych badaczy [182, 285, 288, 289]. Między innymi, Mukhopadhyay i współautorzy na podstawie badań prowadzonych na myszach SR-A1^{-/-} i MARCO^{-/-} postulują, że receptory te ograniczają generację sygnału prozapalnego przez receptory TLR4, ponieważ promują internalizację LPS i fagocytozę bakterii Gram-ujemnych [289]. Ostatnie badania przeżywalności myszy pozbawionych ekspresji SR-A i MARCO zwracają jednak uwagę, że rola tych receptorów w regulacji odpowiedzi na LPS może się zmienić z protekcyjnej na promującą odpowiedź prozapalną wraz z rozwojem infekcji bakteryjnej [288].

W trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy ukazała się praca Yu i współautorów [286], w której udokumentowano zwiększoną produkcję TNF α oraz IL-1 β w komórkach stymulowanych lipopolisacharydem w obecności fukoidanu, innego związku wiążącego się preferencyjnie z receptorami zmiataczami klasy A [290]. Dane te pokrywają się z naszymi obserwacjami efektów działania siarczanu dekstranu na stymulowaną przez LPS produkcję TNF α i chemokiny RANTES (patrz **Ryc. 6.19**). Wskazują one, że blokowanie interakcji LPS z SR-A upośledza neutralizację wysokich stężeń endotoksyny prowadząc do wzmożonej odpowiedzi prozapalnej makrofagów. Warto podkreślić, że w przytoczonych pracach nie analizowano czy „wykluczenie” receptorów zmiataczy istotnie hamuje wiązanie i internalizację LPS przez komórki.

Nieliczne doniesienia wskazują na możliwość selektywnej regulacji jednej ze ścieżek sygnałowych receptora TLR4 przez SR-A1. Wyniki Seimona i współautorów sugerują, że receptor ten może hamować ścieżkę zależną od TRIF i w ten sposób promować apoptozę komórek [291]. Z drugiej strony, Yu i współautorzy [292] wykazali hamowanie aktywacji NF κ B przez receptor SR-A1 na ścieżce zależnej od MyD88 poprzez interakcję tego receptora z białkiem TRAF6. W naszym doświadczeniach nie zaobserwowaliśmy, aby wiązanie siarczanu dekstranu do komórek wpływało preferencyjnie na którąś ze ścieżek sygnałowych receptora TLR4. Obecność tego związku wzmacniała produkcję zarówno TNF α jak i RANTES (**Ryc. 6.19**), sugerując, że wpływ siarczanu dekstranu dotyczy jednego z pierwszych etapów aktywacji receptora TLR4. Biorąc pod uwagę upośledzone wiązanie LPS do receptorów zmiataczy w obecności siarczanu dekstranu uważamy, że efekt jego działania może polegać na zahamowaniu internalizacji LPS (ścieżka „niesygnałowa”) i przekierowaniu większej puli endotoksyny z CD14 na receptor TLR4.

Współdziałanie receptorów zmiataczy z TLR4 i CD14 w odpowiedzi na LPS.

Schemat z ryciny 7.1 przedstawia proponowany przez nas model współdziałania receptorów zmiataczy z receptorami TLR4 i CD14 w odpowiedzi komórek J774 na LPS. Uważamy, że receptory zmiatacze wpływają hamująco na aktywację odpowiedzi prozapalnej komórek poprzez indukowanie internalizacji wysokich stężeń LPS i ograniczenie dostępności endotoksyny dla receptora sygnałowego - TLR4. Przemawia za tym wspomniany już wyżej wpływ siarczanu dekstranu na produkcję TNF α i RANTES, a zatem brak jego selektywności wobec ścieżek sygnałowych receptora TLR4. Białko CD14 jest kluczowym czynnikiem utrzymującym w równowadze odpowiedź prozapalną zależną od udziału TLR4 i wyciszającą tę reakcję internalizację LPS, która angażuje receptory zmiatacze (**Ryc. 7.1 A, C**). Udział CD14 umożliwia jednocześnie modulowanie zależności tych dwóch procesów w odpowiedzi na zmieniające się stężenia lipopolisacharydu w środowisku. W proponowanym scenariuszu, CD14 przekazuje preferencyjnie obecny w niewielkich ilościach w środowisku LPS na receptor TLR4, zapewniając inicjację odpowiedzi prozapalnej. Użycie inhibitorów endocytozy dynamino- i klatryno-zależnej hamuje generację sygnału na ścieżce zależnej od TRIF, sprzyjając internalizacji LPS przez receptory zmiatacze. Zauważalna w tych warunkach degradacja TLR4 także może ułatwiać zwiększony transfer LPS z CD14 na receptory zmiatacze i promować pobieranie endotoksyny przez komórki na drodze „niesygnałowej” (**Ryc. 7.1 C**). Wraz z pojawieniem się w środowisku wyższego stężenia LPS jego nadmiar zostaje w coraz większym stopniu przekazywany z CD14 na receptory zmiatacze, co prowadzi do usuwania i detoksykacji



Ryc. 7.1. Współdziałanie CD14, TLR4 i receptorów zmiataczy (SR) w regulacji odpowiedzi komórek na lipopolisacharyd. **A** – stymulacja komórek przez wysokie stężenie LPS; **B** – pozytywny wpływ siarczanu dekstranu na produkcję TNF α i RANTES; **C** – zahamowanie produkcji cytokin pod wpływem inhibitorów endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy. Szczegółowy opis w tekście.

? - Udział różnych szlaków internalizacji i degradacji receptora TLR4 jest prawdopodobny, ale niustalony. Również obecność CD14 w pęcherzykach opłaszczonych przez klatrynę oraz CD14 i TLR4 w pęcherzykach zawierających LPS jest obecnie niepotwierdzona.

endotoksyny. Jest prawdopodobne, że aktywują się wtedy również inne mechanizmy negatywnej regulacji odpowiedzi prozapalnej, opisane we Wstępie do niniejszej pracy. Do takich mechanizmów należy wykryta przez nas aktywacja sfingomielinaz i generacja ceramidu, prowadząca do zahamowania produkcji TNF α . Zjawiskiem sprzyjającym wyciszaniu odpowiedzi prozapalnej jest także zanikanie receptorów TLR4 i CD14 z powierzchni komórek stymulowanych przez LPS z jednoczesnym spadkiem całkowitej ilości TLR4 w komórkach, prawdopodobnie w wyniku wewnątrzkomórkowej proteolitycznej degradacji receptora. Redukcja ilości CD14 na powierzchni komórek może być też wynikiem uwalniania tego białka z błony komórkowej do środowiska (ang. shedding), aczkolwiek ten aspekt był pominięty w naszych badaniach. Obniżanie poziomu TLR4 i CD14 na powierzchni błony komórkowej obserwowaliśmy przede wszystkim w komórkach poddanych działaniu wyższych stężeń LPS, które angażowały też receptory zmiatacze. Ta korelacja może sugerować, że TLR4 i CD14 internalizowane są w kompleksie z receptorami zmiataczami i LPS, i ta droga internalizacji sprzyja ich degradacji. Odwrotne zjawisko – podnoszenie się poziomu CD14 i TLR4 na powierzchni komórek wykryliśmy w komórkach poddanych działaniu siarczanu dekstranu (patrz **Ryc. 6.20**). Obserwacje te potwierdzają istnienie związku pomiędzy aktywnością receptorów zmiataczy i internalizacją TLR4 i CD14. Naruszenie tego związku może prowadzić do nagromadzenia TLR4 i CD14 na powierzchni komórek w wyniku „recyklingu” tych receptorów do błony komórkowej z kompartmentów wewnątrzkomórkowych [126, 162]. Pozytywny wpływ siarczanu dekstranu na produkcję TNF α i RANTES może zatem być sumarycznym skutkiem większej dostępności LPS dla TLR4 jak i wyższego poziomu receptorów TLR4 i CD14 na powierzchni komórek.

7.2. Obniżanie ekspresji TLR4 i CD14 na powierzchni komórek jako mechanizm ograniczania nadmiernej aktywacji makrofagów

Badania mikroskopowe uchwyciły współwystępowanie receptora CD14 i TLR4 w komórkach stymulowanych przez LPS i wskazały jednocześnie na dużą dynamikę tej interakcji. Zarówno w badaniach mikroskopowych jak i cytometrycznych zauważalny był ubytek TLR4 z powierzchni komórek poddanych działaniu 1000 ng/ml LPS. Towarzyszyła mu redukcja powierzchniowego poziomu CD14, choć istotna tylko w komórkach adherentnych.

Bazując na tych wynikach oraz danych literaturowych dotyczących przemieszczania się receptorów TLR4 i CD14 pomiędzy błoną komórkową a organellami

wewnątrzkomórkowymi [126, 162, 293], można wnioskować, że zmiana ekspresji i lokalizacji tych receptorów na powierzchni komórek jest istotnym mechanizmem regulującym odpowiedź komórek na stymulację lipopolisacharydem. Interesujące jest, że poziom CD14 wykazuje słabszy i powolniejszy spadek w odpowiedzi na wysokie stężenie LPS niż TLR4. Koreluje to z postulowaną rolą białka CD14 w internalizacji i detoksykacji endotoksyny (patrz 7.1). W przypadku TLR4, komórki prawdopodobnie utrzymują równowagę pomiędzy błonową pulą receptora rozpoznającą lipopolisacharyd w środowisku i zlokalizowaną wewnątrzkomórkowo pulą TLR4, która może służyć rozpoznawaniu endotoksyny fagocytowanych bakterii [134]. Uznaje się, że niewielka powierzchniowa ekspresja TLR4 jest czynnikiem ograniczającym odpowiedź prozapalną [263, 264]; zmniejszanie błonowej populacji tego receptora w obecności wysokiego stężenia LPS może być zatem efektywną strategią ograniczenia nadmiernej aktywacji komórek.

