

Mgr Katarzyna Kulcenty

Rozprawa doktorska

**Aktywacja ścieżki sygnałowej JAK/STAT w
regulacji funkcji komórek śródbłonna naczyń**

Zakład Immunologii Nowotworów

Katedra Biotechnologii Medycznej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Promotor: dr hab. Dariusz Iżycki

Praca naukowa finansowana z grantu promotorskiego
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N401 056737

Poznań, 2010

*Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania mojemu promotorowi
Panu Dr hab. Dariuszowi Iżyckiemu
za naukową opiekę i pomoc w realizowaniu pracy*

*Dziękuję Panu Prof. Dr hab. Andrzejowi Mackiewiczowi
za umożliwienie realizacji pracy
i pomoc w jej redagowaniu*

*Dziękuję Pani dr Katarzynie Gryscie
za wsparcie merytoryczne
oraz okazaną pomoc w zdobywaniu umiejętności
umożliwiających wykonanie pracy*

*Dziękuję Paniom położnym
ze szpitala położniczego przy ul. Polnej
za okazaną cierpliwość*

*Dziękuję wszystkim Koleżankom i Kolegom
z Zakładu Immunologii Nowotworów
za życzliwość, koleżeńskie rady i miłą atmosferę*

RODZICOM

Spis treści

1	<i>WSTĘP</i>	11
1.1	<i>Śródbłonek</i>	11
1.2	<i>Cząsteczki adhezyjne</i>	12
1.2.1	<i>Selektyny</i>	12
1.2.2	<i>ICAM (Intracellular Adhesion Molecule-1)</i>	13
1.2.3	<i>VCAM (Vascular Cell adhesion protein-1)</i>	14
1.3	<i>Transmigracja</i>	15
1.3.1	<i>Kotwiczenie i toczenie leukocytów</i>	16
1.3.2	<i>Aktywacja limfocytów</i>	16
1.3.3	<i>Ścisła adhezja</i>	17
1.3.4	<i>Diapedeza</i>	18
1.3.4.1	<i>Droga parakomórkowa</i>	19
1.3.4.2	<i>Droga transkomórkowa</i>	20
1.4	<i>Wpływ cytokin na regulację ekspresji cząsteczek adhezyjnych śródbłonka naczyniowego</i>	21
1.4.1	<i>Interleukina-1</i>	22
1.4.2	<i>Czynnik martwicy nowotworu (TNF-α)</i>	23
1.4.3	<i>Interleukina-6</i>	23
1.4.4	<i>Hyperinterleukina-6</i>	27
1.5	<i>Ścieżka sygnałowa JAK/STAT</i>	29
1.5.1	<i>Białka STAT</i>	30
1.5.2	<i>Monomer-Dimer</i>	31
1.5.3	<i>Transport białek STAT między cytoplazmą a jądrem</i>	32
1.5.4	<i>Aktywność transkrypcyjna nieufosforylowanego białka STAT</i>	33
1.5.5	<i>Rola białka STAT w nowotworach</i>	33

2	CEL PRACY	37
3	MATERIAŁY I METODY	38
3.1	Hodowla komórkowa	38
3.1.1	<i>Izolacja komórek HUVEC</i>	38
3.1.2	<i>Hodowla komórkowa</i>	38
3.2	Ocena wpływu H6 na ekspresję antygenów śródbłonna	39
3.2.1	<i>Inkubacja z substancjami badanymi</i>	39
3.2.2	<i>Cytometria przepływowa</i>	40
3.2.2.1	<i>Oznaczanie fenotypu komórek śródbłonna</i>	40
3.2.2.2	<i>Ocena ekspresji antygenów zewnątrzkomórkowych</i>	40
3.2.2.3	<i>Ocena antygenów wewnątrzkomórkowych</i>	41
3.2.3	<i>Izolacja RNA</i>	41
3.2.4	<i>Oznaczenie stężenia RNA</i>	42
3.2.5	<i>Odwrotna transkrypcja</i>	42
3.2.6	<i>Amplifikacja cDNA w czasie rzeczywistym</i>	42
3.3	Ocena wpływu H6 na aktywność promotorów cząsteczek adhezyjnych śródbłonna	45
3.3.1	<i>Klonowanie</i>	45
3.3.1.1	<i>PCR ze swoistymi starterami</i>	45
3.3.1.2	<i>Klonowanie produktów PCR do wektora reporterowego pGL3 zawierającego gen lucyferazy</i>	46
3.3.1.3	<i>Transformacja komórek kompetentnych</i>	48
3.3.1.4	Izolacja plazmidowego DNA	49
3.3.1.4.1	<i>Miniprep</i>	49
3.3.1.4.2	<i>Midiprep</i>	49
3.3.2	<i>Transfekcja komórek</i>	50
3.3.3	<i>Pomiar aktywności lucyferazy</i>	50

3.4	<i>Badanie miejsc wiążących białko STAT3 w obrębie promotorów genów cząsteczek adhezyjnych</i>	51
3.4.1	<i>Przygotowanie ekstraktów jądrowych</i>	51
3.4.2	<i>Przygotowanie i znakowanie izotopowe sondy</i>	51
3.4.3	<i>Przygotowanie próbek do elektroforezy</i>	52
3.4.4	<i>Elektroforeza próbek</i>	53
3.5	<i>Analiza wpływu H6 na adhezję i transmigrację limfocytów</i>	53
3.5.1	<i>Izolacja limfocytów</i>	53
3.5.2	<i>Znakowanie limfocytów</i>	53
3.5.3	<i>Test adhezji</i>	53
4	WYNIKI	55
4.1	<i>Analiza fenotypowa komórek śródbłonna</i>	55
	<i>Wpływ H6 na poziom ufosforylowanego białka STAT3</i>	57
4.2	<i>Wpływ aktywacji ścieżki JAK/STAT na poziom ekspresji antygenów na powierzchni śródbłonna naczyń</i>	59
4.3	<i>Wpływ aktywacji ścieżki JAK/STAT na poziom transkryptów antygenów CD54, CD62E i CD106</i>	66
4.4	<i>Analiza aktywności transkrypcyjnej promotorów antygenów CD54, CD62E i CD106</i>	69
4.4.1	<i>Analiza komputerowa fragmentów promotorów antygenów CD54, CD62E i CD106</i>	69
4.4.2	<i>Konstrukcja wektorów reporterowych</i>	71
4.4.3	<i>Wpływ H6 na aktywność transkrypcyjną promotorów cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106</i>	73
4.5	<i>Identyfikacja miejsc wiązania białek STAT w obrębie promotorów cząsteczek adhezyjnych</i>	76
4.6	<i>Ocena stopnia przylegania limfocytów do śródbłonna naczyń na skutek stymulacji komórek HUVEC IL6 i Hyperinterleukiną-6</i>	78
5	WNIOSKI	82

6	<i>DYSKUSJA</i>	83
7	<i>STRESZCZENIE</i>	93
8	<i>SUMMARY</i>	95
9	<i>PIŚMIENNICTWO</i>	97

WYKAZ SKRÓTÓW

- APRF** – (acute phase response factor), czynnik fazy ostrej odpowiedzi
- CCL21** – (chemokine ligand 21) chemokina 21
- CD** – (cluster of differentiation) antygen różnicowania
- CD62E** – selektyna E
- CD62P** – selektyna P
- CD99** – (MIC2 or single-chain type-1 glycoprotein), pojedynczo-łańcuchowa glikoproteina typu 1)
- cDNA** – (complementary DNA), komplementarny DNA
- CLA** – (cutaneous lymphocyte antigen) skórny antygen związany z limfocytami
- CNTF** – (clary neurotrophic factor) rzęskowy czynnik neurotropowy
- Cp** – (crossing point) punkt przejścia
- DNA** – (deoxyribonucleic acid), kwas deoksyrybonukleinowy
- dNTP** – (deoxynucleotide tri-phosphate) – deoksynukleotydy trifosforanu
- EC** – (endothelial cell), komórki śródbłonka
- ECGS** – (endothelial cell growth stimulator) stymulator wzrostu komórek endotelialnych
- ELISA** – (enzyme-linked immunoabsorbent assay), test immunoenzymatyczny
- EMSA** – (electrophoretic mobility Shift assay), test opóźnienia w żelu
- ESAM** – (endothelial cell-selective adhesion molecule) cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonka
- ESL-1** – (E-selectin ligand), ligand selektyny E
- F12K** – medium hodowlane
- FBS** – (foetal bovine serum), płodowa surowica bydlęca
- FGF** – (fibroblast growth factor), czynnik wzrostu fibroblastów
- FITC** – (fluorescein isothiocyanate) izotiocyanian fluoresceiny
- FRC** – (fibroblastic reticular cells) fibroblastyczne komórki siateczki
- GMCSF** – (granulocyte macrophage-colony stimulationg factor), czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów-makrofagów
- GMTV** – (genetically modified tumour vaccines) genetycznie modyfikowane szczepionki nowotworowe
- gp130** – glikoproteina 130
- H6** – hyperinterleukina-6
- Hep3b** – linia komórkowa ludzkiego wątrobiaka
- HepG2** – ustalona linia komórkowa ludzkiego wątrobiaka
- HEV** – (high endothelial venules) wysoki śródbłonek
- HIMEC** - (human intestine mucosal endothelial cells) ludzkie komórki śródbłonka naczyń jelita
- HLMEC** – (human lung microvascular endothelial cells) ludzkie komórki śródbłonka naczyń płuca
- HNDLEC** – (human neonatal dermal lymphatic endothelial cells) linia komórkowa limfatycznego śródbłonka skóry

- HPT** – haptoglobina
- HskMEC** – (human skin microvascular endothelial cells) ludzkie komórki śródbłonka skóry
- HUVEC** – (human umbilical vein endothelial cells), komórki linii pierwotnej śródbłonka naczyń izolowane z ludzkiej pępowiny
- ICAM/CD54** – (intracellular adhesion molecule) wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna
- IFN γ** – interferon γ
- IL** - interleukina
- IL-1** – interleukina-1
- IL-6** – interleukina-6
- IL-6R α /gp80** – receptor α dla Interleukiny-6
- IL-8** – interleukina-8
- IRE** – (interleukine response element), element odpowiedzi na interleukinę
- JAK** – kinaza Janusa
- JAM** – (junctional adhesion molecule) łącząca cząsteczka adhezyjna
- kDa** – (kilodalton), jednostka masy molowej
- LB** – (Luria Broth), pożywka do hodowli bakteryjnej
- LFA-1/CD11a/CD18** – (lymphocyte function-associated *antigen* 1) antygen związany z funkcją limfocytów
- LIF** – (leukemia inhibitory factor) czynnik hamujący białaczkę
- MAPK** – (mitogen-activated protein kinase), kinaza białka aktywowanego mitogenem
- MCAM/CD146** – (melanoma cell adhesion molecule) cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonka
- MFI** – (mean fluorescence intensity) średnia wartość fluorescencji
- MLCK** – kinaza łańcuchów lekkich miozyny
- MMLV** – (Maloney Murine Leucemia Virus) wirus mysiej białaczki Maloneya
- NF- κ B** – (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) czynnik jądrowy κ B
- ODZ** – odczynnik do znakowania
- OSM** – onkostatyna M
- PBGD** – (porphobilinogen deaminase) deaminaza porfobilinogenu
- PBS** – (phosphate-buffered saline), fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami
- PCR** – (polymerase chain reaction), łańcuchowa reakcja polimerazy
- PE** – (phycoerythrin) fikoerytryna
- PECAM/CD31** – (platelet/endothelial cell adhesion molecule) cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonka
- PIAS** – (protein inhibitor of activated STAT), białkowy inhibitor aktywowanego STAT
- PKC** – (protein kinase C), białowa kinaza C
- PKH26** – barwnik do znakowania limfocytów
- PSGL-1** – (P-selectin glycoprotein ligand) ligand selektyny P
- pSTAT** – fosforylowane białko STAT
- pz** – par zasad
- Real-time PCR** – łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

- RNA** – (rybonucleic acid), kwas rybonukleinowy
- RPMI** – (Roswell Park Memorial Institute) pożywka do hodowli komórek
- RT PCR** – odwrotna transkrypcja
- RT-qPCR** – PCR w czasie rzeczywistym
- sgp130** – rozpuszczalna glikoproteina 130
- sIL-6R** – rozpuszczalny receptor IL-6
- SOCS** – supresor sygnalizacji cytokin
- SPARC** – (secreted protein acidic and rich in cysteine) kwasowe białko wydzielnicze bogate w cysteinę
- Src** – kinaza tyrozynowa
- STAT** – (signal transducer and activator of transcription), białka przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję
- TBE** – Tris/Borate/EDTA, bufor
- TNF** – (tumor necrosis factor), czynnik martwicy nowotworu
- VCAM/CD106** – (vascular cell adhesion molecule) cząsteczka adhezyjna komórek naczyń
- VEGF** – (vascular endothelial growth factor) czynnik wzrostu śródbłonia naczyniowego
- VLA-4** – (very late antigen-4) antygen powierzchni limfocytów
- VV0** – vesiculo-vacuolar organelles
- vWF** – czynnik von Willebranda

1 WSTĘP

1.1 Śródbłonek

Komórkami śródbłonna naczyń (EC-endothelial cells) określa się grupę komórek wewnętrznej warstwy naczyń krwionośnych i limfatycznych. Początkowo śródbłonkiem naczyniowym nazywano warstwę wyściełającą naczynia krwionośne, limfatyczne i komórki wyściełające przestrzenie mezotelialne. [1,2]. Pierwszej izolacji EC dokonały w latach 70-tych dwie niezależne grupy badawcze izolując je z ludzkiej pępowiny[3, 4].