Niemniej jednak, wyniki dotychczasowych badań na temat zmian poziomu TLR4 i CD14 na powierzchni komórek przynosiły sprzeczne wyniki. W wielu przypadkach badania te nie pozwoliły na stwierdzenie zmian poziomu powierzchniowego TLR4 pod wpływem stymulacji LPS. Zmian tych nie wykryto w serii doświadczeń przeprowadzonej przez Medvedeva i współpracowników na komórkach linii HEK293 i CHO wyrażających TLR4, CD14 i MD-2, a także w ludzkich monocytach i makrofagach płucnych [294-296]. Podobne wyniki przyniosły badania nad poziomem CD14 prowadzone na linii ludzkich komórek THP-1 oraz ludzkich monocytach i makrofagach płucnych [165, 297-299]. Istnieje jednak równie pokaźna liczba danych wskazujących na obniżanie poziomu powierzchniowego TLR4 w odpowiedzi różnorodnych komórek na stymulację LPS [129, 300-302]. Ustalono, że TLR4 internalizowany w komórkach stymulowanych przez LPS ulega degradacji lizosomalnej, z udziałem GTPazy Rab7b [137] i proteosomalnej, zależnej od białek Hrs i Triad3A [129].

Źródeł tych rozbieżności można się doszukiwać w odmiennych modelach komórkowych stosowanych w badaniach, różnych stężeniach, chemo- i serotypach używanego lipopolisacharydu oraz innych warunkach w przeprowadzaniu doświadczeń. Dodatkowy problem stanowi trudność detekcji powierzchniowego receptora TLR4, ze względu na jego niski poziom. W tym kontekście opracowana technika detekcji powierzchniowego TLR4 przy użyciu izotopowo znakowanych przeciwciał stwarza możliwości analizy poziomu TLR4 w komórkach o niskiej ekspresji tego receptora.

7.3. Udział sfingolipidów w regulacji odpowiedzi komórek na LPS

Nasza badania wykazały, że wyciszenie ekspresji genów kodujących kwaśną i neutralną sfingomielinazę oraz użycie inhibitorów tych enzymów istotnie zwiększało produkcję TNF α przez komórki J774. Sfingomielinazy są enzymami katalizującymi hydrolizę sfingomieliny do ceramidu i fosfocholiny. Hydroliza sfingomieliny jest głównym źródłem ceramidu w komórce, mniejsze ilości tego lipidu powstają w wyniku syntezy *de novo*. Największe ilości sfingomieliny w komórce zlokalizowane są w błonie komórkowej, z czego około 80% w jej zewnętrznej warstwie [167, 304]. W czasie aktywacji niektórych receptorów błony komórkowej, lub pod wpływem czynników fizycznych (np. ultrafioletu), aktywacji ulega kwaśna i/lub neutralna sfingomielinaza (ASMaza i NSMaza), co prowadzi do generacji ceramidu w obu listkach błony komórkowej [305]. Ceramid zlokalizowany po stronie cytoplazmatycznej błony kontroluje aktywność wybranych enzymów, takich jak fosfatazy PP1 i PP2A oraz niektóre izoformy kinazy białkowej C. Sfingomielina zewnętrznego listka błony komórkowej jest substratem dla niewielkiej puli kwaśnej sfingomielinazy przenoszonej na powierzchnię aktywowanych komórek. Z uwagi na topografię, aktywność biologiczna ceramidu zewnętrznej warstwy błony komórkowej interpretowana jest jako efekt wywierany przez ten lipid na organizację składników błony komórkowej – ich mikroagregację w płaszczyźnie błony, lub wymuszoną inwaginację błony [167, 306]. Stwierdziliśmy, że stymulacja komórek przez LPS prowadzi do wzrostu poziomu ceramidu w komórkach, w tym do pojawienia się ceramidu w zewnętrznej warstwie błony komórkowej (**Ryc. 6.2**). Wzrost całkowitego poziomu ceramidu był jednak umiarkowany (18-27%), co odpowiada wcześniejszym danym [307]. Powolny i znaczny - kilkukrotny - wzrost poziomu ceramidu notuje się w komórkach ulegających apoptozie [167]. Zahamowanie aktywności neutralnej jak i kwaśnej sfingomielinazy prowadziło do wzrostu produkcji TNF α stymulowanej przez LPS (**Ryc. 6.3 i 6.4**), a zatem oba te enzymy uczestniczyły w generacji ceramidu kontrolującego ten proces.

Wzrost poziomu TNF α towarzyszący dezaktywacji ASMazy i NSMazy wskazuje, że ceramid powstający przy udziale tych enzymów jest negatywnym regulatorem produkcji tej cytokiny w komórkach stymulowanych przez LPS. Przeciwnie, dezaktywacja ASMazy (ale nie NSMazy) hamowała produkcję RANTES, wskazując, że pula ceramidu powstająca dzięki ASMazie jest wymagana do powstania i uwolnienia tej chemokiny z komórki. Zaobserwowanie zahamowania produkcji RANTES wymagało znacznego obniżenia aktywności ASMazy, co osiągnęto poddając komórki działaniu imipraminy, inhibitora tego enzymu. Zjawisko to nie było wykrywane w komórkach, w których aktywność ASMazy

eliminowano w mniejszym stopniu poprzez wyciszenie jego ekspresji (Ryc. 6.3 i 6.4., [268]), zapewne ze względu na mniejszą efektywność tego procesu. Ceramid obniżał też produkcję MIP-2, innej chemokiny produkowanej, podobnie jak TNF α , na ścieżce zależnej od MyD88 [268]. Obserwacje te mogą sugerować, że ceramid, a przynajmniej jego pula generowana przez ASMazę, kontroluje procesy decydujące o „przełączaniu” aktywacji receptora TLR4 ze ścieżki zależnej od MyD88 na szlak niezależny do tego białka. Procesem takim może być klatryno-zależna endocytoza aktywowanego receptora TLR4. Zgodnie z tym założeniem wykazano ostatnio, że generacja ceramidu przez ASMazę warunkuje wnikanie receptora transferyny do dołków opłaszczonych przez klatrynę. Wyciszenie ekspresji tego enzymu i działanie imipraminy indukowało bowiem asocjację receptora transferyny z tratwami lipidowymi [308]. Ponadto, wzrost poziomu komórkowego ceramidu w wyniku ingerencji w metabolizm tego lipidu prowadził do szybkiego zanikania TLR4 z powierzchni komórek stymulowanych przez LPS [309]. Badania te sugerują, że ceramid powstający w zewnętrznej warstwie błony komórkowej w wyniku działania ASMazy może ułatwiać wnikanie TLR4 do dołków opłaszczonych przez klatrynę.

Wydaje się, że przeciwny efekt aktywności ASMazy wywierany na produkcję TNF α /MIP-2 i RANTES nie jest jednak skutkiem prostego przesunięcia równowagi w kierunku jednego z tych procesów przez ceramid. Sugestia taka wynika ze skomplikowania procesów metabolizmu ceramidu w komórce. Ceramid może ulegać fosforylacji lub być hydrolizowany do sfingozyny, która z kolei jest fosforylowana do sfingozyno-1-fosforanu; pochodne ceramidu wywierają często efekty biologiczne przeciwstawne do efektów działania samego ceramidu. Badania prowadzone w naszej pracowni wykazały, że fosforan ceramidu hamuje produkcję TNF α , ale już nie chemokiny MIP-2 [310]. Doniesienia literaturowe wskazują na hamujący wpływ wywierany przez ceramid generowany przez ASMazę na etapie potranslacyjnych modyfikacji i sekrecji TNF α [171].

W niniejszej pracy wstępnie scharakteryzowaliśmy ścieżkę internalizacji wysokich stężeń LPS. Wyróżniała ją wrażliwość na działanie egzogennej bakteryjnej sfingomielinazy, jak również zależność od stopnia spolimeryzowania aktyny. Uważa się, że niektóre procesy internalizacji zachodzące bez udziału klatryny i dynaminy kontrolowane są przez poziom sfingomieliny w błonie komórkowej [212]. Cechy wykryte przez nas w odniesieniu do procesu internalizacji wysokich stężeń LPS wykazuje internalizacja cząstek kontrolowana przez białko Cdc42 (Tabela 3.1), ale pełna charakterystyka tego procesu wymaga dodatkowych badań.

8. Podsumowanie i wnioski

1. LPS indukuje produkcję cytokin prozapalnych przez komórki J774 na ścieżce zależnej i niezależnej od MyD88 z odmienną dynamiką: produkcja cytokiny TNF α , powstającej na ścieżce zależnej od MyD88, osiąga szczyt po 4 godzinach stymulacji komórek przez niższe stężenia LPS (10-50 ng/ml). Dłuższa stymulacja oraz obecność wyższych stężeń LPS (100-1000 ng/ml) prowadzą do zahamowania produkcji TNF α przez komórki, wskazując na włączające się w tych warunkach mechanizmy negatywnie regulujące ten szlak sygnałowy receptora TLR4. Natomiast produkowana na ścieżce niezależnej od MyD88 chemokina RANTES wydzielana jest do środowiska z opóźnieniem w porównaniu z TNF α ; jej poziom osiągał plateau przy około 100 ng/ml LPS, ale podnosił się wraz z czasem stymulacji komórek.

2. Nasze badania wykazały, że jednym z czynników negatywnie regulujących produkcję TNF α jest ceramid, powstający w wyniku hydrolizy sfingomieliny przez kwaśną i neutralną sfingomielinazę. Wyciszenie ekspresji genów kodujących te enzymy, a także działanie ich inhibitorów w sposób istotny zwiększało ilość TNF α uwalnianego przez stymulowane komórki (dane literaturowe sugerują, że ceramid hamuje potranslacyjne modyfikacje tego białka). Przeciwnie, silne obniżenie aktywności kwaśnej sfingomielinazy w wyniku działania imipraminy, inhibitora tego enzymu, prowadziło do zahamowania produkcji chemokiny RANTES. Ceramid może regulować produkcję RANTES ułatwiając endocytozę receptora TLR4, która warunkuje uruchomienie z błony endosomów ścieżki sygnałowej niezależnej od MyD88.

3. Badania immunofluoresencyjne wykazały, że rozmieszczenie i ilość receptorów LPS - CD14 i TLR4 - na powierzchni aktywowanych komórek ulegały zmianom: receptory TLR4 i CD14 przemieszczały się w rejon krawędzi wiodącej aktywnych ruchowo komórek, gdzie współwystępowały. Współwystępowanie to było jednak przejściowe, wskazując na dużą dynamikę interakcji obu receptorów indukowaną przez LPS.

4. Zgodnie z wynikami obserwacji mikroskopowych analiza cytometryczna i radioizotopowa poziomu CD14 i TLR4 na powierzchni komórek wykazały, że stymulacja komórek wysokim stężeniem lipopolisacharydu, 1000 ng/ml, powoduje znaczny spadek poziomu powierzchniowego TLR4 (o 45%) i nieco mniejszy ubytek CD14 zauważalny już po 1-2 godzinach stymulacji. Efekt ten był skorelowany z obniżeniem całkowitej ilości TLR4 (o 30%) w komórkach. Wyraźną redukcję poziomu TLR4 i CD14 indukowała

wielogodzinna (około 18-godzinna) aktywacja komórek przez LPS. Efekt ten uwidaczniał się głównie w przypadku stymulacji komórek przez 100-1000 ng/ml LPS. Redukcja powierzchniowego i całkowitego poziomu TLR4 i CD14 może być zatem jednym z elementów wyciszających odpowiedź prozapalną komórek.

5. Duże stężenie LPS (1000 ng/ml) było pobierane przez komórki w sposób zależny od białka CD14 i receptorów zmiataczy. Proces ten nie wymagał jednak udziału receptora TLR4, co wskazuje, że nie indukował on odpowiedzi prozapalnej i służył neutralizacji LPS przez jego wewnątrzkomórkową detoksykację.

6. Zablockowanie wiązania LPS do receptorów zmiataczy przez kompetycyjny ligand (siarczan dekstranu) hamowało o 70% internalizację dużych stężeń LPS, ale jednocześnie prowadziło do dwukrotnego wzrostu ilości produkowanych w tych warunkach cytokin prozapalnych, TNF α i RANTES.

7. Wykryliśmy, że pod wpływem siarczanu dekstranu ilość receptorów CD14 i TLR4 na powierzchni komórek zwiększała się, co może przyczyniać się do intensyfikowania odpowiedzi prozapalnej w tych warunkach.

8. Inhibitory endocytozy zależnej od klatryny i dynaminy hamowały produkcję TNF α i chemokiny RANTES, wskazując na klatryno- i dynamino-zależną endocytozę jako istotną dla generacji sygnałów przez aktywowany receptor TLR4. Jednocześnie, zahamowanie tego szlaku endocytozy prowadziło do wzmożonego pobierania wysokich stężeń LPS przez komórki. Dane te ponownie wskazują na istnienie przeciwwagi szlaków aktywujących odpowiedź prozapalną komórek na LPS i procesu internalizacji dużych stężeń endotoksyny.

9. Nasze dane wskazują, że przeciwwaga odpowiedzi prozapalnej komórek i procesu neutralizacji dużych stężeń LPS może być podyktowana udziałem CD14 w obu tych zjawiskach. CD14 przekazuje LPS na TLR4, co uruchamia obie ścieżki odpowiedzi prozapalnej. Uruchomienie ścieżki sygnałowej niezależnej od MyD88 wymaga klatryno- i dynamino-zależnej endocytozy TLR4 wraz z „sygnałową” (niewielką) pulą LPS. Nadmiar LPS przekazywany jest natomiast z CD14 na receptory zmiatacze, które umożliwiają internalizację i detoksykację tej endotoksyny.

9. Spis literatury

1. Janeway, C.A., Jr. i R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
2. Medzhitov, R. i C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. Science, 2002. **296**(5566): p. 298-300.
3. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 1-5.
4. Satoh, T., H. Kato, Y. Kumagai, M. Yoneyama, S. Sato, K. Matsushita, T. Tsujimura, T. Fujita, S. Akira i O. Takeuchi, *LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1512-7.
5. Kumar, H., T. Kawai i S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol, 2011. **30**(1): p. 16-34.
6. Bortoluci, K.R. i R. Medzhitov, *Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR*. Cell Mol Life Sci, 2010.
7. Jeong, E. i J.Y. Lee, *Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors*. Yonsei Med J, 2011. **52**(3): p. 379-92.
8. Iwasaki, A. i R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
9. Schnare, M., G.M. Barton, A.C. Holt, K. Takeda, S. Akira i R. Medzhitov, *Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 947-50.
10. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart i J.A. Hoffmann, *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
11. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt i C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
12. Poltorak, A., X. He i Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton i B. Beutler, *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
13. Poltorak, A. i Smirnova, X. He, M.Y. Liu, C. Van Huffel, O. McNally, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, X. Du, P. Thompson, E.K. Chan, J. Ledesma, B. Roe, S. Clifton, S.N. Vogel i B. Beutler, *Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region*. Blood Cells Mol Dis, 1998. **24**(3): p. 340-55.
14. Roach, J.C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M.K. Purcell, K.D. Smith, L.E. Hood i A. Aderem, *The evolution of vertebrate Toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9577-82.
15. Pujol, N., E.M. Link, L.X. Liu, C.L. Kurz, G. Alloing, M.W. Tan, K.P. Ray, R. Solari, C.D. Johnson i J.J. Ewbank, *A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2001. **11**(11): p. 809-21.
16. Azumi, K., R. De Santis, A. De Tomaso i Rigoutsos, F. Yoshizaki, M.R. Pinto, R. Marino, K. Shida, M. Ikeda, M. Ikeda, M. Arai, Y. Inoue, T. Shimizu, N. Satoh, D.S. Rokhsar, L. Du Pasquier, M. Kasahara, M. Satake i M. Nonaka, *Genomic*

- analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". Immunogenetics, 2003. 55(8): p. 570-81.*
17. Imler, J.L. i L. Zheng, *Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(1): p. 18-26.
 18. Ausubel, F.M., *Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?* Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 973-9.
 19. Backhed, F., L. Meijer, S. Normark i A. Richter-Dahlfors, *TLR4-dependent recognition of lipopolysaccharide by epithelial cells requires sCD14.* Cell Microbiol, 2002. **4**(8): p. 493-501.
 20. Guillot, L., S. Medjane, K. Le-Barillec, V. Balloy, C. Danel, M. Chignard i M. Si-Tahar, *Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4.* J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2712-8.
 21. Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase i H. Takada, *Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines.* Mol Immunol, 2007. **44**(12): p. 3100-11.
 22. Jagavelu, K., C. Routray, U. Shergill, S.P. O'Hara, W. Faubion i V.H. Shah, *Endothelial cell toll-like receptor 4 regulates fibrosis-associated angiogenesis in the liver.* Hepatology, 2010. **52**(2): p. 590-601.
 23. Rolls, A., R. Shechter, A. London, Y. Ziv, A. Ronen, R. Levy i M. Schwartz, *Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis.* Nat Cell Biol, 2007. **9**(9): p. 1081-8.
 24. Mishra, B.B., U.M. Gundra i J.M. Teale, *Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis.* J Neuroinflammation, 2008. **5**: p. 53.
 25. Hasan, U., C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guiet, F. Briere, J. Vlach, S. Lebecque, G. Trinchieri i E.E. Bates, *Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88.* J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2942-50.
 26. Zhang, D., G. Zhang, M.S. Hayden, M.B. Greenblatt, C. Bussey, R.A. Flavell i S. Ghosh, *A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria.* Science, 2004. **303**(5663): p. 1522-6.
 27. Pifer, R., A. Benson, C.R. Sturge i F. Yarovinsky, *UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to Toxoplasma gondii.* J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3307-14.
 28. Watters, T.M., E.F. Kenny i L.A. O'Neill, *Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins.* Immunol Cell Biol, 2007. **85**(6): p. 411-9.
 29. Carty, M., R. Goodbody, M. Schroder, J. Stack, P.N. Moynagh i A.G. Bowie, *The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling.* Nat Immunol, 2006. **7**(10): p. 1074-81.
 30. Kawai, T. i S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
 31. O'Neill, L.A., *How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know.* Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 3-9.
 32. Tsan, M.F. i B. Gao, *Endogenous ligands of Toll-like receptors.* J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 514-9.
 33. Wagner, H., *Endogenous TLR ligands and autoimmunity.* Adv Immunol, 2006. **91**: p. 159-73.

34. Erridge, C., *Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?* J Leukoc Biol, 2010. **87**(6): p. 989-99.
35. Gay, N.J. i M. Gangloff, *Structure and function of Toll receptors and their ligands.* Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 141-65.
36. Kang, J.Y. i J.O. Lee, *Structural biology of the Toll-like receptor family.* Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 917-41.
37. Jin, M.S. i J.O. Lee, *Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes.* Immunity, 2008. **29**(2): p. 182-91.
38. Matsushima, N., T. Tanaka, P. Enkhbayar, T. Mikami, M. Taga, K. Yamada i Y. Kuroki, *Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors.* BMC Genomics, 2007. **8**: p. 124.
39. Kobe, B. i A.V. Kajava, *The leucine-rich repeat as a protein recognition motif.* Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(6): p. 725-32.
40. Jin, M.S., S.E. Kim, J.Y. Heo, M.E. Lee, H.M. Kim, S.G. Paik, H. Lee i J.O. Lee, *Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide.* Cell, 2007. **130**(6): p. 1071-82.
41. Kang, J.Y., X. Nan, M.S. Jin, S.J. Youn, Y.H. Ryu, S. Mah, S.H. Han, H. Lee, S.G. Paik i J.O. Lee, *Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer.* Immunity, 2009. **31**(6): p. 873-84.
42. Kim, H.M., B.S. Park, J.I. Kim, S.E. Kim, J. Lee, S.C. Oh, P. Enkhbayar, N. Matsushima, H. Lee, O.J. Yoo i J.O. Lee, *Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran.* Cell, 2007. **130**(5): p. 906-17.
43. Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake i M. Kimoto, *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.* J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1777-82.
44. Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto i K. Miyake, *Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution.* Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 667-72.
45. Kennedy, M.N., G.E. Mullen, C.A. Leifer, C. Lee, A. Mazzone, K.N. Dileepan i D.M. Segal, *A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4.* J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34698-704.
46. Resman, N., J. Vasl, A. Oblak, P. Pristovsek, T.L. Gioannini, J.P. Weiss i R. Jerala, *Essential roles of hydrophobic residues in both MD-2 and toll-like receptor 4 in activation by endotoxin.* J Biol Chem, 2009. **284**(22): p. 15052-60.
47. Weber, A.N., M.A. Morse i N.J. Gay, *Four N-linked glycosylation sites in human toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion.* J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34589-94.
48. Liu, L. i Botos, Y. Wang, J.N. Leonard, J. Shiloach, D.M. Segal i D.R. Davies, *Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA.* Science, 2008. **320**(5874): p. 379-81.
49. O'Neill, L., *The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence.* Biochem Soc Trans, 2000. **28**(5): p. 557-63.
50. Xu, Y., X. Tao, B. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J.L. Manley i L. Tong, *Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains.* Nature, 2000. **408**(6808): p. 111-5.
51. Underhill, D.M., A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti i A. Aderem, *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens.* Nature, 1999. **401**(6755): p. 811-5.