Komórki endotelialne wykazują wysoką heterogenność narządową i funkcjonalną. W skórze komórki te są grubsze i mają większą ilość mikrofilamentów w cytoplazmie. Jądra ich są wydłużone, podczas gdy w innych organach są okrągłe. Plazmolemma śródbłonna składa się z trzech funkcjonalnych kompartmentów: kohezyjnego (odpowiedzialnego za połączenia między komórkami), adhezyjnego (odpowiedzialnego za połączenie z błoną podstawną) i laminarnego (wykazującego ekspresję drobno- i wielkocząsteczkowych glikoprotein regulujących kotwiczenie i cyrkulację leukocytów krwi obwodowej). Charakterystycznymi dla EC strukturami są ciała Weibela-Palada, wewnątrzkomórkowe ziarnistości, syntetyzujące i uwalniające czynnik von Willebranda (vWF – znacznik komórek endotelium) [5], glikoproteiny, selektyna-P i IL-8. Ponadto udowodniono, iż ekspresja PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molekule*, CD31) VE-kadheryny oraz MCAM (*melanoma cell adhesion molekule*, CD146) jest charakterystyczna dla EC [2].

Liczne dane literaturowe wykazały, że śródbłonek naczyniowy syntetyzuje wazoaktywne peptydy i biologicznie aktywne cząsteczki biorące udział w regulacji obwodowego ciśnienia i przepływu krwi. Dodatkowo, komórki śródbłonna naczyń syntetyzują i uwalniają czynniki tkankowe, cytokiny, fibronektyny, kolagen i proteoglikany. Ponadto, poprzez produkcję lamininy 8 i 10 EC zaangażowane są w angiogenezę [2].

Komórki śródbłonna naczyniowego pełnią wysoce swoistą rolę bariery między krwią a tkankami litymi. Poprzez wieloetapowy proces transmigracji EC umożliwiają migrację limfocytów z krążenia do przestrzeni pozanaczyniowej tkanek

nielimfoidalnych. Proces transmigracji limfocytów przez komórki śródbłonka do tkanek obwodowych jest podstawowym zjawiskiem warunkującym utrzymanie nadzoru immunologicznego oraz gwarantującym optymalne zakotwiczenie i aktywację komórek odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na toczący się proces zapalny czy nowotworowy. Zasiadanie obwodowych tkanek miękkich przez swoiste komórki odpornościowe jest złożoną kaskadą zdarzeń, zachodzących między cząsteczkami adhezyjnymi na powierzchni śródbłonka a limfocytami. Umożliwia to kotwiczenie, toczenie (oba procesy związane z obecnością selektyny E – CD62E i selektyny P – CD62P na powierzchni komórek śródbłonka), ścisłą adhezję (związaną z indukowaną chemokinami ekspresją cząsteczek ICAM i VCAM) i transmigracją [6].

1.2 Cząsteczki adhezyjne

1.2.1 Selektyny

Toczenie się limfocytów związane jest przede wszystkim z obecnością selektyny E (CD62E) i P (CD62P) na powierzchni komórek śródbłonka. Obecność obu selektyn na powierzchni śródbłonka jest indukowalna. Selektyna E pojawia się w kilka do kilkunastu godzin po aktywacji komórek śródbłonka. Z kolei selektyna P pojawia się na ich powierzchni w kilkadziesiąt sekund po ich aktywacji. Uważa się, że Selektyna E nie jest tylko biernym uczestnikiem procesu adhezji, ale uczestniczy także w przekazywaniu sygnałów. Udowodniono, że związanie się leukocytów z komórkami śródbłonka prowadzi do oddziaływań między selektyną E a cytoszkieletem komórkowym [7]. Na skutek delikatnego zetknięcia się leukocyty z powierzchnią śródbłonka, dochodzi do połączenia selektyn z ich ligandami. W następstwie tego zaczepienia, prąd krwi napierający na limfocyty, wprowadza je w ruch obrotowy.

Ligandami dla selektyny E są cząsteczki: ESL-1 (*E-selectin ligand*), która pojawia się na powierzchni limfocytów zasiedlających tkanki w przewlekłych procesach zapalnych; PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand*) [8] i CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*) [9].

1.2.2 ICAM (Intracellular Adhesion Molecule-1)

Cząsteczki należące do rodziny immunoglobulin ICAM są immunoglobulinowymi receptorami transbłonowymi, łączącymi się z $\beta 2$ integrzynami na powierzchni leukocytów, LFA-1 (CD11a/CD18) i MAC-1 (CD11b/CD18). Do tej pory odkryto pięć cząsteczek należących do tej rodziny: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4, ICAM-5. Ich cechą wspólną są zewnątrzkomórkowe, immunoglobulinopodobne domeny. Cząsteczki te rozciągają się wzdłuż błony i mają krótką domenę cytoplazmatyczną. Uważa się, że domena wewnątrzkomórkowa odpowiada za kontakt z α -aktyniną cytoszkieletu [10]. Aktynina zmniejsza sztywność cytoszkieletu, umożliwiając zakotwiczenie leukocytów na powierzchni śródbłonna. Modelem do oceny roli aktyniny w transmigracji były komórki HUVEC. Wykazano, że zahamowanie aktyniny w komórkach śródbłonna, częściowo zablokowało transmigrację neutrofilii [11].

ICAM-1 zbudowana jest z pięciu immunoglobulinopodobnych domen. Jedna z nich odpowiada za łączenie z integrzyną LFA-1 na powierzchni leukocytów. ICAM-1 pełni istotną funkcję w procesie transmigracji. Zauważono, że w komórkach niewykazujących fenotypu komórek endotelialnych, pozbawionych antygenów adhezyjnych, transfekcja ICAM-1 jest wystarczająca do transmigracji neutrofilii przez ich powierzchnię [12]. Badania przeprowadzone na myszach pozbawionych cząsteczki ICAM potwierdziły jej istotną rolę w transmigracji. Odpowiedź immunologiczna u myszy pozbawionych cząsteczki ICAM była ograniczona, skutkując zmniejszoną migracją neutrofilii [13]. Naukowcy wykazali również, że blokada ICAM przy pomocy przeciwciał może przyczynić się do zahamowania transmigracji monocytów przez komórki śródbłonna. Co ciekawe, mimo blokady ICAM, monocyty wykazują zdolność przyłączenia się do komórek śródbłonna. Sugeruje to, że w mechanizmy adhezji zaangażowane są inne cząsteczki niż ICAM, jednak ta pełni kluczową rolę w transmigracji [14].

Analiza białek wiążących się z ICAM-1 wskazała na nowe białko, mogące odgrywać kluczową rolę w regulacji migracji leukocytów przez śródbłonek. Filamina B jest białkiem łączącym ICAM-1 z aktyniną cytoszkieletu. Wyciszenie filaminy B wykazało jej istotną rolę w przemieszczaniu ICAM-1 do zagłębień transmigracyjnych, ścisłej adhezji i transmigracji leukocytów [15].

ICAM-1 jest jedną z najważniejszych cząsteczek przekazujących sygnał

z zewnątrz do wnętrza komórki w procesie transmigracji leukocytów.

Wykazano, że w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki przez cząsteczkę ICAM-1 bierze także udział cząsteczka Rho. Aktywacja Rho związana jest z tworzeniem włókienek naprężeniowych prowadzących do remodelowania cytoszkieletu [16].

W laboratorium Etienne-Manneville wykazano, że na skutek aktywacji cząsteczki ICAM-1 dochodzi do zwiększenia stężenia wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. To z kolei przyczynia się do aktywacji PKC, fosforylacji związanych z aktywną białek i rearanżacji cytoszkieletu w komórkach endotelialnych mózgu. Wykazano także, że zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu białka są istotnym procesem umożliwiającym transmigrację limfocytów przez barierę krew-mózg [17].

ICAM-1 aktywuje kinazy wewnątrzkomórkowe (Src, p38MAPK), które indukują tyrozynową fosforylację białek biorących udział w transmigracji [18, 19].

W badaniach przeprowadzonych przez Wang i wsp.. wykazano, że związanie neutrofilii z komórkami śródbłonna prowadzi do produkcji wolnych rodników. Proces ten może być zatrzymany przy użyciu przeciwciał anti-ICAM-1. Potwierdza to rolę cząsteczki ICAM-1 w generacji wewnątrzkomórkowych rodników tlenowych (ROS) [20].

1.2.3 VCAM (Vascular Cell adhesion protein-1)

VCAM jest drugą cząsteczką immunoglobulinopodobną, odgrywającą kluczową rolę w procesie transmigracji leukocytów. Zbudowana jest z 6 lub 7 domen immunoglobulinowych i jest obecna w wielu komórkach różnego typu np. zaktywowanych komórkach śródbłonna, węzłach chłonnych i komórkach dendrytycznych w śledzionie.

Z cząsteczką tą wiążą się leukocyty wykazujące ekspresję VLA-4. Uważa się, że VCAM nie jest kluczową cząsteczką biorącą udział w procesie transmigracji. Ronald i wsp. wykazali, że blokada VCAM przy pomocy przeciwciał, nie wpływała na zmianę migracji monocytów. Jednak blokowanie jednocześnie ICAM-1 i VCAM-1 spowodowało inhibicję migracji monocytów w większym stopniu, niż blokada samej cząsteczki ICAM-1 [21]. Wydaje się, że rolą VCAM w transmigracji jest

przekazywanie sygnału do wnętrza komórki prowadząc do rozluźnienia połączeń międzykomórkowych [22].

Najnowsze badania wykazują, że VLA-4 nie jest jedynym ligandem dla cząsteczki VCAM-1. Co więcej, naukowcy odkryli, że oddziaływanie VLA-4/VCAM-1 nie bierą udziału w zależnej od VCAM-1 diapedezie. Kelly i wsp. wykazali, że za oddziaływanie z VCAM i indukcję diapedezy odpowiadają białka SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) [23]. Udowodnili oni, że oddziaływanie pomiędzy VCAM-1 a SPARC prowadzi do diapedezy i rearanżacji cytoszkieletu zarówno *in vivo* jak i *in vitro*.

Cząsteczka VCAM-1 pełni funkcję przekaźnika sygnału na dwóch różnych drogach: aktywacji GTPazy Rac i produkcji ROS. Na skutek aktywacji VCAM-1 dochodzi do zależnej od Rac produkcji wolnych rodników (ROS) i zależnej od nich indukcji włókienek naprężeniowych. Prowadzi to do rozluźnienia połączeń międzykomórkowych i formowania szczelin co ułatwia parakomórkową migrację [22].

Produkcja wolnych rodników związana jest także ze zwiększoną fosforylacją tyrozyny α -kateniny [24]. Cząsteczka VCAM-1 uaktywnia także wewnątrzkomórkową kinazę C (PKC) wymaganą do efektywnej transmigracji [25].

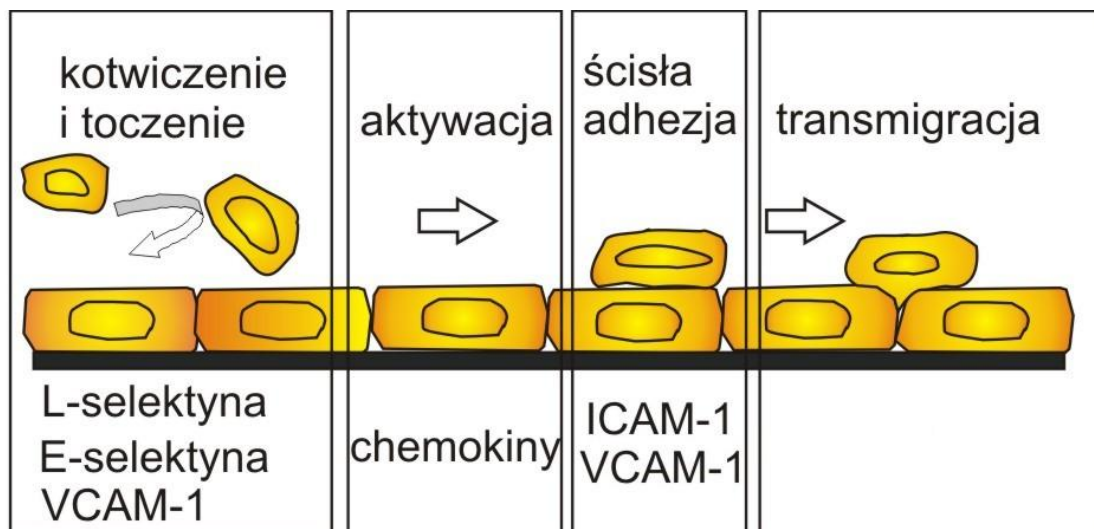
1.3 Transmigracja

Przezśródbłonkowa migracja leukocytów (TEM) jest procesem fizjologicznym zachodzącym zarówno w nabytej jak i wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Podczas TEM leukocyty opuszczają naczynia krwionośne i kierują się w stronę organów limfatycznych lub zakażonej tkanki. Pierwszą barierą, którą muszą pokonać leukocyty pomiędzy krwią a tkankami są komórki śródbłonka. Regulacja TEM jest bardzo istotna, ponieważ gdy jest zbyt nasilona lub zachodzi w niewłaściwej lokalizacji może przyczynić się do rozwoju wielu chorób takich jak przewlekłe zapalenie, miażdżycę naczyń, reumatoidalne zapalenie stawów.

Istotnym krokiem kaskady adhezyjnej jest aktywacja limfocytów. Zachodzi ona z udziałem chemokin aktywujących integryny znajdujące się na powierzchni limfocytów. Wykazano, że komórki śródbłonka mogą wytwarzać niektóre chemokiny pod wpływem działających na nie cytokin [6].

Kaskada adhezji składa się z kilku etapów: delikatnego zakotwiczenia

i toczenia limfocytów na powierzchni śródbłonka, aktywacji chemokin, ścisłego przylegania i migracji przez komórki śródbłonka (Ryc.1).



Ryc. 1. Transmigracja leukocytów przez śródbłonek naczyń

1.3.1 Kotwiczenie i toczenie leukocytów

Pierwszy etap migracji polega na delikatnym związaniu limfocytów z powierzchnią śródbłonka naczyń. Dochodzi wtedy do połączenia pierwszych par cząsteczek adhezyjnych. Ten etap ma na celu spowolnienie ruchu limfocytów umożliwiając ich kontakt z śródbłonkiem i mikrośrodowiskiem, umożliwiając przejście do kolejnego etapu – aktywacji. Istotną rolę w tym etapie transmigracji odgrywają selektyny (omówione w punkcie 1.2.1.).

1.3.2 Aktywacja limfocytów

Kolejnym krokiem w kaskadzie adhezyjnej, następującym po wstępnym związaniu limfocytów, jest proces ich aktywacji. Zachodzi on z udziałem chemokin, aktywujących integryny umiejscowione na powierzchni limfocytów. Istotną rolę w tym procesie odgrywa chemokina CCL21. Większość chemokin jest wytwarzana przez

tkanki otaczające naczynia, a następnie aktywnie transportowana z udziałem fibroblastycznych komórek siateczki (FRC – fibroblastic reticular cells) do komórek śródbłonka, mających wyspecjalizowane struktury pęcherzykowe wynoszące substancje chemotaktyczne na ich powierzchnię. Wiadomo również, iż same komórki śródbłonka mogą wytwarzać niektóre chemokiny pod wpływem działających na nie cytokin, wydzielanych w obrębie tkanki objętej procesem zapalnym. U ludzi i myszy chemokina CCL21 produkowana jest w węzłach chłonnych i na drodze transcytozy transportowana do światła żył z wysokim śródbłonkiem (HEV) [26].

Związanie chemokiny z jej receptorem na powierzchni limfocyту prowadzi do zmian konformacyjnych w jego budowie. Integryny zlokalizowane na powierzchni leukocytów, przekształcają się z receptorów o bardzo słabym powinowactwie w cząsteczki silnie wiążące się z ligandami. Zmiany konformacyjne integryn na powierzchni limfocytów (LFA-1, VLA-4, CD11a/CD18) prowadzą do ich połączenia z immunoglobulinami na powierzchni śródbłonka naczyń. Po połączeniu z leukocytem, przekazują one sygnał do wnętrza komórki, który skutkuje osłabieniem połączeń między komórkami śródbłonka, zmianami w cytoszkielecie, umożliwiając transmigrację limfocytów.

1.3.3 Ścisła adhezja

Interakcje śródbłonka z leukocytami prowadzą do powstania wypukłości błon tzw. miejsc dokowania czy zagłębień transmigracyjnych (*transmigratory cup*). W miejscach tych dochodzi do nagromadzenia cząsteczek ICAM-1 i VCAM-1 jak również molekuł cytoszkieletu i cząsteczek sygnalizacyjnych [27, 28]. Proces ten zapoczątkowuje kolejny etap transmigracji – ścisłą adhezję. Jak wspomniano powyżej, na skutek aktywacji chemokinami, dochodzi do zmian konformacyjnych integryn na powierzchni leukocytów. W rezultacie z receptorów o bardzo słabym powinowactwie, przekształcają się w cząsteczki silnie wiążące się z ligandami [29]. Integrynami biorącymi udział w ścisłej adhezji leukocytów do śródbłonka są: trzy integryny $\beta 2$ (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18) oraz integryny $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha 4\beta 7$. Spośród integryn $\beta 2$ najważniejszą w ścisłej adhezji jest CD11a/CD18 tzw. antygen związany z funkcją leukocytów (LFA-1 – leukocyte function associated antigen).

Jego ligandem jest cząsteczka ICAM-1. W integracjach leukocytów z białkami macierzy pozakomórkowej główną rolę odgrywają integryny $\beta 1$. Cząsteczki należące do podrodziny $\beta 1$ nazywane są również bardzo późnymi antygenami (VLA – very late antigens). W bezpośredniej adhezji do komórek śródbłonka bierze udział cząsteczka VLA-4. Znajduje się ona na limfocytach, monocytach, komórkach NK, bazofilach i eozynofilach. Na powierzchni śródbłonka ligandem VLA-1 jest cząsteczka VCAM-1 [30].

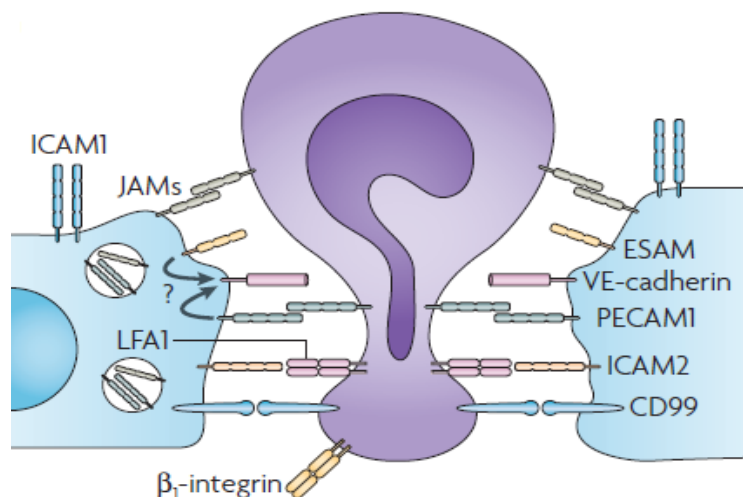
1.3.4 Diapedeza

Czwartym etapem transmigracji jest diapedeza. Jest to proces, w którym limfocyty przeciskają się między komórkami śródbłonka przechodząc do tkanek. Podczas ścisłej adhezji, dochodzi do zmian konformacyjnych cytoszkieletu i zwiększenia płynności błon komórkowych. Transmigracja limfocytów w większości jest opisywana jako tzw. transmigracja na drodze parakomórkowej, w której dochodzi do rozluźnienia połączeń między komórkami i przechodzenia leukocytów pomiędzy komórkami śródbłonka. W latach 60-tych szczegółowe badania morfologiczne transmigracji limfocytów ujawniły, że znaczna liczba limfocytów transmigruje dokładnie przez cytoplazmę komórek śródbłonka. Ten sposób migracji określono jako migrację transkomórkową [31].

Zanim leukocyty przejdą przez ścianę naczynia, „pełzają” po jego powierzchni poszukując najlepszego miejsca do transmigracji. Podczas migracji limfocyty muszą przejść przez trzy bariery: komórki endotelialne, błonę podstawną i perycyty. Przejście pierwszej bariery zajmuje komórkom ok. 5 minut, penetracja drugiej – 5-15 minut. Interakcje integryn leukocytów i cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka (ICAM i VCAM) mogą prowadzić do tworzenia tzw. struktur dokujących i zagłębień transmigracji, które są miejscami bogatymi w cząsteczki ICAM-1, VCAM-1, białka i komponenty cytoszkieletu (np. α -aktynina). Te struktury mogą zainicjować transmigrację na drodze para- czy trans komórkowej [27].

1.3.4.1 Droga parakomórkowa

Połączenie molekuł adhezyjnych prowadzi do obniżenia oddziaływania między komórkami śródbłonka, co umożliwia migrację komórek. W procesie tym rolę odgrywa wspomniana już wcześniej w tej pracy, wewnątrzkomórkowa domena cząsteczki ICAM-1 i aktywacja przy jej pomocy białka Rho, które wpływa na otwieranie przestrzeni pomiędzy komórkami śródbłonka. Indukowane przez ICAM jony wapnia, które aktywują kinazę lekkich łańcuchów miozyny (MLCK) [32], także wpływają na rozluźnienie kontaktu pomiędzy komórkami śródbłonka. Cząsteczki, które nie wspomagają migracji a mogą ją hamować (np. VE-kadheryna), mogą zostać odsunięte od miejsca kontaktu między komórkami [33]. Cząsteczkami biorącymi aktywny udział w parakomórkowej migracji są: PECAM-1, ICAM-1, ICAM-1, JAM-A, JAM-B, JAM-C, ECAM (*Endothelial cell adhesion molecule*) i CD99 [34]. Cząsteczki ICAM łączą się z LFA-1 na leukocytach a cząsteczki PECAM i CD99 ze swoimi odpowiednikami na powierzchni leukocytów. Udział poszczególnych molekuł w transmigracji zależy od cząsteczki stymulującej albo od łączącego się leukocyta. Cząsteczki PECAM-1, ICAM-1 i JAM-A biorą udział w transmigracji w odpowiedzi na stymulację Interleukiną-1 β . Z kolei cząsteczka ESAM wspomaga transmigrację neutrofilii. Cząsteczki JAM i PECAM-1 poprzez współdziałanie ze swoimi cytoplazmatycznymi partnerami, związane są z systemem kadheryn [35]. Wegmann i wsp. wykazali, że cząsteczka ESAM poprzez aktywację Rho związana jest ze zwiększeniem płynności błony poprzez zmniejszenie oddziaływań VE-kadheryn [36]. Naukowcy wykazali także istotną rolę cząsteczki CD99 w procesie transmigracji. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Schenkel i wsp. udowodniono, że zablokowanie cząsteczki CD99 spowodowało zahamowanie migracji monocytów i neutrofilii w stymulowanych cytokinami komórkach linii pierwotnej HUVEC [37, 38]. Droga parakomórkowa związana jest z uwolnieniem ulegającej ekspresji na powierzchni śródbłonka VE-kadheryny (Ryc. 2) [30].

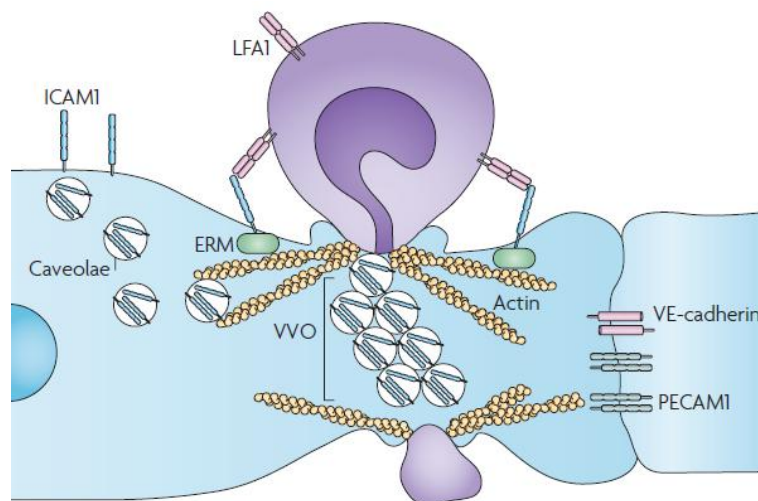


Ryc. 2. Parakomórkowa droga transmigracji leukocytów [30].

1.3.4.2 Droga transkomórkowa

Do transkomórkowej migracji leukocytów dochodzi w centralnym układzie nerwowym, a także w innych tkankach w odpowiedzi na proces zapalny [39, 40] i modelach *in vitro* [28, 41-43]. *In vivo*, transkomórkowa migracja neutrofilii związana jest z miejscami gdzie śródbłonek jest cienki, co ma ułatwić przechodzenie i skrócić drogę migrującym cząsteczkom [39]. Zdecydowana mniejszość leukocytów migruje w ten sposób (5-20% migrujących komórek) [28].