52. Park, B.S., D.H. Song, H.M. Kim, B.S. Choi, H. Lee i J.O. Lee, *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1191-5.
53. Ohto, U., K. Fukase, K. Miyake i Y. Satow, *Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa*. Science, 2007. **316**(5831): p. 1632-4.
54. Nunez Miguel, R., J. Wong, J.F. Westoll, H.J. Brooks, L.A. O'Neill, N.J. Gay, C.E. Bryant i T.P. Monie, *A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins*. PLoS One, 2007. **2**(8): p. e788.
55. Zhang, H., P.N. Tay, W. Cao, W. Li i J. Lu, *Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling*. FEBS Lett, 2002. **532**(1-2): p. 171-6.
56. Panter, G. i R. Jerala, *The ectodomain of the Toll-like receptor 4 prevents constitutive receptor activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(26): p. 23334-44.
57. Hasan, U.A., S. Dollet i J. Vlach, *Differential induction of gene promoter constructs by constitutively active human TLRs*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(1): p. 124-31.
58. Raetz, C.R., *Biochemistry of endotoxins*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 129-70.
59. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
60. Triantafilou, M. i K. Triantafilou, *Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster*. Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 301-4.
61. Fenton, M.J. i D.T. Golenbock, *LPS-binding proteins and receptors*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(1): p. 25-32.
62. Vishnyakova, T.G., A.V. Bocharov i N. Baranova, Z. Chen, A.T. Remaley, G. Csako, T.L. Eggerman i A.P. Patterson, *Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22771-80.
63. Pearson, A.M., *Scavenger receptors in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 20-8.
64. Baranova i N., R. Kurlander, A.V. Bocharov, T.G. Vishnyakova, Z. Chen, A.T. Remaley, G. Csako, A.P. Patterson i T.L. Eggerman, *Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7147-56.
65. Raetz, C.R. i C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.
66. Caroff, M., D. Karibian, J.M. Cavaillon i N. Haeffner-Cavaillon, *Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides*. Microbes Infect, 2002. **4**(9): p. 915-26.
67. Rittig, M.G., A. Kaufmann, A. Robins, B. Shaw, H. Sprenger, D. Gemsa, V. Foulongne, B. Rouot i J. Dornand, *Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of Brucella induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(6): p. 1045-55.
68. Jiang, Z., P. Georgel, X. Du, L. Shamel, S. Sovath, S. Mudd, M. Huber, C. Kalis, S. Keck, C. Galanos, M. Freudenberg i B. Beutler, *CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 565-70.
69. Duerr, C.U., S.F. Zenk, C. Chassin, J. Pott, D. Gutle, M. Hensel i M.W. Hornef, *O-antigen delays lipopolysaccharide recognition and impairs antibacterial host defense in murine intestinal epithelial cells*. PLoS Pathog, 2009. **5**(9): p. e1000567.

70. Huber, M., C. Kalis, S. Keck, Z. Jiang, P. Georgel, X. Du, L. Shamel, S. Sovath, S. Mudd, B. Beutler, C. Galanos i M.A. Freudenberg, *R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells*. Eur J Immunol, 2006. **36**(3): p. 701-11.
71. Erridge, C., E. Bennett-Guerrero i I.R. Poxton, *Structure and function of lipopolysaccharides*. Microbes Infect, 2002. **4**(8): p. 837-51.
72. Galanos, C., O. Luderitz, E.T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura i et al., *Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities*. Eur J Biochem, 1985. **148**(1): p. 1-5.
73. Rietschel, E.T., T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel, F. Di Padova i et al., *Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function*. FASEB J, 1994. **8**(2): p. 217-25.
74. Rietschel, E.T., T. Kirikae, F.U. Schade, A.J. Ulmer, O. Holst, H. Brade, G. Schmidt, U. Mamat, H.D. Grimmecke, S. Kusumoto i et al., *The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity*. Immunobiology, 1993. **187**(3-5): p. 169-90.
75. Rietschel, E.T., H. Brade, L. Brade, K. Brandenburg, U. Schade, U. Seydel, U. Zahringer, C. Galanos, O. Luderitz, O. Westphal i et al., *Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity*. Prog Clin Biol Res, 1987. **231**: p. 25-53.
76. Hailman, E., H.S. Lichenstein, M.M. Wurfel, D.S. Miller, D.A. Johnson, M. Kelley, L.A. Busse, M.M. Zukowski i S.D. Wright, *Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 269-77.
77. Schumann, R.R., S.R. Leong, G.W. Flaggs, P.W. Gray, S.D. Wright, J.C. Mathison, P.S. Tobias i R.J. Ulevitch, *Structure and function of lipopolysaccharide binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1429-31.
78. Fujihara, M., M. Muroi, K. Tanamoto, T. Suzuki, H. Azuma i H. Ikeda, *Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex*. Pharmacol Ther, 2003. **100**(2): p. 171-94.
79. Steinemann, S., R.J. Ulevitch i N. Mackman, *Role of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein/CD14 pathway in LPS induction of tissue factor expression in monocytic cells*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(7): p. 1202-9.
80. Weiss, J., *Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 4): p. 785-90.
81. Kirkland, T.N. i S. Viriyakosol, *Structure-function analysis of soluble and membrane-bound CD14*. Prog Clin Biol Res, 1998. **397**: p. 79-87.
82. Simmons, D.L., S. Tan, D.G. Tenen, A. Nicholson-Weller i B. Seed, *Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein*. Blood, 1989. **73**(1): p. 284-9.
83. Bufler, P., G. Stiegler, M. Schuchmann, S. Hess, C. Kruger, F. Stelter, C. Eckerskorn, C. Schutt i H. Engelmann, *Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 604-10.
84. Simons, K. i E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.

85. Lingwood, D. i K. Simons, *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*. Science, 2010. **327**(5961): p. 46-50.
86. Rodgers, W., B. Crise i J.K. Rose, *Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(8): p. 5384-91.
87. Montixi, C., C. Langlet, A.M. Bernard, J. Thimonier, C. Dubois, M.A. Wurbel, J.P. Chauvin, M. Pierres i H.T. He, *Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains*. EMBO J, 1998. **17**(18): p. 5334-48.
88. Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack i B. Seed, *Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation*. Immunity, 1998. **8**(6): p. 723-32.
89. Field, K.A., D. Holowka i B. Baird, *Structural aspects of the association of FcepsilonRI with detergent-resistant membranes*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1753-8.
90. Kwiatkowska, K., J. Frey i A. Sobota, *Phosphorylation of FcgammaRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 3): p. 537-50.
91. Schmitz, G. i E. Orso, *CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(5): p. 513-21.
92. da Silva Correia, J., K. Soldau, U. Christen, P.S. Tobias i R.J. Ulevitch, *Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21129-35.
93. Moore, K.J., L.P. Andersson, R.R. Ingalls, B.G. Monks, R. Li, M.A. Arnaout, D.T. Golenbock i M.W. Freeman, *Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4272-80.
94. Kitchens, R.L., *Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides*. Chem Immunol, 2000. **74**: p. 61-82.
95. Zanoni i., R. Ostuni, L.R. Marek, S. Barresi, R. Barbalat, G.M. Barton, F. Granucci i J.C. Kagan, *CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4*. Cell, 2011. **147**(4): p. 868-80.
96. Poussin, C., M. Foti, J.L. Carpentier i J. Pugin, *CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20285-91.
97. Kitchens, R.L., P. Wang i R.S. Munford, *Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5534-45.
98. Schromm, A.B., E. Lien, P. Henneke, J.C. Chow, A. Yoshimura, H. Heine, E. Latz, B.G. Monks, D.A. Schwartz, K. Miyake i D.T. Golenbock, *Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 79-88.
99. Horng, T., G.M. Barton, R.A. Flavell i R. Medzhitov, *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 329-33.
100. Horng, T., G.M. Barton i R. Medzhitov, *TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 835-41.
101. Lin, S.C., Y.C. Lo i H. Wu, *Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling*. Nature, 2010. **465**(7300): p. 885-90.

102. Kagan, J.C., T. Su, T. Hornig, A. Chow, S. Akira i R. Medzhitov, *TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 361-8.
103. Alexopoulou, L., A.C. Holt, R. Medzhitov i R.A. Flavell, *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
104. Shaulian, E. i M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. E131-6.
105. Ameyar, M., M. Wisniewska i J.B. Weitzman, *A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against*. Biochimie, 2003. **85**(8): p. 747-52.
106. Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T.W. Mak i T. Taniguchi, *Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 243-9.
107. Negishi, H., Y. Fujita, H. Yanai, S. Sakaguchi, X. Ouyang, M. Shinohara, H. Takayanagi, Y. Ohba, T. Taniguchi i K. Honda, *Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(41): p. 15136-41.
108. Doyle, S.L. i L.A. O'Neill, *Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1102-13.
109. Yamamoto, M., T. Okamoto, K. Takeda, S. Sato, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Saitoh, N. Yamamoto, H. Sakurai, K.J. Ishii, S. Yamaoka, T. Kawai, Y. Matsuura, O. Takeuchi i S. Akira, *Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 962-70.
110. Jiang, Z., J. Ninomiya-Tsuji, Y. Qian, K. Matsumoto i X. Li, *Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(20): p. 7158-67.
111. Kawai, T. i S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
112. Kawai, T. i S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007. **13**(11): p. 460-9.
113. Sweet, M.J. i D.A. Hume, *Endotoxin signal transduction in macrophages*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(1): p. 8-26.
114. van der Bruggen, T., S. Nijenhuis, E. van Raaij, J. Verhoef i B.S. van Asbeck, *Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 3824-9.
115. Barton, G.M. i R. Medzhitov, *Toll-like receptor signaling pathways*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1524-5.
116. Huang, Q., J. Yang, Y. Lin, C. Walker, J. Cheng, Z.G. Liu i B. Su, *Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 98-103.
117. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda i S. Akira, *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
118. Fitzgerald, K.A., D.C. Rowe, B.J. Barnes, D.R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P.M. Pitha i D.T. Golenbock, *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-*

- kappaB* involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*, 2003. **198**(7): p. 1043-55.
119. Honda, K., A. Takaoka i T. Taniguchi, *Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors*. *Immunity*, 2006. **25**(3): p. 349-60.
 120. Oganessian, G., S.K. Saha, B. Guo, J.Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry i G. Cheng, *Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response*. *Nature*, 2006. **439**(7073): p. 208-11.
 121. Fitzgerald, K.A., S.M. McWhirter, K.L. Faia, D.C. Rowe, E. Latz, D.T. Golenbock, A.J. Coyle, S.M. Liao i T. Maniatis, *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(5): p. 491-6.
 122. Joung, S.M., Z.Y. Park, S. Rani, O. Takeuchi, S. Akira i J.Y. Lee, *Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1*. *J Immunol*, 2011. **186**(1): p. 499-507.
 123. Jiang, Z., T.W. Mak, G. Sen i X. Li, *Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(10): p. 3533-8.
 124. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda i S. Akira, *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. *Immunity*, 1999. **11**(1): p. 115-22.
 125. Hornef, M.W., T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark i A. Richter-Dahlfors, *Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells*. *J Exp Med*, 2002. **195**(5): p. 559-70.
 126. Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K.A. Fitzgerald, B.G. Monks, E.A. Kurt-Jones, D.T. Golenbock i T. Espevik, *Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(49): p. 47834-43.
 127. Vieira, A.V., C. Lamaze i S.L. Schmid, *Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis*. *Science*, 1996. **274**(5295): p. 2086-9.
 128. Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz i S. Schutze, *Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles*. *Immunity*, 2004. **21**(3): p. 415-28.
 129. Husebye, H., O. Halaas, H. Stenmark, G. Tunheim, O. Sandanger, B. Bogen, A. Brech, E. Latz i T. Espevik, *Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity*. *EMBO J*, 2006. **25**(4): p. 683-92.
 130. Qian, Z.M., H. Li, H. Sun i K. Ho, *Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway*. *Pharmacol Rev*, 2002. **54**(4): p. 561-87.
 131. Zanoni i., R. Ostuni, G. Capuano, M. Collini, M. Caccia, A.E. Ronchi, M. Rocchetti, F. Mingozzi, M. Foti, G. Chirico, B. Costa, A. Zaza, P. Ricciardi-Castagnoli i F. Granucci, *CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation*. *Nature*, 2009. **460**(7252): p. 264-8.
 132. Hamerman, J.A., N.K. Tchao, C.A. Lowell i L.L. Lanier, *Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(6): p. 579-86.
 133. Chu, C.L., Y.L. Yu, K.Y. Shen, C.A. Lowell, L.L. Lanier i J.A. Hamerman, *Increased TLR responses in dendritic cells lacking the ITAM-containing adapters DAP12 and FcRgamma*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(1): p. 166-73.

134. Husebye, H., M.H. Aune, J. Stenvik, E. Samstad, F. Skjeldal, O. Halaas, N.J. Nilsen, H. Stenmark, E. Latz, E. Lien, T.E. Mollnes, O. Bakke i T. Espevik, *The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes*. *Immunity*, 2010. **33**(4): p. 583-96.
135. Shibata, T., Y. Motoi, N. Tanimura, N. Yamakawa, S. Akashi-Takamura i K. Miyake, *Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes*. *Int Immunol*, 2011. **23**(8): p. 503-10.
136. Kagan, J.C., *Recycling endosomes and TLR signaling--the Rab11 GTPase leads the way*. *Immunity*, 2010. **33**(4): p. 578-80.
137. Wang, Y., T. Chen, C. Han, D. He, H. Liu, H. An, Z. Cai i X. Cao, *Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4*. *Blood*, 2007. **110**(3): p. 962-71.
138. Friedman, G., E. Silva i J.L. Vincent, *Has the mortality of septic shock changed with time*. *Crit Care Med*, 1998. **26**(12): p. 2078-86.
139. Vincent, J.L., Y. Sakr, C.L. Sprung, V.M. Ranieri, K. Reinhart, H. Gerlach, R. Moreno, J. Carlet, J.R. Le Gall, D. Payen i I. Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients, *Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study*. *Crit Care Med*, 2006. **34**(2): p. 344-53.
140. Wittebole, X., D. Castanares-Zapatero i P.F. Laterre, *Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis*. *Mediators Inflamm*, 2010. **2010**: p. 568396.
141. Parker, T.S., D.M. Levine, J.C. Chang, J. Laxer, C.C. Coffin i A.L. Rubin, *Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood*. *Infect Immun*, 1995. **63**(1): p. 253-8.
142. Tobias, P.S., K. Soldau, N.M. Iovine, P. Elsbach i J. Weiss, *Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 18682-5.
143. Iwami, K.I., T. Matsuguchi, A. Masuda, T. Kikuchi, T. Musikachoen i Y. Yoshikai, *Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling*. *J Immunol*, 2000. **165**(12): p. 6682-6.
144. Mitsuzawa, H., C. Nishitani, N. Hyakushima, T. Shimizu, H. Sano, N. Matsushima, K. Fukase i Y. Kuroki, *Recombinant soluble forms of extracellular TLR4 domain and MD-2 inhibit lipopolysaccharide binding on cell surface and dampen lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice*. *J Immunol*, 2006. **177**(11): p. 8133-9.
145. Brunn, G.J., M.K. Bungum, G.B. Johnson i J.L. Platt, *Conditional signaling by Toll-like receptor 4*. *FASEB J*, 2005. **19**(7): p. 872-4.
146. Nagai, Y., R. Shimazu, H. Ogata, S. Akashi, K. Sudo, H. Yamasaki, S. Hayashi, Y. Iwakura, M. Kimoto i K. Miyake, *Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide*. *Blood*, 2002. **99**(5): p. 1699-705.
147. Divanovic, S., A. Trompette, L.K. Petiniot, J.L. Allen, L.M. Flick, Y. Belkaid, R. Madan, J.J. Haky i C.L. Karp, *Regulation of TLR4 signaling and the host interface with pathogens and danger: the role of RP105*. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(2): p. 265-71.

148. Brint, E.K., D. Xu, H. Liu, A. Dunne, A.N. McKenzie, L.A. O'Neill i F.Y. Liew, *ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 373-9.
149. Qin, J., Y. Qian, J. Yao, C. Grace i X. Li, *SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 25233-41.
150. Diehl, G.E., H.H. Yue, K. Hsieh, A.A. Kuang, M. Ho, L.A. Morici, L.L. Lenz, D. Cado, L.W. Riley i A. Winoto, *TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 877-89.
151. Burns, K., S. Janssens, B. Brissoni, N. Olivos, R. Beyaert i J. Tschopp, *Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 263-8.
152. Kobayashi, K., L.D. Hernandez, J.E. Galan, C.A. Janeway, Jr., R. Medzhitov i R.A. Flavell, *IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling*. Cell, 2002. **110**(2): p. 191-202.
153. Zhang, G. i S. Ghosh, *Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7059-65.
154. Mansell, A., R. Smith, S.L. Doyle, P. Gray, J.E. Fenner, P.J. Crack, S.E. Nicholson, D.J. Hilton, L.A. O'Neill i P.J. Hertzog, *Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 148-55.
155. Dai, P., S.Y. Jeong, Y. Yu, T. Leng, W. Wu, L. Xie i X. Chen, *Modulation of TLR signaling by multiple MyD88-interacting partners including leucine-rich repeat Fli-1-interacting proteins*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3450-60.
156. Boone, D.L., E.E. Turer, E.G. Lee, R.C. Ahmad, M.T. Wheeler, C. Tsui, P. Hurley, M. Chien, S. Chai, O. Hitotsumatsu, E. McNally, C. Pickart i A. Ma, *The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 1052-60.
157. Lu, Y.C., W.C. Yeh i P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-51.
158. Feng, J.M., J.Q. Shi i Y.S. Liu, *The effect of lipopolysaccharides on the expression of CD14 and TLR4 in rat Kupffer cells*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003. **2**(2): p. 265-9.
159. Sumegi, A., A. Szegedi, M. Gal, J. Hunyadi, G. Szegedi i P. Antal-Szalmas, *Analysis of components of the CD14/TLR system on leukocytes of patients with atopic dermatitis*. Int Arch Allergy Immunol, 2007. **143**(3): p. 177-84.
160. Wakabayashi, Y., M. Kobayashi, S. Akashi-Takamura, N. Tanimura, K. Konno, K. Takahashi, T. Ishii, T. Mizutani, H. Iba, T. Kouro, S. Takaki, K. Takatsu, Y. Oda, Y. Ishihama, S. Saitoh i K. Miyake, *A protein associated with toll-like receptor 4 (PRAT4A) regulates cell surface expression of TLR4*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1772-9.
161. Saitoh, S. i K. Miyake, *Mechanism regulating cell surface expression and activation of Toll-like receptor 4*. Chem Rec, 2006. **6**(6): p. 311-9.
162. Wang, D., J. Lou, C. Ouyang, W. Chen, Y. Liu, X. Liu, X. Cao, J. Wang i L. Lu, *Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(31): p. 13806-11.
163. Chuang, T.H. i R.J. Ulevitch, *Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2004. **5**(5): p. 495-502.