Migracja leukocytów na drodze transkomórkowej (Ryc. 3), rozpoczyna się od uwypuklenia błony komórek śródbłonka. Przy wzmożonej ekspresji, cząsteczki ICAM-1 ulegają ligacji i translokacji części wierzchołkowej ICAM do regionów bogatych w kaweole i F-aktynę. Prowadzi to do uaktywnienia wewnątrzkomórkowej kaskady reakcji. Przy pomocy kaweoliny-1 cząsteczki ICAM-1 transportowane są do błony podstawnej [41, 42]. W ten sposób dochodzi do utworzenia kanałów wewnątrzkomórkowych, przez które mogą przemieszczać się migrujące leukocyty. Kanały te nazwano VVO (*vesiculo-vacuolar organelles*). Ich obecność zaobserwowano w miejscach adhezji neutrofilii do komórek śródbłonka. Jak dotąd nie zaobserwowano VVO *in vivo*. Struktury te obecne są tylko w komórkach hodowanych *in vitro* [44].



Ryc. 3. Transkomórkowa migracja leukocytów przez komórki śródbłónka [30].

1.4 Wpływ cytokin na regulację ekspresji cząsteczek adhezyjnych śródbłónka naczyniowego

Cytokiny są białkami regulatorowymi produkowanymi przez leukocyty i inne komórki występujące w organizmie. Ich działanie plejotropowe opiera się na regulacji wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej, a także modulacji odpowiedzi na zakażenie. Pierwsze cytokiny odkryte zostały ok. 50 lat temu, ale ich rolę biologiczną opisano znacznie później. Wykazano, że cytokiny pełnią istotną rolę w regulacji interakcji pomiędzy komórkami śródbłónka a leukocytami. Liczne badania wykazały, że najważniejszą rolę w aktywacji komórek śródbłónka, a co się z tym wiąże, w regulacji ekspresji molekuł adhezyjnych odgrywają IL-1, IL-6 i TNF.

Badania komórek endotelialnych prowadzone w latach 80-tych przez Gimbrone i wsp. wykazały, że inkubacja komórek śródbłónka z mediatorami zapalenia indukuje zwiększoną adhezję neutrofilii czy prezentowanie antygenów przez komórki śródbłónka [45-47].

1.4.1 Interleukina-1

Interleukina-1 jest cytokiną prozapalną. Często współdziała ona z TNF- α regulując przewlekle procesy zapalne [48]. Wywierają one podobny wpływ na ekspresję genów cząsteczek zapalenia na powierzchni śródbłonka. Związane to jest z uaktywnieniem przez nie ścieżek sygnałowych NF- κ B i p38 MAPK [49, 50]. W komórkach śródbłonka zarówno NF- κ B jak i p38 MAPK zaangażowane są w regulację ekspresji genów E-selektyny, VCAM-1, ICAM-1, IL-6 czy IL-8 [51-53].

Cząsteczka ICAM ulega konstytutywnej ekspresji na powierzchni komórek śródbłonka naczyń. Jej ekspresja może istotnie wzrastać po stymulacji IL-1. Dustin i wsp. zauważyli, że inkubacja fibroblastów z IL-1 zwiększała wiązanie limfocytów na ich powierzchni w zależności od stężenia IL-1. Wykazali także, że inkubacja fibroblastów z przeciwciałem anti-ICAM-1, a limfocytów z przeciwciałem-anti-LFA-1, powodowała zahamowanie adhezji. Potwierdzili zatem rolę IL-1 w regulacji ekspresji cząsteczki ICAM-1 na powierzchni fibroblastów i w procesie adhezji limfocytów [54]. W swoich doświadczeniach opierali się na wcześniejszych wynikach uzyskanych przez Pober i wsp., w których wykazano rolę IL-1 i IFN γ w nasileniu ekspresji cząsteczki ICAM-1 na powierzchni komórek śródbłonka [45]. Kuldo i wsp. potwierdzili rolę IL-1 w stymulacji zarówno cząsteczki ICAM jak i dwóch innych cząsteczek adhezyjnych: VCAM-1 i E-selektyny. W reakcji Real-time PCR wykazali, że stymulacja komórek HUVEC przy pomocy IL-1 (10ng/ml) w istotny sposób wpływa na zwiększenie ilości transkryptów tych trzech cząsteczek, z czego najsilniej ekspresji uległa cząsteczka E-selektyny [55]. Podobne wyniki uzyskali Chang i wsp. [56]. Analizowali oni wpływ IL-1 α i IL-1 β , produkowanych przez komórki epitelialne zainfekowane wirusem RSV (respiratory syncytial virus) na ekspresję cząsteczek ICAM-1, VCAM-1 i E-selektyny. Analiza ELISA wykazała, że obie izoformy IL-1 zwiększają ekspresję analizowanych cząsteczek na powierzchni śródbłonka naczyń w zależności od stężenia badanych cytokin.

1.4.2 Czynniki martwicy nowotworu (TNF- α)

W licznych badaniach wykazano, że aktywacja komórek HUVEC przez TNF- α może zwiększać ich zdolność przyłączenia leukocytów poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek ICAM-1 i VCAM-1 [57]. Sawa i wsp. prowadzili badania na komórkach śródbłónka z naczyń limfatycznych (HNDLEC – *human neonatal dermal lymphatic endothelial cells*) i naczyń krwionośnych. Analiza Real-time PCR obu linii śródbłónka stymulowanych TNF- α spowodowała 10-krotny wzrost mRNA cząsteczki VCAM-1 i 38-krotny wzrost mRNA cząsteczki ICAM-1. Wyniki te potwierdzono na poziomie białka przy użyciu metody Western Blot i cytometrii przepływowej. Zauważono także, że ekspresja analizowanych cząsteczek jest większa w przypadku komórek śródbłónka naczyń krwionośnych (HUVEC) niż komórek śródbłónka naczyń limfatycznych [58]. Podobne wyniki dla cząsteczki ICAM-1 uzyskały także inne grupy badawcze, zarówno w komórkach endotelialnych [55, 59, 60] jak i w komórkach mezangialnych [61] i epitelialnych [62].

1.4.3 Interleukina-6

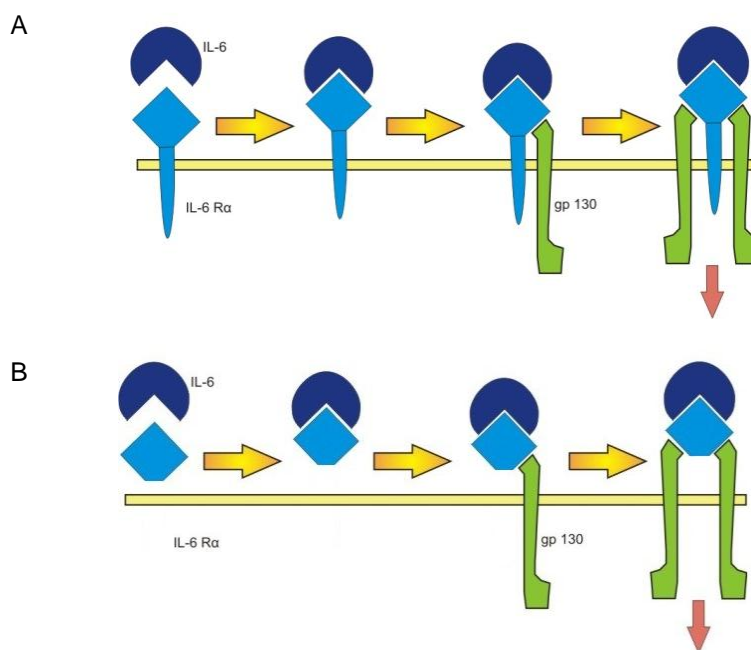
Interleukina-6 jest cytokiną plejotropową, uznawaną za jeden z centralnych czynników biorących udział w regulacji mechanizmów obronnych. Jej główną rolą jest udział w procesie zapalnym i w tworzeniu odpowiedzi immunologicznej. Wykazuje aktywność zarówno pro- jak i przeciwzapalne. Liczne badania wykazały, że IL-6 jest niezbędna przy produkcji przeciwciał poprzez oddziaływanie na limfocyty B. Wraz z IL-1 uczestniczy w aktywacji limfocytów T rozpoznających antygen i w reakcji ostrej fazy. Bierze także udział w angiogenezie, procesie istotnym zarówno w reakcjach zapalnych jak i progresji nowotworów, poprzez nasilenie syntezy VEGF i FGF [6]. IL-6 bierze także udział w modulacji zakotwiczenia leukocytów. Powoduje ona przełączenie nieswoistej, związanej z naciekaniem neutrofilów w swoistą odpowiedź immunologiczną związaną z naciekaniem monocytów i limfocytów [63].

Aktywność biologiczna IL-6 inicjowana jest przez połączenie IL-6 z jej swoistym receptorem α (IL-6 R α , gp80). Występują dwie naturalnie formy receptora IL-6: błonowy (mIL-6 R α) i rozpuszczalny (sIL-6 R α), który nie posiada części

cytoplazmatycznej domeny błonowej. sIL-6 R α powstaje na drodze alternatywnego składania transkryptu IL-6 R α [64].

IL-6 wraz z IL-11, czynnikiem hamującym białaczkę (LIF), rzęskowym czynnikiem neurotrofowym (CNTF), onkostatyną M (OSM) i kardiotropiną 1 (CT-1), należą do grupy cytokin IL-6-podobnych. Cechą charakterystyczną cytokin IL-6-podobnych jest wykorzystanie wspólnej podjednostki β kompleksu receptorowego gp130. Zwiążanie się cytokiny z receptorem powoduje uaktywnienie związanej z gp-130 kinazy JAK (JAK1, JAK2, TYK2) [65]. W konsekwencji dochodzi do fosforylacji tyrozyny na gp130, która rekrutuje cząsteczki przekształcające sygnał takie jak SHP2 (protein tyrosine phosphatase 2) czy STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) [66].

Występują dwie ścieżki przekazywania sygnału przez IL-6: klasyczna związana z błonowym IL-6R i „trans-przekazywanie” (*trans signalling*) związana z sIL-6R (Ryc.4).

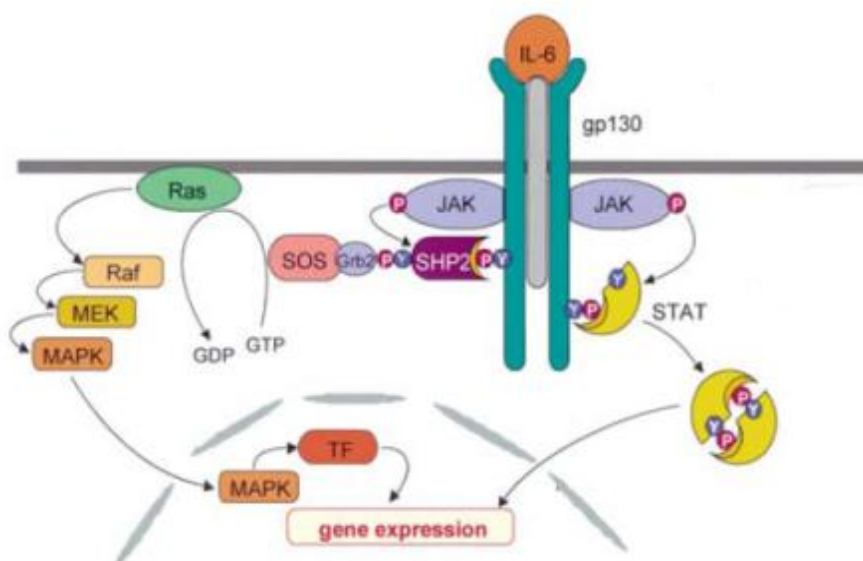


Ryc. 4. Sygnalizacja klasyczna i trans-sygnalizacja przez IL-6

A) Sygnalizacja klasyczna - IL-6 wiąże się z błonowym receptorem IL-6 R α

B) Trans-sygnalizacja - IL-6 łączy się z sIL-6 R α

W klasycznej ścieżce transdukcji sygnału dochodzi do związania się IL-6 z błonowym receptorem α . Kompleks IL-6/sIL-6 R wiąże następnie dwie cząsteczki gp130, co finalnie prowadzi do utworzenia heksamerycznej struktury kompleksu IL-6/IL-6 R α /gp130 [67]. Utworzenie aktywnego kompleksu receptorowego prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie gp130, co powoduje autofosforylację związanej z gp130 kinazy JAK, która następnie fosforyluje gp130. Fosforylacja gp130 uruchamia dwie ścieżki sygnałowe: STAT3 i MAPK. Po połączeniu z gp130, STAT3 ulega fosforylacji przez kinazę JAK, co powoduje dimeryzację STAT3(homo- lub hetero- z STAT1) i translokację do jądra. W jądrze komórkowym STAT3 łączy się z odpowiednią sekwencją DNA i wpływa na ekspresję genów. Miejsca wiążące STAT3 znajdują się w większości promotorów genów odpowiedzi ostrej fazy i dlatego początkowo STAT3 nazywany był acute phase response factor (APRF). W ścieżce MAPK dochodzi do aktywacji białek ras [66] (Ryc. 5).



Ryc. 5. Aktywacja ścieżki sygnałowej JAK/STAT i kinazy MAPK [1].