164. Fearn, C., Q. Pan, J.C. Mathison i T.H. Chuang, *Triad3A regulates ubiquitination and proteasomal degradation of RIP1 following disruption of Hsp90 binding*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34592-600.
165. Cuschieri, J., J. Billigren i R.V. Maier, *Endotoxin tolerance attenuates LPS-induced TLR4 mobilization to lipid rafts: a condition reversed by PKC activation*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1289-97.
166. Sakata, A., K. Yasuda, T. Ochiai, H. Shimeno, S. Hikishima, T. Yokomatsu, S. Shibuya i S. Soeda, *Inhibition of lipopolysaccharide-induced release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells by SMA, a novel inhibitor of sphingomyelinase and its therapeutic effect on dextran sulphate sodium-induced colitis in mice*. Cell Immunol, 2007. **245**(1): p. 24-31.
167. van Blitterswijk, W.J., A.H. van der Luit, R.J. Veldman, M. Verheij i J. Borst, *Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics?* Biochem J, 2003. **369**(Pt 2): p. 199-211.
168. Chiba, N., A. Masuda, Y. Yoshikai i T. Matsuguchi, *Ceramide inhibits LPS-induced production of IL-5, IL-10, and IL-13 from mast cells*. J Cell Physiol, 2007. **213**(1): p. 126-36.
169. Walton, K.A., B.G. Gugiu, M. Thomas, R.J. Basseri, D.R. Eliav, R.G. Salomon i J.A. Berliner, *A role for neutral sphingomyelinase activation in the inhibition of LPS action by phospholipid oxidation products*. J Lipid Res, 2006. **47**(9): p. 1967-74.
170. Grassme, H., V. Jendrossek, A. Riehle, G. von Kurthy, J. Berger, H. Schwarz, M. Weller, R. Kolesnick i E. Gulbins, *Host defense against Pseudomonas aeruginosa requires ceramide-rich membrane rafts*. Nat Med, 2003. **9**(3): p. 322-30.
171. Rozenova, K.A., G.M. Deevska, A.A. Karakashian i M.N. Nikolova-Karakashian, *Studies on the role of acid sphingomyelinase and ceramide in the regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-converting enzyme activity and TNFalpha secretion in macrophages*. J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 21103-13.
172. Mathison, J.C. i R.J. Ulevitch, *The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits*. J Immunol, 1979. **123**(5): p. 2133-43.
173. Van Amersfoort, E.S., T.J. Van Berkel i J. Kuiper, *Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(3): p. 379-414.
174. Munford, R.S. i C.L. Hall, *Purification of acyloxyacyl hydrolase, a leukocyte enzyme that removes secondary acyl chains from bacterial lipopolysaccharides*. J Biol Chem, 1989. **264**(26): p. 15613-9.
175. Katz, S.S., Y. Weinrauch, R.S. Munford, P. Elsbach i J. Weiss, *Deacylation of lipopolysaccharide in whole Escherichia coli during destruction by cellular and extracellular components of a rabbit peritoneal inflammatory exudate*. J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36579-84.
176. Poelstra, K., W.W. Bakker, P.A. Klok, M.J. Hardonk i D.K. Meijer, *A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification*. Lab Invest, 1997. **76**(3): p. 319-27.
177. Fox, E.S., P. Thomas i S.A. Broitman, *Uptake and modification of 125I-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells*. Hepatology, 1988. **8**(6): p. 1550-4.
178. Van Bossuyt, H., R.B. De Zanger i E. Wisse, *Cellular and subcellular distribution of injected lipopolysaccharide in rat liver and its inactivation by bile salts*. J Hepatol, 1988. **7**(3): p. 325-37.

179. Dunzendorfer, S., H.K. Lee, K. Soldau i P.S. Tobias, *TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1166-70.
180. Peiser, L., S. Mukhopadhyay i S. Gordon, *Scavenger receptors in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 123-8.
181. Murphy, J.E., P.R. Tedbury, S. Homer-Vanniasinkam, J.H. Walker i S. Ponnambalam, *Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors*. Atherosclerosis, 2005. **182**(1): p. 1-15.
182. Hampton, R.Y., D.T. Golenbock, M. Penman, M. Krieger i C.R. Raetz, *Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors*. Nature, 1991. **352**(6333): p. 342-4.
183. van Oosten, M., E. van de Bilt, T.J. van Berkel i J. Kuiper, *New scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide to liver endothelial and Kupffer cells*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5107-12.
184. de Haas, C.J., H.J. van Leeuwen, J. Verhoef, K.P. van Kessel i J.A. van Strijp, *Analysis of lipopolysaccharide (LPS)-binding characteristics of serum components using gel filtration of FITC-labeled LPS*. J Immunol Methods, 2000. **242**(1-2): p. 79-89.
185. Harris, H.W., C. Grunfeld, K.R. Feingold, T.E. Read, J.P. Kane, A.L. Jones, E.B. Eichbaum, G.F. Bland i J.H. Rapp, *Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 1028-34.
186. Levels, J.H., J.A. Marquart, P.R. Abraham, A.E. van den Ende, H.O. Molhuizen, S.J. van Deventer i J.C. Meijers, *Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 2321-6.
187. Hansen, C.G. i B.J. Nichols, *Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 11): p. 1713-21.
188. Sandvig, K. i B. van Deurs, *Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis*. J Biol Chem, 1990. **265**(11): p. 6382-8.
189. Damke, H., T. Baba, A.M. van der Blik i S.L. Schmid, *Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin*. J Cell Biol, 1995. **131**(1): p. 69-80.
190. Mayor, S. i R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 603-12.
191. Pearse, B.M., *Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(4): p. 1255-9.
192. Miller, W.E. i R.J. Lefkowitz, *Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 139-45.
193. Mashl, R.J. i R.F. Bruinsma, *Spontaneous-curvature theory of clathrin-coated membranes*. Biophys J, 1998. **74**(6): p. 2862-75.
194. Doherty, G.J. i H.T. McMahon, *Mechanisms of endocytosis*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 857-902.
195. Schmid, E.M., M.G. Ford, A. Burtey, G.J. Praefcke, S.Y. Peak-Chew i G. Mills, A. Benmerah i H.T. McMahon, *Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly*. PLoS Biol, 2006. **4**(9): p. e262.
196. Nossal, R., *Energetics of clathrin basket assembly*. Traffic, 2001. **2**(2): p. 138-47.

197. Hinrichsen, L., A. Meyerholz, S. Groos i E.J. Ungewickell, *Bending a membrane: how clathrin affects budding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(23): p. 8715-20.
198. Ford, M.G. i.G. Mills, B.J. Peter, Y. Vallis, G.J. Praefcke, P.R. Evans i H.T. McMahon, *Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 361-6.
199. Zhang, B., Y.H. Koh, R.B. Beckstead, V. Budnik, B. Ganetzky i H.J. Bellen, *Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis*. Neuron, 1998. **21**(6): p. 1465-75.
200. Schmid, E.M. i H.T. McMahon, *Integrating molecular and network biology to decode endocytosis*. Nature, 2007. **448**(7156): p. 883-8.
201. Henley, J.R., H. Cao i M.A. McNiven, *Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles*. FASEB J, 1999. **13 Suppl 2**: p. S243-7.
202. Roux, A., K. Uyhazi, A. Frost i P. De Camilli, *GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 528-31.
203. McNiven, M.A., H. Cao, K.R. Pitts i Y. Yoon, *The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(3): p. 115-20.
204. Urrutia, R., J.R. Henley, T. Cook i M.A. McNiven, *The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 377-84.
205. Ungewickell, E., H. Ungewickell, S.E. Holstein, R. Lindner, K. Prasad, W. Barouch, B. Martin, L.E. Greene i E. Eisenberg, *Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles*. Nature, 1995. **378**(6557): p. 632-5.
206. von Zastrow, M. i A. Sorkin, *Signaling on the endocytic pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(4): p. 436-45.
207. Howes, M.T., M. Kirkham, J. Riches, K. Cortese, P.J. Walser, F. Simpson, M.M. Hill, A. Jones, R. Lundmark, M.R. Lindsay, D.J. Hernandez-Deviez, G. Hadzic, A. McCluskey, R. Bashir, L. Liu, P. Pilch, H. McMahon, P.J. Robinson, J.F. Hancock, S. Mayor i R.G. Parton, *Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells*. J Cell Biol, 2010. **190**(4): p. 675-91.
208. van Deurs, B., O.W. Petersen, S. Olsnes i K. Sandvig, *The ways of endocytosis*. Int Rev Cytol, 1989. **117**: p. 131-77.
209. Sandvig, K., S. Pust, T. Skotland i B. van Deurs, *Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(4): p. 413-20.
210. Parton, R.G. i K. Simons, *The multiple faces of caveolae*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 185-94.
211. Rothberg, K.G., J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney i R.G. Anderson, *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. Cell, 1992. **68**(4): p. 673-82.
212. Cheng, Z.J., R.D. Singh, D.K. Sharma, E.L. Holicky, K. Hanada, D.L. Marks i R.E. Pagano, *Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(7): p. 3197-210.
213. Schnitzer, J.E., P. Oh, E. Pinney i J. Allard, *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules*. J Cell Biol, 1994. **127**(5): p. 1217-32.

214. Shi, F. i J. Sottile, *Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 14): p. 2360-71.
215. Thomsen, P., K. Roepstorff, M. Stahlhut i B. van Deurs, *Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 238-50.
216. Lajoie, P. i I.R. Nabi, *Regulation of raft-dependent endocytosis*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(4): p. 644-53.
217. Zhao, Y.Y., Y. Liu, R.V. Stan, L. Fan, Y. Gu, N. Dalton, P.H. Chu, K. Peterson, J. Ross, Jr. i K.R. Chien, *Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11375-80.
218. Glebov, O.O., N.A. Bright i B.J. Nichols, *Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(1): p. 46-54.
219. Sabharanjak, S., P. Sharma, R.G. Parton i S. Mayor, *GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway*. Dev Cell, 2002. **2**(4): p. 411-23.
220. Lundmark, R., G.J. Doherty, M.T. Howes, K. Cortese, Y. Vallis, R.G. Parton i H.T. McMahon, *The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway*. Curr Biol, 2008. **18**(22): p. 1802-8.
221. Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah i A. Dautry-Varsat, *Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 661-71.
222. Grassart, A., A. Dujeancourt, P.B. Lazarow, A. Dautry-Varsat i N. Sauvonnnet, *Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2*. EMBO Rep, 2008. **9**(4): p. 356-62.
223. Khandelwal, P., W.G. Ruiz i G. Apodaca, *Compensatory endocytosis in bladder umbrella cells occurs through an integrin-regulated and RhoA- and dynamin-dependent pathway*. EMBO J, 2010. **29**(12): p. 1961-75.
224. Grant, B.D. i J.G. Donaldson, *Pathways and mechanisms of endocytic recycling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 597-608.
225. Swanson, J.A. i C. Watts, *Macropinocytosis*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(11): p. 424-8.
226. Wang, J.T., M.C. Kerr, S. Karunaratne, A. Jeanes, A.S. Yap i R.D. Teasdale, *The SNX-PX-BAR family in macropinocytosis: the regulation of macropinosome formation by SNX-PX-BAR proteins*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13763.
227. Kerr, M.C. i R.D. Teasdale, *Defining macropinocytosis*. Traffic, 2009. **10**(4): p. 364-71.
228. Meier, O., K. Boucke, S.V. Hammer, S. Keller, R.P. Stidwill, S. Hemmi i U.F. Greber, *Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1119-31.
229. Mercer, J. i A. Helenius, *Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells*. Science, 2008. **320**(5875): p. 531-5.
230. Cao, H., J. Chen, M. Awoniyi, J.R. Henley i M.A. McNiven, *Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 23): p. 4167-77.
231. Orth, J.D. i M.A. McNiven, *Get off my back! Rapid receptor internalization through circular dorsal ruffles*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11094-6.
232. Haga, Y., N. Miwa, S. Jahangeer, T. Okada i S. Nakamura, *CtBP1/BARS is an activator of phospholipase D1 necessary for agonist-induced macropinocytosis*. EMBO J, 2009. **28**(9): p. 1197-207.

233. Liu, Y.W., M.C. Surka, T. Schroeter, V. Lukiyanchuk i S.L. Schmid, *Isoform and splice-variant specific functions of dynamin-2 revealed by analysis of conditional knock-out cells*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5347-59.
234. Schlunck, G., H. Damke, W.B. Kiosses, N. Rusk, M.H. Symons, C.M. Waterman-Storer, S.L. Schmid i M.A. Schwartz, *Modulation of Rac localization and function by dynamin*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(1): p. 256-67.
235. Kwiatkowska, K. i A. Sobota, *Signaling pathways in phagocytosis*. Bioessays, 1999. **21**(5): p. 422-31.
236. Dobrovolskaia, M.A. i S.N. Vogel, *Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS*. Microbes Infect, 2002. **4**(9): p. 903-14.
237. Ralph, P. i I. Nakoinz, *Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture*. Cancer Res, 1977. **37**(2): p. 546-50.
238. Hurwitz, R., K. Ferlinz i K. Sandhoff, *The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1994. **375**(7): p. 447-50.
239. Luberto, C., D.F. Hassler, P. Signorelli, Y. Okamoto, H. Sawai, E. Boros, D.J. Hazen-Martin, L.M. Obeid, Y.A. Hannun i G.K. Smith, *Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41128-39.
240. Hinkovska-Galcheva, V., L. Kjeldsen, P.J. Mansfield, L.A. Boxer, J.A. Shayman i S.J. Suchard, *Activation of a plasma membrane-associated neutral sphingomyelinase and concomitant ceramide accumulation during IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4761-9.
241. Hojjati, M.R. i X.C. Jiang, *Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine*. J Lipid Res, 2006. **47**(3): p. 673-6.
242. Towbin, H., T. Staehelin i J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
243. Manders, E.M.M., F.J. Verbeek i J.A. Aten, *Measurement of co-localization of objects in dual color confocal images*. J Microscopy, 1993. **169**(3): p. 375-382.
244. Ogawa, Y. i S. Kanoh, *Enhancement of endotoxicity and reactivity with carbocyanine dye by sonication of lipopolysaccharide*. Microbiol Immunol, 1984. **28**(12): p. 1313-23.
245. Cremesti, A., F. Paris, H. Grassme, N. Holler, J. Tschopp, Z. Fuks, E. Gulbins i R. Kolesnick, *Ceramide enables fas to cap and kill*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23954-61.
246. Grassme, H., J. Bock, J. Kun i E. Gulbins, *Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 30289-99.
247. Grassme, H., V. Jendrossek, J. Bock, A. Riehle i E. Gulbins, *Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 298-307.
248. Abdel Shakor, A.B., K. Kwiatkowska i A. Sobota, *Cell surface ceramide generation precedes and controls FcgammaRII clustering and phosphorylation in rafts*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36778-87.
249. van Blitterswijk, W.J., *Hypothesis: ceramide conditionally activates atypical protein kinases C, Raf-1 and KSR through binding to their cysteine-rich domains*. Biochem J, 1998. **331** (Pt 2): p. 679-80.
250. Chiarugi, P., P. Cirri, M.L. Taddei, D. Talini, L. Doria, T. Fiaschi, F. Buricchi, E. Giannoni, G. Camici, G. Raugei i G. Ramponi, *New perspectives in PDGF receptor*

- downregulation: the main role of phosphotyrosine phosphatases.* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 10): p. 2219-32.
251. Moreno-Altamirano, M.M. i. Aguilar-Carmona i F.J. Sanchez-Garcia, *Expression of GM1, a marker of lipid rafts, defines two subsets of human monocytes with differential endocytic capacity and lipopolysaccharide responsiveness.* Immunology, 2007. **120**(4): p. 536-43.
252. Kleveta, G., K. Borzecka, M. Zdioruk, M. Czerkies, H. Kuberczyk, N. Sybirna, A. Sobota i K. Kwiatkowska, *LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility.* J Cell Biochem, 2012. **113**(1): p. 80-92.
253. Loike, J.D. i S.C. Silverstein, *A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate between attached and ingested glutaraldehyde-fixed red blood cells in phagocytosing murine macrophages.* J Immunol Methods, 1983. **57**(1-3): p. 373-9.
254. Tasaka, S., A. Ishizaka, W. Yamada, M. Shimizu, H. Koh, N. Hasegawa, Y. Adachi i K. Yamaguchi, *Effect of CD14 blockade on endotoxin-induced acute lung injury in mice.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(2): p. 252-8.
255. Akashi, S., R. Shimazu, H. Ogata, Y. Nagai, K. Takeda, M. Kimoto i K. Miyake, *Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages.* J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3471-5.
256. Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner i T. Kirchhausen, *Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin.* Dev Cell, 2006. **10**(6): p. 839-50.
257. von Kleist, L., W. Stahlschmidt, H. Bulut, K. Gromova, D. Puchkov, M.J. Robertson, K.A. MacGregor, N. Tomilin, N. Tomlin, A. Pechstein, N. Chau, M. Chircop, J. Sakoff, J.P. von Kries, W. Saenger, H.-G. Krausslich, O. Shupliakov, P.J. Robinson, A. McCluskey i V. Haucke, *Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition.* Cell, 2011. **146**(3): p. 471-84.
258. Tsubamoto, Y., N. Yamada, Y. Watanabe, T. Inaba, M. Shiomi, H. Shimano, T. Gotoda, K. Harada, M. Shimada i J. Ohsuga, *Dextran sulfate, a competitive inhibitor for scavenger receptor, prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.* Atherosclerosis, 1994. **106**(1): p. 43-50.
259. Warren, H.S., C. Fitting, E. Hoff, M. Adib-Conquy, L. Beasley-Topliffe, B. Tesini, X. Liang, C. Valentine, J. Hellman, D. Hayden i J.M. Cavaillon, *Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum.* J Infect Dis, 2010. **201**(2): p. 223-32.
260. Sauter, C. i C. Wolfensberger, *Interferon in human serum after injection of endotoxin.* Lancet, 1980. **2**(8199): p. 852-3.
261. O'Brien, A.D., D.L. Rosenstreich i. Scher, G.H. Campbell, R.P. MacDermott i S.B. Formal, *Genetic control of susceptibility to Salmonella typhimurium in mice: role of the LPS gene.* J Immunol, 1980. **124**(1): p. 20-4.
262. Montminy, S.W., N. Khan, S. McGrath, M.J. Walkowicz, F. Sharp, J.E. Conlon, K. Fukase, S. Kusumoto, C. Sweet, K. Miyake, S. Akira, R.J. Cotter, J.D. Goguen i E. Lien, *Virulence factors of Yersinia pestis are overcome by a strong lipopolysaccharide response.* Nat Immunol, 2006. **7**(10): p. 1066-73.
263. Kalis, C., B. Kanzler, A. Lembo, A. Poltorak, C. Galanos i M.A. Freudenberg, *Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS-susceptibility in mice.* Eur J Immunol, 2003. **33**(3): p. 798-805.

264. Du, X., A. Poltorak, M. Silva i B. Beutler, *Analysis of Tlr4-mediated LPS signal transduction in macrophages by mutational modification of the receptor*. Blood Cells Mol Dis, 1999. **25**(5-6): p. 328-38.
265. Reid, R.R., A.P. Prodeus, W. Khan, T. Hsu, F.S. Rosen i M.C. Carroll, *Endotoxin shock in antibody-deficient mice: unraveling the role of natural antibody and complement in the clearance of lipopolysaccharide*. J Immunol, 1997. **159**(2): p. 970-5.
266. Boes, M., A.P. Prodeus, T. Schmidt, M.C. Carroll i J. Chen, *A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2381-6.
267. Dinges, M.M. i P.M. Schlievert, *Comparative analysis of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha activity in serum and lethality in mice and rabbits pretreated with the staphylococcal superantigen toxic shock syndrome toxin 1*. Infect Immun, 2001. **69**(11): p. 7169-72.
268. Jozefowski, S., M. Czerkies, A. Lukasik, A. Bielawska, J. Bielawski, K. Kwiatkowska i A. Sobota, *Ceramide and ceramide 1-phosphate are negative regulators of TNF-alpha production induced by lipopolysaccharide*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6960-73.
269. Kagan, J.C. i R. Medzhitov, *Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling*. Cell, 2006. **125**(5): p. 943-55.
270. Rowe, D.C., A.F. McGettrick, E. Latz, B.G. Monks, N.J. Gay, M. Yamamoto, S. Akira, L.A. O'Neill, K.A. Fitzgerald i D.T. Golenbock, *The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6299-304.
271. Sigismund, S., E. Argenzio, D. Tosoni, E. Cavallaro, S. Polo i P.P. Di Fiore, *Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation*. Dev Cell, 2008. **15**(2): p. 209-19.
272. Di Guglielmo, G.M., C. Le Roy, A.F. Goodfellow i J.L. Wrana, *Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 410-21.
273. Schumann, R.R., E.T. Rietschel i H. Loppnow, *The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin*. Med Microbiol Immunol, 1994. **183**(6): p. 279-97.
274. Perera, P.Y., S.N. Vogel, G.R. Detore, A. Haziot i S.M. Goyert, *CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4422-9.
275. Jozefowski, S., *[The role of the class A scavenger receptors, SR-A and MARCO, in the immune system. Part 1. The structure of receptors, their ligand binding repertoires and ability to initiate intracellular signaling]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2012. **66**: p. 104-19.
276. Bocharov, A.V. i N. Baranova, T.G. Vishnyakova, A.T. Remaley, G. Csako, F. Thomas, A.P. Patterson i T.L. Eggerman, *Targeting of scavenger receptor class B type I by synthetic amphipathic alpha-helical-containing peptides blocks lipopolysaccharide (LPS) uptake and LPS-induced pro-inflammatory cytokine responses in THP-1 monocyte cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 36072-82.
277. Carrasco-Marin, E., L. Fernandez-Prieto, E. Rodriguez-Del Rio, F. Madrazo-Toca, T. Reinheckel, P. Saftig i C. Alvarez-Dominguez, *LIMP-2 links late phagosomal trafficking with the onset of the innate immune response to Listeria monocytogenes: a role in macrophage activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3332-41.