Podczas gdy gp130 znajduje się na wszystkich typach komórek jądrzastych, podjednostka gp80 tylko na niektórych. IL-6 po połączeniu z sIL-6R, może również aktywować komórki posiadające jedynie podjednostkę gp130. Dzięki temu kompleks IL-6/sIL-6R wykazuje znacznie szerszy zakres aktywności biologicznej niż IL-6. Zjawisko to nosi nazwę „trans-przebieżności” [64].

W większości komórek liczba podjednostek receptora gp130 znacznie przewyższa ilość cząsteczek gp80. W związku z tym sIL-6R zwiększa również efektywność samej IL-6 i jednocześnie kompensuje brak odpowiedniej liczby cząsteczek gp80. Do komórek, które odpowiadają na kompleks IL-6/sIL-6R, a nie na samą IL-6, należą m.in. hematopoetyczne komórki progenitorowe, komórki endotelialne oraz neurony, osteoblasty i limfocyty [68, 69].

Aktywność IL-6 regulowana jest na dwa sposoby: na poziomie kompleksów receptorowych i na poziomie wewnątrzkomórkowym poprzez cząsteczki sygnałowe.

Zahamowanie sygnalizacji komórkowej indukowanej przez IL-6 związane może być z internalizacją receptora. W ten sposób komórki zapobiegają hyperaktywacji przez IL-6. Internalizacja gp80 przez nadmiar IL-6, powoduje brak tej cząsteczki na powierzchni komórki i jej areaktywność (brak aktywacji gp130) [70]. Sgp130 może blokować aktywność kompleksu IL-6/sIL-6R poprzez kompetycję z błonowym gp130 [71].

Zidentyfikowano wiele cząsteczek wewnątrzkomórkowych, które mogą hamować zależne od IL-6 ścieżki sygnałowe. Białkowy inhibitor aktywowanego STAT3 (PIAS, *protein inhibitor of activated STAT*) blokuje jego wiązanie się z DNA [72]. SOCS3 z kolei łączy się z receptorem gp130, gdzie działając na kinazy JAK i gp130 hamuje ich fosforylację [73]. Co więcej, białka SOCS przyczyniają się także do ubikwitynizacji i degradacji kompleksu receptorów IL6 [66].

Liczne badania wykazały, że IL-6 pełni funkcję chemotaktyczną dla limfocytów T [74] oraz zwiększa płynność i proliferację komórek śródbłonka [75, 76]. W badaniach przeprowadzonych przez Watson i wsp. wykazano, że inkubacja komórek śródbłonka z IL-6 zwiększa ich potencjał do wiązania limfocytów. Efektu tego nie obserwowano w przypadku monocytów i komórek wielojądrzastych (PMN). Analizowano także wpływ cząsteczek adhezyjnych ICAM-1, VCAM-1 i E-selektyny na zależną od IL-6 adhezję limfocytów do śródbłonka. Przy pomocy testu ELISA

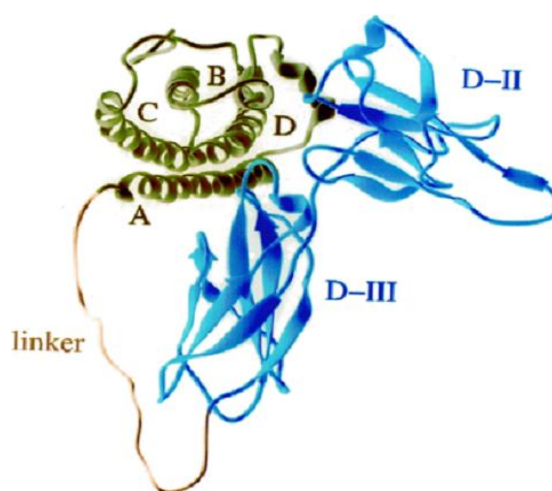
potwierdzono zależną od IL-6 (0,1 U/ml) nasiloną ekspresję badanych cząsteczek. Kinetyka odpowiedzi na IL-6 była podobna do tej uzyskanej po stymulacji komórek śródbłonka 10U/ml TNF [77]. Stosując przeciwciała blokujące cząsteczki ICAM-1, VCAM-1 i E-selektynę wykazano, że związanie limfocytów z komórkami śródbłonka jest zależne od ich obecności., jak również LFA-1 na powierzchni limfocytów [78].

Uważa się, że cytokiny prozapalne pełnią główną rolę w regulacji zdolności wiązania komórek na powierzchni śródbłonka naczyń. Główną rolę w tym procesie ma odgrywać ICAM-1 [79, 80]. Podwyższona temperatura ciała jest istotnym zjawiskiem w odpowiedzi przeciwzapalnej. Chen i wsp. próbowali odpowiedzieć na pytanie, czy podwyższona temperatura zwiększa poziom ekspresji ICAM-1 i chemokiny CCL21 w wysokim śródbłonku (HEV) i czy w tym procesie zaangażowana jest ścieżka sygnałowa IL-6. Przy pomocy przeciwciał neutralizujących IL-6 wykazali, że indukowalna podwyższoną temperaturą adhezja do komórek śródbłonka u myszy zależna jest od IL-6. Co więcej, dodanie rozpuszczalnego receptora sgp130 przed poddaniem myszy działaniu podwyższonej temperatury, zahamowało indukcję cząsteczki ICAM-1. Potwierdza to rolę indukowanej przez IL-6 trans-sygnalizacji przez gp130 w regulacji ekspresji ICAM-1 [81]. Podobne wyniki indukcji ekspresji ICAM-1 po stymulacji IL-6 uzyskano także w innych laboratoriach. Co więcej, naukowcy potwierdzili również rolę białka STAT3 i NF- κ B w zależnej od IL-6 i TNF indukcji ICAM-1 [79, 82-86].

1.4.4 Hyperinterleukina-6

W roku 1996 Rose-John i wsp. połączyli IL-6 z jej sIL-6R za pomocą peptydowego linkera, a uzyskane w ten sposób białko fuzyjne nazwano Hyperinterleukiną-6 (Hyper-IL-6, H6) [87] (Ryc. 6). Wykazano, że czas połowicznego rozpadu H6 jest wydłużony w porównaniu z rozpuszczalnym kompleksem IL-6/IL-6R α . Co więcej, w doświadczeniach z komórkami HepG2 wykazano, że H6 indukowała ekspresję haptoglobiny (HPT) w stężeniach o wiele niższych niż w przypadku IL-6 czy rozpuszczalnego kompleksu IL-6/IL-6R α . H6 wykazuje także 10-1000 razy większą aktywność biologiczną niż rozpuszczalny kompleks IL-6/IL-6R α oraz posiada szersze spektrum działania. Wykazano również, że ta sama ilość H6 w porównaniu z IL-6, 2-3- krotnie zwiększa transkrypcję zależnych od niej genów. Wynikać to może z braku

konieczności związania z receptorem IL-6 (gp80) co przyczyniać się może do szybszej dimeryzacji gp130 i w konsekwencji fosforylacji białka STAT3. Drugą hipotezą, o szybszej aktywacji genów w skutek działania H6 w porównaniu z IL-6, może być fakt tworzenia się dimerów IL-6/IL-6. Homodimery IL-6 mają większe powinowactwo do IL-6R, jednak kompleks IL-6/IL-6/IL-6R ma mniejszy potencjał do tworzenia kompleksu z gp130 i w konsekwencji do indukcji fosforylacji STAT3. H6 prawdopodobnie zwiększa szansę utworzenia trimeru IL-6-IL-6R-gp130, co z kolei ułatwia tworzenie heksametru i uaktywnienie wewnątrzkomórkowego przekazywania.[86].



Ryc. 6. Model cząsteczki białka fuzyjnego Hyper-IL-6 [87]

Na zielono zaznaczono IL-6, na niebiesko – sIL-6R.

a,b,c,d – cztery helisy IL-6, DII, DIII – domeny receptorowe wiążące cytokiny

Od 1997 roku w Zakładzie Immunologii Nowotworów prowadzone są badania nad terapeutyczną modyfikowaną cDNA kodującym fuzyjne białko H6 komórkową szczepionką czerniakową. Obecnie zakończono II fazę badań klinicznych szczepionki. Ciągle jednak niewiadomo, jaką rolę odgrywają komórki śródbłonna naczyń w regulacji lokalnych, przeciwczeraniakowych mechanizmów obronnych.

1.5 Ścieżka sygnałowa JAK/STAT

Związanie się każdej cytokiny z receptorem na powierzchni błony komórkowej, prowadzi do uruchomienia wewnątrzkomórkowej kaskady przekazywania sygnałów. W procesach tych uczestniczą szlaki GTPazy, kinazy MAP, kinaz tyrozynowych Src- i Tec-podobnych, kinazy-3 fosfatydyloinozytolu czy kinazy JAK. Jednak większość receptorów cytokin przekazuje sygnał za pomocą ścieżki sygnałowej JAK/STAT albo poprzez aktywację kaskady kinazy MAP [88-90].

Do kinaz JAK należą między innymi: JAK1, JAK2, Jak3 i Tyk2, a do białek typu STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6. Udział poszczególnych kinaz i białek w odpowiedzi na działanie cytokin został przedstawiony w tabeli 1.

Tab.1 Aktywacja kinaz JAK i białek STAT w odpowiedzi na stymulację przez cytokiny (według Briscoe i wsp. [1])

LIGAND	JAK	STAT
IFN-$\alpha\beta$	JAK1, Tyk2	STAT1, STAT2 STAT3
IFN-γ	JAK1, JAK2	STAT1, STAT3
IL-10	JAK1, Tyk2	STAT1, STAT3
IL-6	JAK1, JAK2, Tyk2	STAT1, STAT3
LIF	JAK1, JAK2, Tyk2	STAT1, STAT3
Onkostatyna M	JAK1, JAK2, Tyk2	STAT1, STAT3
CNTF	JAK1, JAK2, Tyk2	STAT1, STAT3
IL-2	JAK1, JAK3	STAT5
IL-4	JAK1, JAK3	STAT6
IL-7	JAK1, JAK3	STAT5
IL-9	JAK1, JAK3, Tyk2	STAT1, STATX
IL-3	JAK2	STAT5
IL-5	JAK2	STAT5
GMCSF	JAK2	STAT5
IL-12	Tyk2	STAT4
Erytropoetyna	JAK2	STAT5

Prolaktyna	JAK2	STAT5
Hormon wzrostu	JAK2	STAT1, STAT3
Angiotensyna	JAK2, Tyk2	STAT1, STAT2

Kinazy JAK1, JAK2 i Tyk2 ulegają uniwersalnej ekspresji, podczas gdy obecność JAK3 charakterystyczna jest tylko do komórek układu immunologicznego. Wielkość receptorów JAK ma masę ok. 130kDa. Mają C-końcową białkową domenę kinazową, przylegającą domenę kinazo-podobną i pięć dodatkowych domen, odpowiedzialnych za wiązanie białko-białko. Są one charakterystyczne dla każdej z cząsteczek JAK i odpowiadają za zróżnicowaną rolę w odpowiedzi na przyłączenie ligandu.

Białka STAT mają masę od 80-110kDa. Każde ma domenę SH2 i SH3. Aktywacja STATów polega na fosforylacji konserwatywnej domeny przy C-końcu białka. Prowadzi to homo- lub heterodimeryzacji białka bez udziału dodatkowych cząsteczek [1].

1.5.1 Białka STAT

Białka STAT występują w cytoplazmie w postaci monomerów wielkości 80-110 kDa [1, 91]. Związanie się cytokiny z jej receptorem na powierzchni komórki powoduje auto- lub *cross*-fosorylację członka rodziny kinaz JAK, związanych z receptorem cytokiny. Aktywne kinazy JAK fosforylują reszty tyrozynowe na części cytoplazmatycznej receptora cytokin. To powoduje przyłączenie się białka STAT i jego fosforylację. Ufosforylowane białka STAT dimeryzują na powierzchni cytoplazmy. Następnie dochodzi do ich translokacji do jądra, gdzie biorą udział w regulacji ekspresji genów. Uważano, że wpływ na ekspresję genów miały tylko homo- i heterodimery STAT w połączeniu z koaktywatorami [92].

Związanie IL-6 z receptorem prowadzi do dimeryzacji gp130, co skutkuje fosforylacją i aktywacją kinaz JAK1, JAK2 i TYK2. One z kolei fosforyzują gp130 na resztach tyrozynowych części cytoplazmatycznej receptora tworząc w ten sposób miejsca wiązania białka STAT. Białka te są dalej fosforyzowane na resztach

tyrozynowych, dimeryzują i transportowane są do jądra gdzie jako czynniki transkrypcyjne regulują ekspresję genów [93]. Aktywacja białek STAT jako wynik stymulacji przez IL-6 jest dwufazowa, co potwierdzono poprzez reakcję opóźnienia migracji w żelu (EMSA) i *phospho-tyrosine blot*. Najpierw dochodzi do aktywacji która jest obserwowalna 15-30 minut po stymulacji. Następnie dimer białek STAT zanika (ok. godziny po stymulacji) i pojawia się ponownie, jednak w słabszym nasileniu ok. 3-16 godzinach od aktywacji. Mechanizm hamowania stymulacji IL-6 po 30 minutach nie jest poznany. Przymyszczalne mechanizmy to desensytyzacja na skutek: endocytozy i hamowania gp80 (*down-regulation*), aktywację fosfotyrozynowej fosfatazy np. SHP-2, indukcję inhibitorów takich jak supresorów sygnalizacji cytokin (SOCS), białkowych inhibitorów aktywowanych białek STAT (PIAS) [94].

1.5.2 Monomer-Dimer

W 1998 roku, Leckmann i wsp., dzięki zastosowaniu chromatografii sitowej, wykazali, że niefosforyzowane białko STAT1 nie występuje w cytoplazmie komórek HeLa w formie monomeru (80-90kDa), ale co najmniej jako dimer o masie 160-200 kDa [95].

W standardowym modelu ścieżki sygnałowej biegnącej poprzez receptory cytokin i białko STAT uważa się, że białko STAT3 jest rekrutowane do okolicy cytoplazmatycznej domeny receptora cytokin z cytoplazmatycznej puli monomerycznego białka STAT. Jednak w 1999 roku, Ndubuisi i wsp. stosując metodę chromatografii (*Superose-6 gel-filtration chromatography*) zauważyli niewielką ilość monomerycznego białka STAT3 (91kDa) w cytoplazmie komórek wątroby (linia komórkowa ludzkiego raka wątroby-Hep3B i wątroby szczura). Zaobserwowano natomiast skupisko białka STAT3 (a także STAT1, STAT5a i STAT5b) w cytoplazmie w postaci kompleksów o wysokiej masie molekularnej: 200-400 kDa (statosom I) i 1-2 MDa (statosom II) [96].

Ota i wsp. wykazali, że rekombinowe, niefosforyzowane białka STAT (1, 3, 4, 5a, 5b, 6) zdolne są do tworzenia dimerów w roztworach (potwierdzone chromatografią i systemem dwu-hybrydowym). Co więcej, zauważyli, że białko STAT4 tworzy dimery *in vivo* przed aktywacją zależną od cytokin [97]. Do podobnych wniosków doszli także

Braunstein i wsp. [98]. Wykazali oni, że białka STAT1 i STAT3 tworzą w cytoplazmie komórek niestymulowanych dimery. Z kolei, monomery tych białek obecne były w cytoplazmie w ilościach niewielkich lub w ogóle nie stwierdzono ich obecności.

Mimo, iż jak dotąd nie wykazano obecności wolnych, monomerycznych białek STAT w cytoplazmie, uważa się, że to właśnie w tej formie, łączą się one z receptorem cytokin gdzie ulegają fosforylacji. Mechanizm w którym nieufosforylowane dimery rekrutowane są do kompleksu receptorów pozostaje zagadką [99].

Obecnie wiadomo, że dimery białka STAT tworzą jednocześnie w cytoplazmie kompleksy z różnymi białkami np. białkami regulatorowymi, czaperonami, białkami związanymi z przyłączeniem do błon (*membrane trafficking*), białkami transportującymi STATy do jądra [100, 101].

1.5.3 Transport białek STAT między cytoplazmą a jądrem

Badania immunofluorescencyjne wykazały zwiększoną pulę białek STAT w jądrze w odpowiedzi na działanie cytokin i czynników wzrostowych [66, 100, 102]. Wykazano, że na skutek działania IFN-gamma na komórki HeLa, większość cytoplazmatycznego białka STAT ulokowała się w jądrze komórkowym. Zastosowanie odpowiednich przeciwciał ujawniło, że jądrowa pula białek STAT to białka ufosforylowane. Badania wykonane przez Haspela i wsp.. wykazały, że białka STAT transportowane są do jądra komórkowego z cytoplazmy tylko na skutek ich aktywacji i w konsekwencji fosforylacji [103]. Niemniej jednak, eksperymenty z użyciem frakcjonowania komórek okazały się z sprzeczne z badaniami przeprowadzonymi przez Haspela. Wykazały one, że co najwyżej 15-20% cytoplazmatycznego białka STAT została przetransportowana do jądra [104]. Sehgal i wsp.. [105] zauważyli, że na skutek inkubacji komórek Hep3B z IFN- γ czy IL-6, większość ufosforylowanego białka STAT1 i STAT3 pozostaje z cytoplazmie, nawet na skutek przedłużonej inkubacji. Z kolei inne grupy badawcze zauważyły, że nieufosforylowane białko STAT3 występuje w jądrze komórek hodowlanych Hep3B [106].

Transport białek STAT do jądra zależny jest od związania się swoistych importyn na ich powierzchni (STAT1 wiąże się z importyną $\alpha 5$ i $\beta 1$ a STAT3 z importyną $\alpha 3$, $\alpha 6$ i $\beta 1$). W rezultacie, białka STAT transportowane są do jądra przez pory jądrowe [107].

Marg pokazał, że nieufosforylowane białko STAT migruje z cytoplazmy do jądra i ponownie do cytoplazmy. Zauważył on, że transport białek do jądra zależy jest od ich współdziałania z importynami. Z kolei eksport białek z jądra wymagał ich defosforylacji i udziału mechanizmu zależnego od CRM-1 [108]. Pranada i wsp. zauważyli, że akumulacja w jądrze komórkowym ufosforylowanego i nieufosforylowanego białka STAT3 na skutek stymulacji IL-6 jest w dużym stopniu zależna od jego zmniejszonego eksportu z jądra [109].

1.5.4 Aktywność transkrypcyjna nieufosforylowanego białka STAT

Wielu badaczy zwróciło uwagę, że nieufosforylowane formy białka STAT1, STAT3 i STAT6 mają zdolność do aktywacji transkrypcyjnej wybranych genów, innych niż w przypadku aktywacji zależnej od cytokin czy czynników wzrostowych. Stark i wsp. zauważyli, że nieufosforylowany STAT1 i STAT3 regulują transkrypcję w jądrze poprzez kompleksy uformowane z IRF1 i innymi czynnikami transkrypcyjnymi [110].

1.5.5 Rola białka STAT w nowotworach

Udowodniono, że obecność komórek immunologicznych w obrębie guza jest niezbędna dla komórkowej odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworowi. Jednak mechanizmy w obrębie mikrośrodowiska nowotworu mogące wpływać na zwiększoną infiltrację komórek immunologicznych pozostają niejasne. Jedną z hipotez zakłada udział białka STAT3 w tym procesie. Zauważono wzmożoną aktywność białka STAT3 w wielu nowotworach. Blokowanie białka STAT3 wpływa z kolei na zmniejszoną ekspresję kluczowych genów procesu proliferacji i przeżywalności komórek. Zauważono także, że zahamowanie w obrębie nowotworu ścieżki sygnałowej związanej z białkiem STAT3, skutkuje w spowolnieniu wzrostu guza i jego regresji *in vivo* a także do wzmożonej ekspresji chemokin (RANTES, IL-10). Sugeruje to, że aktywność białka STAT3 może wpływać na infiltrację guza przez komórki odpowiedzi immunologicznej [111]. Badania przeprowadzone przez Burdelya i wsp. wykazują, że blokowanie białka STAT3 w komórkach czerniaka poprzez wysoki poziom aktywności białka STAT3 prowadzi do produkcji wielu

chemoatraktantów, indukujących migrację różnych rodzajów komórek odpowiedzi immunologicznej istotnych do indukcji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [111]. Badania przeprowadzone przez Wang i wsp. [112] wykazały, że zablokowanie białka STAT w mysich guzach czerniakowych B16 poprzez terapię genową spowodowało regresję guza i zwiększoną infiltrację limfocytów T. Naukowcy Ci zauważyli także, że blokowanie ścieżki sygnałowej STAT3 w różnych komórkowych liniach czerniakowych poprzez *dominant-negative* STAT3 lub z użyciem farmakologicznych inhibitorów białka STAT powoduje ekspresję rozpuszczalnych czynników aktywujących makrofagi, co z kolei zwiększa zależne od iNOS i NO hamowanie wzrostu guza. Blokowanie białka STAT3 w komórkach nowotworowych prowadzi nie tylko do ekspresji mediatorów zapalnych niezbędnych do aktywacji nieswoistych komórek odpowiedzi immunologicznej, ale także do aktywacji komórek dendrytycznych. Inhibicja białka STAT zmniejsza jego możliwość wiązania się z DNA i hamuje uwalnianie czynników blokujących dojrzewanie komórek dendrytycznych a także produkcję przez komórki dendrytyczne IL-12. Białko STAT3 reguluje negatywnie proces zapalny, aktywność komórek dendrytycznych i odpowiedź immunologiczną komórek T. Ścieżka sygnałowa z udziałem białka STAT3 z jednej strony hamuje produkcję sygnałów prozapalnych, a z drugiej zwiększa ekspresję czynników hamujących funkcjonalne dojrzewanie komórek dendrytycznych. Naukowcy zwracają jednak uwagę, że zwiększona infiltracja komórek immunologicznych może być także wynikiem apoptozy komórek nowotworowych na skutek blokady białka STAT3 [112].

Białko STAT3 odgrywa istotną rolę w tworzeniu i rozwoju nowotworu. Aktywuje ono onkogenne ścieżki sygnałowe a także reguluje transkrypcję wielu czynników stymulujących wzrost nowotworu. W komórkach nowotworowych dochodzi do aktywacji ścieżek sygnałowych związanych z receptorami cytokin np. IL-10, IL-6, VEGF itd., co w konsekwencji prowadzi do aktywacji białka STAT3. Dzięki swojej aktywności antyapoptotycznej i mitotycznej, białko STAT3 zwiększa ekspresję wielu genów istotnych dla przeżycia i proliferacji komórki nowotworowej. Zauważono również rolę STAT3 w stymulowaniu genów odpowiedzialnych za angiogenezę i metastazę [113].

Przeprowadzone badania podkreśliły również, że STAT3 hamuje wydzielanie kilku mediatorów przez limfocyty Th1 zarówno w komórkach mysich jak i ludzkich [112]. Białko STAT3 reguluje także ekspresję kilku czynników immunosupresyjnych.

Jednym z nich jest IL-10, która wpływa hamująco na aktywność limfocytów Th1 [114]. Zauważono również że komórki mieloidalne wykazujące obecność aktywnej formy białka STAT3 hamują przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną [115].

Obecność nowotworowych limfocytów regulatorowych CD4+ związana jest z niepomyślną prognozą pacjentów cierpiących na nowotwór. Ich liczba znacznie wzrasta podczas progresji choroby. Wykazano, że aktywność białka STAT3 w komórkach nowotworowych przyczynia się do akumulacji limfocytów regulatorowych, zatem jest to kolejny dowód na rolę STAT3 w rozwoju nowotworu [116].

W jednym z badań klinicznych interferonu- α wykazano, że zwiększona ilość ufosforylowanego białka STAT1 ponad ufosforylowanym białkiem STAT3, zarówno w komórkach nowotworowych jak i komórkach układu immunologicznego, wiąże się ze zwiększoną przeżywalnością pacjentów [117]. Wyniki te sugerują, że różnica pomiędzy pSTAT1/ pSTAT3 może pełnić rolę predykcyjną w wynikach niektórych stosowanych immunoterapii a także sugeruje, że zwiększenie tej różnicy może wpłynąć korzystnie na powodzenie immunoterapii.

Komórki endotelialne umożliwiają migrację limfocytów z krążenia do środowiska pozanaczyniowego oraz tkanek nielimfoidalnych. Proces ten odgrywa fundamentalną rolę w regulacji fizjologicznych i patologicznych zjawisk takich jak: gojenie ran, zapalenia, powstawanie przerzutów, angiogeneza. Transmigracja naiwnych limfocytów T poprzez śródbłonek naczyń umożliwia prezentację antygenów w kontekście MHC klasy I i II wyspecjalizowanym komórkom prezentującym antygen, co prowadzi do indukcji proliferacji i sekrecji cytokin przez aktywowane limfocyty. Wykazano, że swoiste naprowadzanie limfocytów do odpowiednich kompartmentów uzależnione jest od obecności molekuł adhezyjnych obecnych na śródbłonce naczyń. Do aktywacji komórek śródbłonna naczyń dochodzi na skutek działania na nie różnych cytokin. Wykazano, że IL-1 i TNF α zwiększają ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonna naczyń poprzez ścieżkę sygnałową kinaz MAP [49, 50]. Nieliczne dane literaturowe sugerują, że IL-6 może regulować aktywność komórek śródbłonna stymulowanych TNF- α w pierwszej fazie procesu zapalnego [55] a także odgrywać rolę w procesie migracji limfocytów przez komórki śródbłonna naczyń [74-76]. W przypadku stymulacji komórek śródbłonna IL-6, naukowcy potwierdzili udział białek STAT w wewnątrzkomórkowym przekaźnictwie sygnału [82]. Uaktywnienie wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych przez IL-6 wymaga współdziałania trzech cząsteczek (IL-6, gp80 i gp130). Ich dostępność może być czynnikiem ograniczającym aktywację wewnątrzkomórkowej sygnalizacji. W związku z tym, stworzono fuzyjne białko łączące IL-6 z sIL-6R α , czyli Hyper-IL-6 (H6). Udział ścieżki sygnałowej JAK/STAT w przenikaniu limfocytów przez śródbłonek naczyń nie został jak dotąd poznany. Poszerzenie wiedzy na temat udziału kompleksu Hyper-IL-6 +JAK/STAT w regulacji ekspresji kluczowych dla transmigracji cząsteczek adhezyjnych pozwoli precyzyjnie określić rolę Hyper-IL6 w indukcji lokalnych mechanizmów immunologicznych.