278. Pfeiffer, A., A. Bottcher, E. Orso, M. Kapinsky, P. Nagy, A. Bodnar i. Spreitzer, G. Liebisch, W. Drobnik, K. Gempel, M. Horn, S. Holmer, T. Hartung, G. Multhoff, G. Schutz, H. Schindler, A.J. Ulmer, H. Heine, F. Stelter, C. Schutt, G. Rothe, J. Szollosi, S. Damjanovich i G. Schmitz, *Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3153-64.
279. Acton, S.L., P.E. Scherer, H.F. Lodish i M. Krieger, *Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21003-9.
280. Jozefowski, S., A. Sobota, B. Hamusur, A. Pawlowski i K. Kwiatkowska, *Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan enhances LPS-induced TNF-alpha production and inhibits NO secretion by engaging scavenger receptors*. Microb Pathog, 2011. **50**(6): p. 350-9.
281. Amiel, E., A. Alonso, S. Uematsu, S. Akira, M.E. Poynter i B. Berwin, *Pivotal Advance: Toll-like receptor regulation of scavenger receptor-A-mediated phagocytosis*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(4): p. 595-605.
282. Xu, W.Y., L. Wang, H.M. Wang, Y.Q. Wang, Y.F. Liang, T.T. Zhao i Y.Z. Wu, *TLR2 and TLR4 agonists synergistically up-regulate SR-A in RAW264.7 through p38*. Mol Immunol, 2007. **44**(9): p. 2315-23.
283. Jozefowski, S., M. Arredouani, T. Sulahian i L. Kobzik, *Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8032-41.
284. Bowdish, D.M., K. Sakamoto, M.J. Kim, M. Kroos, S. Mukhopadhyay, C.A. Leifer, K. Tryggvason, S. Gordon i D.G. Russell, *MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000474.
285. Haworth, R., N. Platt, S. Keshav, D. Hughes, E. Darley, H. Suzuki, Y. Kurihara, T. Kodama i S. Gordon, *The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1431-9.
286. Yu, H., T. Ha, L. Liu, X. Wang, M. Gao, J. Kelley, R. Kao, D. Williams i C. Li, *Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF-kappaB activation in macrophages*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(7): p. 1192-8.
287. Becker, M., A. Cotena, S. Gordon i N. Platt, *Expression of the class A macrophage scavenger receptor on specific subpopulations of murine dendritic cells limits their endotoxin response*. Eur J Immunol, 2006. **36**(4): p. 950-60.
288. Chen, Y., F. Wermeling, J. Sundqvist, A.B. Jonsson, K. Tryggvason, T. Pikkarainen i M.C. Karlsson, *A regulatory role for macrophage class A scavenger receptors in TLR4-mediated LPS responses*. Eur J Immunol, 2010. **40**(5): p. 1451-60.
289. Mukhopadhyay, S., A. Varin, Y. Chen, B. Liu, K. Tryggvason i S. Gordon, *SR-A/MARCO-mediated ligand delivery enhances intracellular TLR and NLR function, but ligand scavenging from cell surface limits TLR4 response to pathogens*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1319-28.
290. Hsu, H.Y., D.P. Hajjar, K.M. Khan i D.J. Falcone, *Ligand binding to macrophage scavenger receptor-A induces urokinase-type plasminogen activator expression by a protein kinase-dependent signaling pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 1240-6.

291. Seimon, T.A., A. Obstfeld, K.J. Moore, D.T. Golenbock i I. Tabas, *Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19794-9.
292. Yu, X., H. Yi, C. Guo, D. Zuo, Y. Wang, H.L. Kim, J.R. Subjeck i X.Y. Wang, *Pattern recognition scavenger receptor CD204 attenuates Toll-like receptor 4-induced NF-kappaB activation by directly inhibiting ubiquitination of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6*. J Biol Chem, 2011. **286**(21): p. 18795-806.
293. Dunzendorfer, S., H.K. Lee, K. Soldau i P.S. Tobias, *Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses*. FASEB J, 2004. **18**(10): p. 1117-9.
294. Medvedev, A.E. i S.N. Vogel, *Overexpression of CD14, TLR4, and MD-2 in HEK 293T cells does not prevent induction of in vitro endotoxin tolerance*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(1): p. 60-4.
295. Medvedev, A.E., A. Lentschat, L.M. Wahl, D.T. Golenbock i S.N. Vogel, *Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 5209-16.
296. Medvedev, A.E., P. Henneke, A. Schromm, E. Lien, R. Ingalls, M.J. Fenton, D.T. Golenbock i S.N. Vogel, *Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2257-67.
297. Hoogerwerf, J.J., A.F. de Vos, C. van't Veer, P. Bresser, A. de Boer, M.W. Tanck, C. Draing, J.S. van der Zee i T. van der Poll, *Priming of alveolar macrophages upon instillation of lipopolysaccharide in the human lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(3): p. 349-56.
298. Vasselon, T., E. Hailman, R. Thieringer i P.A. Detmers, *Internalization of monomeric lipopolysaccharide occurs after transfer out of cell surface CD14*. J Exp Med, 1999. **190**(4): p. 509-21.
299. Antal-Szalmas, P., M.J. Poppelier, R. Broekhuizen, J. Verhoef, J.A. van Strijp i K.P. van Kessel, *Diverging pathways for lipopolysaccharide and CD14 in human monocytes*. Cytometry, 2000. **41**(4): p. 279-88.
300. Shuto, T., K. Kato, Y. Mori, S. Viriyakosol, M. Oba, T. Furuta, T. Okiyoneda, H. Arima, M.A. Suico i H. Kai, *Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4 endocytosis in TLR4/MD-2/CD14 overexpressing CHO cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(3): p. 1402-9.
301. Nomura, F., S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto, K. Nakanishi, M. Kimoto, K. Miyake, K. Takeda i S. Akira, *Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3476-9.
302. Bosisio, D., N. Polentarutti, M. Sironi, S. Bernasconi, K. Miyake, G.R. Webb, M.U. Martin, A. Mantovani i M. Muzio, *Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3427-31.
303. Jozefowski, S., M. Czerkies, A. Sobota i K. Kwiatkowska, *Determination of cell surface expression of Toll-like receptor 4 by cellular enzyme-linked immunosorbent assay and radiolabeling*. Anal Biochem, 2011. **413**(2): p. 185-91.

304. Lange, Y., M.H. Swaisgood, B.V. Ramos i T.L. Steck, *Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts*. J Biol Chem, 1989. **264**(7): p. 3786-93.
305. Marchesini, N. i Y.A. Hannun, *Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation*. Biochem Cell Biol, 2004. **82**(1): p. 27-44.
306. Milhas, D., C.J. Clarke i Y.A. Hannun, *Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids*. FEBS Lett, 2010. **584**(9): p. 1887-94.
307. MacKichan, M.L. i A.L. DeFranco, *Role of ceramide in lipopolysaccharide (LPS)-induced signaling. LPS increases ceramide rather than acting as a structural homolog*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1767-75.
308. Abdel Shakor, A.B., M.M. Atia, K. Kwiatkowska i A. Sobota, *Cell surface ceramide controls translocation of transferrin receptor to clathrin-coated pits*. Cell Signal, 2012. **24**(3): p. 677-84.
309. Hailemariam, T.K., C. Huan, J. Liu, Z. Li, C. Roman, M. Kalbfeisch, H.H. Bui, D.A. Peake, M.S. Kuo, G. Cao, R. Wadgaonkar i X.C. Jiang, *Sphingomyelin synthase 2 deficiency attenuates NFkappaB activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(8): p. 1519-26.
310. Jozefowski, S. i J. Marcinkiewicz, *Aggregates of denatured proteins stimulate nitric oxide and superoxide production in macrophages*. Inflamm Res, 2010. **59**(4): p. 277-89.

Publikacje i doniesienia zjazdowe doktoranta

Publikacje:

1. Józefowski S., **Czerkies M.**, Łukasik A., Bielawska A., Bielawski J., Kwiatkowska K., Sobota A. Ceramide and ceramide 1-phosphate are negative regulators of TNF α production induced by lipopolysaccharide. *J. Immunology* 185: 6960-6973 **(2010)**.
2. Józefowski S, **Czerkies M**, Sobota A, Kwiatkowska K. Determination of cell surface expression of Toll-like receptor 4 by cellular enzyme-linked immunosorbent assay and radiolabeling. *Anal Biochem.* 413:185-191 **(2011)**.
3. Kleveta G. Borzęcka K., Zdioruk M, **Czerkies M.**, Kuberczyk H., Sybirna N., Sobota A., Kwiatkowska K. LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility. *J. Cell Biochem.* 113:80-92 **(2012)**.
4. **Czerkies M.**, Borzęcka K., Płociennikowska A., Sobota A., Kwiatkowska K. An interplay between CD14 and scavenger receptors during internalization of high concentrations of LPS, przygotowywane do druku.

Doniesienia zjazdowe:

1. Kleveta G., **Czerkies M.**, Sobota A., Kwiatkowska K. (2009) Activation of macrophages with LPS induces transient association of TLR4 and CD14, „Molecular Biology in Diagnostics of Infectious Diseases and Biotechnology”, SGGW, *materiały zjazdowe* str. 99-102 **(2009)**.
2. **Czerkies M.**, G. Kleveta., Sobota A., Kwiatkowska K. LPS induces transient colocalization of CD14 and TLR4 followed by TLR4 internalization. The EMBO Meeting, *materiały zjazdowe* str. 31 **(2010)**.
3. Kleveta G., **Czerkies M.**, Mrozińska K., Sybirna N., Kwiatkowska K. Activation of TLR4 induces macrophage mobility correlated with actin reassembly. *Sepsis* str. 235- 236 **(2010)**.
4. **Czerkies M.**, Kleveta G., Sobota A., Kwiatkowska K. Endocytosis as a component of LPS signaling in macrophages. *Acta Biochim. Polon.* 57, suplement 4/210, str. 122. **(2010)**.
5. **Czerkies M.**, Kwiatkowska K. Inhibition of dynamin activity accelerates LPS-induced TLR4 down-regulation. *FEBS J.* 278, supplement 1, str 295.