2 CEL PRACY

Od 1997 w Zakładzie Diagnostyki i Immunologii Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Wielkopolskim Centrum Onkologii, prowadzone są badania nad terapeutyczną, komórkową, modyfikowaną cDNA kodującym fuzyjną cytokinę H6, szczepionką czerniakową (GMTV). Wyniki odpowiedzi klinicznej u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem są bardzo obiecujące [118]. Jednak dokładny mechanizm działania szczepionki, szczególnie wzbudzenia swoistej odpowiedzi immunologicznej, nie został do końca poznany. Niejasny jest wpływ samego białka H-6 na śródbłonek naczyń, szczególnie w kontekście jego roli w regulacji transmigracji limfocytów do miejsc podania szczepionki. Nieliczne doniesienia literaturowe sugerują udział nadekspresji cząsteczek adhezyjnych w nasileniu transmigracji do środowiska guza. Natomiast brak jest doniesień naukowych na temat udziału ścieżki sygnałowej JAK/STAT w regulacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych.

Wcześniej nieopublikowane badania przeprowadzone w Zakładzie Immunologii Nowotworów wykazały, że na skutek stymulacji H6 dochodzi do wzrostu ekspresji tylko trzech cząsteczek na powierzchni śródbłoka: CD62E i CD106. Są to cząsteczki biorące aktywny udział w procesie transmigracji limfocytów przez komórki śródbłoka.

Głównym celem pracy była ocena wpływu H6 oraz ścieżki transdukcji sygnałów JAK/STAT, na proces regulacji funkcji komórek śródbłoka naczyń.

Cel ten realizowany był poprzez:

1. Ocenę wpływu H6 na poziom ekspresji cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E, CD106 na powierzchni śródbłoka naczyń w modelu pierwotnej hodowli komórek endotelialnych pochodzących z żyły pępowinowej (HUVEC) (na poziomie białka i transkryptów).
2. Badanie aktywności fragmentów promotorów genów CD54, CD62E, CD106 wiążących białko STAT3 w stymulowanych H6 komórkach HUVEC.
3. Analizę funkcjonalną miejsc wiązania białka STAT3 w obrębie promotorów genów cząsteczek CD54, CD62E, CD106.
4. Wpływ H6 na ścisłą adhezję limfocytów do komórek HUVEC.

3 MATERIAŁY I METODY

3.1 Hodowla komórkowa

3.1.1 Izolacja komórek HUVEC

Pępowiny dostarczane były z Położniczego Szpitala Klinicznego przy ul. Polnej w Poznaniu dzięki uprzejmości prof. dr hab. Grzegorza Bręborowicza, pani dr Anissy Hamid oraz z Oddziału Ginekologii Szpitala im. Raszei w Poznaniu dzięki uprzejmości prof. dr hab. Jacka Koźlika. Komisja bioetyczna wydała zgodę na przeprowadzenie badań na materiale ludzkim.

Przy użyciu sterylnego skalpela odcinano oba końce pępowiny. Na jednym z końców żyły umieszczano igłę i mocowano ją przy pomocy plastikowych zatrząsków. Następnie pępowinę przepłukiwano 20 ml PBS, aby pozbyć się nadmiaru krwi i stworzyć odpowiednie pH dla działania enzymu. Po czym, na drugim końcu żyły umieszczano igłę i mocowano ją plastikowym zatrząskiem. Do żyły wstrzykiwano 0,1% roztwór kolagenazy (collagenase from clostridium histolyticum type I, Sigma Aldrich) a następnie umieszczano w cieplarni w 37°C na 12 minut. Zawartość pępowiny przelewano do probówki o pojemności 50ml zawierającej 400μl płodowej surowicy bydlecej (FBS). W celu zwiększenia wydajności izolacji, pępowinę przepłukiwano PBS do nowej probówki. Próby wirowano przez 5 minut przy 1200 rpm. Osad komórek zawieszano w medium F12K i wysiewano na płytki hodowlane pokryte żelatyną. Do medium dodawano FBS i hodowlę umieszczano w cieplarni. Następnego dnia komórki przemywano kilkakrotnie PBS i podawano medium F12K z surowicą zawierające czynniki wzrostowe: heparynę (100μg/1ml) i ECGS (200μg/1ml).

3.1.2 Hodowla komórkowa

Badania przeprowadzono na pierwotnej hodowli komórek śródbłonkowych pochodzących z ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Wykorzystana w doświadczeniach hodowla komórkowa utrzymywana była w warunkach standardowych, tj. w temperaturze 37°C, w atmosferze

wzbogaconej 5% CO₂ i nasyconej parą wodną. Wyjściowe medium hodowlane stanowiła pożywka F12 Keighn's z dodatkiem 12,5% FBS i czynników wzrostowych: ECGS o stężeniu 200µg/1ml i heparyny o końcowym stężeniu 100µg/1ml.

Komórki pasażowano 1:3 po osiągnięciu 100% konfluencji. W tym celu komórki odtrawiano od podłoża przy użyciu trypsyny (Sigma Aldrich) po uprzednim zebraniu medium i odpłukaniu pozostałości pożywki roztworem PBS (GIBCO Invitrogen). Reakcję hamowano po dodaniu medium kompletnego. Żywotność komórek oceniano przy pomocy ekskluzji błękitu trypanu. W doświadczeniach wykorzystywano hodowle EC których żywotność wynosiła więcej niż 95%.

3.2 Ocena wpływu H6 na ekspresję antygenów śródbłonna

3.2.1 Inkubacja z substancjami badanymi

W doświadczeniach, w których określano wpływ H6 na poziom ekspresji cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106, oraz w eksperymentach transfekcji plazmidami, wykorzystano 6-dołkowe płytki hodowlane pokryte kolagenem.

Po osiągnięciu przez komórki jednej ciągłej warstwy, 2 godziny przed planowanym eksperymentem, medium hodowlane wymieniano na F12K bez dodatku surowicy i czynników wzrostowych w celu wykluczenia ich ewentualnego wpływu na ekspresję badanych genów.

Wpływ aktywatora ścieżki sygnałowej JAK/STAT na poziom ekspresji badanych cząsteczek oceniano poprzez inkubację komórek HUVEC z H6. Kontrolę negatywną stanowiły komórki śródbłonna inkubowane z syntetycznym inhibitorem ścieżki JAK/STAT – kukurbitacyną [119, 120]. W doświadczeniach zastosowano dwuetapowy protokół inkubacji. W pierwszym przeprowadzono godzinną inkubację wstępną z dodatkiem kukurbitacyny o stężeniu 10ng/ml. W drugim etapie komórki inkubowano z H6.

W analizie wpływu Hyperinterelukiny-6 na poziom ufosforylowanego białka STAT3 przeprowadzono półgodziną inkubację komórek HUVEC z Hyperinterleukiną-6 (10ng/ml). W celu potwierdzenia aktywacji ścieżki sygnałowej JAK/STAT przez Hyperinterleukinę-6 przeprowadzono reakcję z inhibitorem badanej ścieżki. Komórki HUVEC inkubowano przez 15 minut z kukurbitacyną (10ng/ml), a po zahamowaniu ścieżki JAK/STAT - przez 30 minut z H6. Następnie komórki poddano

zewnątrzkomórkowej (obecność antygenów adhezyjnych na powierzchni komórki) i wewnątrzkomórkowej (ocena fosforylacji białka STAT3) analizie cytometrycznej.

3.2.2 Cytometria przepływowa

3.2.2.1 Oznaczanie fenotypu komórek śródbłonka

Fenotyp komórek HUVEC określano za pomocą wieloparametrycznej cytometrii przepływowej. Wykorzystano mysie anty-ludzkie sprzężone z FITC i PE przeciwciała monoklonalne przeciwko charakterystycznym dla komórek HUVEC antygenom powierzchniowym: HLA ABC (BD 555553), HLA DRDPDQ (555558), CD29 (BD 556049), CD31 (555446), CD54 (BD 555511), CD104 (BD 55520), CD130 (BD 555757), CD106 (BD 551146), CD146 (BD 550315). Ponadto, w pożywce z hodowli oceniano stężenie antygeny vWF wykorzystując test Asserachrom VWF(Diagnostica Stago, Francja).

3.2.2.2 Ocena ekspresji antygenów zewnątrzkomórkowych

Po inkubacji z H6 i kukurbitacyną komórki HUVEC trypsynizowano, wirowano i zawieszano w odczynniku do znakowania (ODZ) zawierającym PBS, 0,8% BSA i 0,8% sodek azydku. 100µl ODZ zawierającego analizowane komórki inkubowano przez jedną godzinę w ciemności z mysimi przeciwciałami (BD Biosciences) sprzężonymi z fikoerytryną (PE) lub izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) skierowanym przeciw ludzkim antygenom powierzchniowym komórek śródbłonka naczyń CD54, CD62E i CD106. Po inkubacji próby przepłukiwano 2ml ODZ, wirowano a następnie zawieszano w 300µl PBS. Do analizy użyto cytometru przepływowego firmy Becton Dickinson (BD Biosciences FACSCanto™). Ekspresję antygenów powierzchniowych przedstawiano jako średnią wartość fluorescencji (MFI) i procent pozytywnych komórek.

3.2.2.3 Ocena antygenów wewnątrzkomórkowych

Komórki HUVEC trypsynizowano, inkubowano z H6 i kukurbitacyną, a następnie permabilizowano z użyciem odczynników BDTMPhosflow Perm Buffer I Fix Buffer (BD Biosciences) według protokołu producenta.

Następnie komórki zawieszano w 0,5ml ODZ, dodawano 0,5ml Fix Buffer, inkubowano 30 min w 37°C i wirowano 3-krotnie (10 minut, 250×g). Zawiesinę komórek (100µl) inkubowano przez 1 godzinę w ciemności z przeciwciałami znakowanymi barwnikiem AlexaFluor 647 skierowanym przeciw ufosforylowanej formie białka STAT3 Y705 (BD557815). Analizę cytometryczną przeprowadzono jak wyżej.

3.2.3 Izolacja RNA

W celu oceny poziomu transkryptów cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106 przed i po stymulacji H6, z komórek izolowano całkowity RNA stosując zmodyfikowaną metodę Chomczyńskiego i Sacchi [121]

W skrócie, komórki poddano lizie w 1ml mieszaniny fenolu i izotiocyanianu guanidyny (TRIidty, AppliChem). Następnie dodawano 200µl chloroformu. Próby intensywnie mieszano i inkubowano 10 min. do rozdzielenia faz. Po inkubacji próby wirowano (15 min., 4°C, 12000×g). Uzyskano 3 warstwy:

- fazę wodną w której znajdowało się RNA
- interfazę zawierającą DNA
- fazę fenolowo-chloroformową zawierającą białko i elementy subkomórkowe.

Do dalszych etapów izolacji ostrożnie pobierano fazę wodną i przenoszono do nowych probówek. RNA wytrącano poprzez dodanie izopropanolu według proporcji 1:1+50µl. Próby mieszano i umieszczano w -20°C na godzinę. Wytrącone RNA wirowano przez 15 min. w 4°C przy 12000×g. Supernatant usuwano, a osad przemywano 1ml zimnego 75% etanolu, wirowano w 4°C przez 10 min. przy 7000×g. Osad suszono a następnie rozpuszczano w 25µl H₂O_{DEPC} i inkubowano w 4°C przez godzinę.

3.2.4 Oznaczenie stężenia RNA

Próby rozcieńczano dwustukrotnie (995 μ l + 5 μ l RNA). Stężenie RNA oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 260nm. Stopień zanieczyszczenia białkiem obliczano na podstawie stosunku absorbancji A_{260}/A_{280} . Pomiaru dokonywano względem H₂O, w której rozpuszczono RNA.

3.2.5 Odwrotna transkrypcja

Całkowity RNA przepisywano na komplementarny DNA (cDNA) w reakcji odwrotnej transkrypcji (RT PCR), stosując odwrotną transkryptazę wirusa mysiej białaczki Maloneya (MMLV, *Maloney Murine Leukemia Virus*) wchodzącej w skład zestawu VerteKit (Novazym, Polska).

Reakcję RT PCR przeprowadzono według następującego protokołu:

Do 1 μ g RNA dodawano 1 μ l mieszaniny heksamerów i uzupełniono do 18 μ l wodą dejonizowaną wolną od RNaz. Próby utrzymywano w 70°C przez 5 minut w celu denaturacji fragmentów dwuniciowych. Następnie dodawano mieszaninę transkrypcyjną (bufor MMLV, 1,5mM mieszaniny nukleotydów (dNTP)), 100U odwrotnej transkryptazy do końcowej objętości 25 μ l. Tak przygotowane próby umieszczano na 10 minut w 25 °C, celem przyłączenia heksamerów do matrycy. Syntezę cDNA prowadzono w 37 °C przez 60 min. (temperatura optymalna dla MMLV). Odwrotną transkryptazę inaktywowano przez 10 min. w 70°C, aby nie dochodziło do syntezy nieswoistych produktów.

Tak otrzymane cDNA przechowywano w -20 °C.

3.2.6 Amplifikacja cDNA w czasie rzeczywistym

Poziom ekspresji badanych genów oznaczano techniką RT-qPCR za pomocą aparatu LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Niemcy).

Do reakcji użyto polimerazy typu *hot-start*. Charakteryzuje się ona brakiem aktywności w temperaturze poniżej 75°C. Do aktywacji enzymu dochodzi w czasie 10 min. preinkubacji w temp. 95°C. Etap ten ma na celu odcięcie grup blokujących

aktywność enzymu. Zastosowanie układu *hot-start* zapobiega powstawaniu nieswoistych produktów w trakcie przygotowywania mieszaniny reakcyjnej.

Powstawanie produktów PCR monitorowano poprzez pomiar sygnału fluorescencji emitowanej przez sondy zastosowane w reakcji. Użycie swoistych sond hydrolizujących (*TaqMan*[®]), znakowanych fluorescencyjnie umiejscowionych pomiędzy parą starterów PCR, rozwiązało problem nieswoistości fluorescencyjnej obecnej przy zastosowaniu barwnika SYBR Green I. W metodzie *TaqMan* wykorzystuje się swoistą dla amplifikowanego fragmentu DNA sondę, wyznakowaną na końcach cząsteczkami fluorochromów. Na końcu 5' sondy znajduje się barwnik reporterowy, a na końcu 3' cząsteczka wygaszająca fluorescencję. Kiedy sonda jest nienaruszona, wygaszacz znajdujący się blisko reportera, wygasza jego fluorescencję. Podczas reakcji PCR sonda zostaje zdegradowana dzięki aktywności 5' nukleazowej polimerazy. Rozdział obu fluorochromów umożliwi emisję fluorescencji przez reporter. Wzrost fluorescencji monitorowany jest po każdym zakończonym cyklu elongacji. Poziom fluorescencji jest wprost proporcjonalny do ilości powstającego produktu.

Dzięki pomiarom fluorescencji możliwe jest monitorowanie przebiegu reakcji qPCR, w której wyróżniamy 3 etapy:

- I - w początkowych cyklach nie obserwuje się przyrostu ilości produktu,
- II - logarytmicznego wzrostu – obserwuje się bardzo szybki przyrost fluorescencji. Moment, w którym reakcja amplifikacji wchodzi w tę fazę (*C_p* – *crossing point*) zależy wyłącznie od początkowej ilości matrycy. Porównanie wartości *C_p* pozwala na oznaczenie ilości specyficznego cDNA w każdej z badanych prób.
- III - plateau – faza zahamowania przyrostu ilości produktu, a przez to również fluorescencji, spowodowaną wyczerpywaniem się substratów reakcji amplifikacji.

W celu określenia wydajności reakcji oraz określenia zależności *C_p* od początkowej ilości matrycy wykonano krzywe standardowe z użyciem kolejnych rozcieńczeń cDNA.

W ocenie ekspresji posługiwano się względną metodą ilościową (*relative quantification*) pozwalającą na ustalenie względnej różnicy między badanymi próbkami (krotności wzrostu, zmiany ilości specyficznego cDNA po zastosowaniu substancji

badanych). Wyniki oznaczeń ilościowych badanych cDNA normalizowano względem genów konstytutywnych (*house-keeping*). Jako standard wewnętrzny zastosowano cDNA genu kodującego deaminazę porfobilinogenu (*PBGD*, *porphobilinogen deaminase*).

Reakcje *real-time* qPCR przeprowadzono przy pomocy zestawu odczynników LightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics, Niemcy). Mieszanina reakcyjna zawierała:

- 2µl H₂O
- 5µl LightCycler480 Probes Master
- 0,5µl swoistych starterów + 0,5µl swoistej sondy (Tab.2)
- 2µl cDNA

Reakcję przeprowadzono według protokołu zalecanego przez producenta.

Tab. 2. Startery i sondy wykorzystane w reakcji *real-time* PCR

cDNA	Amplikon	Startery F (<i>forward</i>) i R (<i>reverse</i>)
<i>hCD54</i> sonda 71	90 nt	F: 5' CCTTCCTCACCGTGTACTGG 3' R: 5' AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC 3'
<i>hCD62E</i> sonda 27	61nt	F: 5' GCAAGAAGAAGCTTGCCCTA 3' R: 5' TGGCCACTGCAGGATGTAT 3'
<i>hCD106</i> sonda 27	71nt	F: 5' TTGCTGTGAGCAAGAAGTCAA 3' R: 5' GTTCTCTCATCTTGATGGCAGTT 3'

3.3 Ocena wpływu H6 na aktywność promotorów cząsteczek adhezyjnych śródbłonka

3.3.1 Klonowanie

Schemat produkcji wektorów służących do analizy aktywności promotorów genów badanych cząsteczek obejmuje:

- namnożenie badanych fragmentów promotorów w reakcji PCR
- klonowanie insertów do wektora przejściowego pGEM-T easy
- trawienie restrykcyjne insertu i wektora pGL3
- ligację insertu i wektora
- transformację bakterii

3.3.1.1 PCR ze swoistymi starterami

W celu wklonowania badanych fragmentów promotorów do wektora plazmidowego, cDNA otrzymane z komórek HUVEC poddano reakcji amplifikacji. Startery do reakcji PCR zawierające miejsca restrykcyjne (Tab.3) zostały zaprojektowane przy pomocy programu Oligo i zsyntetyzowane chemicznie. Temperatury przyłączania starterów ustalono na podstawie PCR w gradiencie temperatur. Reakcję PCR przeprowadzono z użyciem polimerazy Fermentas.

Czas wydłużania nici w każdym przypadku wynosił 30 sekund. Prowadzono 35 cykli reakcji.

Wyniki reakcji oceniano po rozdziale elektroforetycznym w 2% żelu agarozowym i wizualizacji bromkiem etydy w świetle UV.

Tab. 3. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR

Startery	Sekwencja	Opis
<i>CD54/STAT F</i>	5' CA ACGCGT GCCGCCACC CCG ATT GCT TTA GCT TGG AA 3'	Obejmuje sekwencję wiązania STAT
<i>CD54 F</i>	5' CA ACGCGT GCCGCCACC AGC ACC GCC CCT TGG C 3'	Nie obejmuje sekwencji STAT
<i>CD54 R</i>	5' CA AAGCTT AAC TCT GAG TAG CAG AGG AG 3'	
<i>CD62E/STAT F</i>	5' CA GCTAGC GCCGCCACC CGA TAT AAA GGC ATG GAC 3'	Obejmuje sekwencję wiązania STAT
<i>CD62E F</i>	5' CA GCTAGC GCCGCCACC GGA TGC CAT TGG GGA TTT 3'	Nie obejmuje sekwencji STAT
<i>CD62E R</i>	5' CA AAGCTT CAA GAG TTC TTT TCA CCC AAA G 3'	
<i>CD106/STAT F</i>	5' CA ACGCGT GCCGCCACC CAC ATT GGA TTC AGA AAG 3'	Obejmuje sekwencję wiązania STAT
<i>CD106 F</i>	5' CA ACGCGT GCCGCCACC AAG ATG AGG AAA AGC CTG TA 3'	Nie obejmuje sekwencji STAT
<i>CD106 R</i>	5' CA CTCGAG GAC CAT CTT CCC AGG CAT TT 3'	

3.3.1.2 Klonowanie produktów PCR do wektora reporterowego pGL3 zawierającego gen lucyferazy

Produkty PCR klonowano do wektora pGEM-t easy. Wklonowanie DNA do wektora miało za zadanie przygotowanie konstruktów do sekwencjonowania, a także do oceny ekspresji genu reporterowego lucyferazy (wektora pGL3). Do reakcji PCR użyto polimerazy aTag (Fermentas), która dzięki aktywności terminalnej transferazy dodaje dodatkowe reszty adenylowe na 3' końcach produktu. Wektor pGEM-T easy jest przecięty i ma na swoich 5' końcach reszty tymidynowe, co zwiększa prawdopodobieństwo połączenia z produktem PCR. Procedurę ligacji przeprowadzono zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

W przypadku tworzenia konstruktów do testów z genem reporterowym pGL3, klonowanie polegało na wygenerowaniu przez endonukleazy restrykcyjne tzw. „lepkich końców” zarówno w insercie jak i w wektorze, a następnie ich ligację.

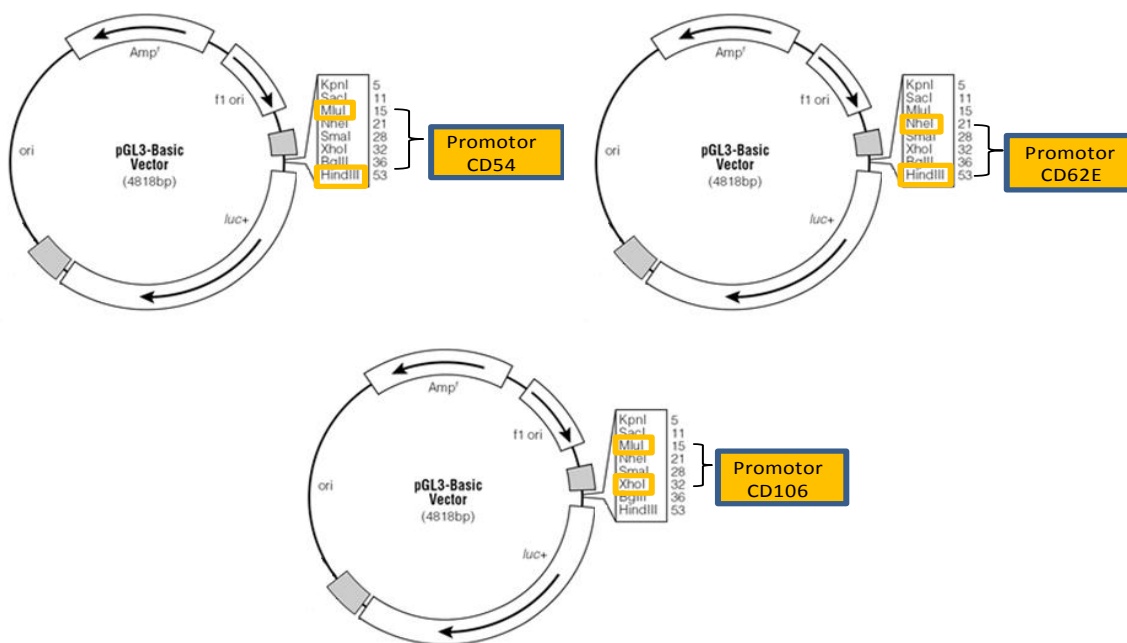
W przypadku przygotowania wektora do wklonowania fragmentu promotora cząsteczki CD54 użyto enzymów MluI i HindIII; fragmentu promotora CD62E – NheI i HindIII, a CD106 – MluI i XhoI. Tak przygotowane plazmidy poddano defosforylacji

według protokołu producenta (FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas) i oczyszczaniu po reakcji enzymatycznej przy pomocy zestawu Clean-up firmy A&A Biotechnology. W powstałe miejsca wprowadzono sekwencje promotorów genów, wyciętych przy pomocy tych samych enzymów restrykcyjnych z wektora pGEM-T easy. Poprawność klonowania insertu do wektora transferowego sprawdzono przez sekwencjonowanie powstałych klonów.

Ligację przeprowadzono przy pomocy T4 DNA ligazy (Fermentas) (Tab.4, Ryc.7).

Tab. 4. Enzymy i bufor użyte do trawienia (Fermentas)

Startery	Enzym	Bufor
CD54/STAT F	MluI	
CD54 F	MluI	R
CD54 R	HindIII	
CD62E/STAT F	NheI	
CD62E F	NheI	Tango
CD62E R	HindIII	
CD106/STAT F	MluI	
CD106 F	MluI	R
CD106 R	XhoI	



Ryc. 7. Schemat klonowania fragmentów promotorów cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106 do wektora reporterowego pGL3 zawierającego gen lucyferazy.

3.3.1.3 Transformacja komórek kompetentnych

Transformację bakterii kompetentnych *E.coli* szczepu DH5 α (Invitrogen) plazmidami stosowanymi w późniejszych doświadczeniach przeprowadzono metodą *heat-shock*. Po rozmrożeniu bakterii kompetentnych do zawiesiny komórek dodawano 2,5 μ l ligacji i inkubowano 30 min. na lodzie. Następnie próby ogrzewano przez 30 sek. w 37°C po czym gwałtownie schłodzono na lodzie. Do mieszaniny dodawano 150 μ l medium SOC i inkubowano przez 1 godz. w 37°C przy ciągłym wytrząsaniu. 20-200 μ l mieszaniny przenoszono na płytkę agarową z LB z dodatkiem ampicyliny, która służyła jako czynnik selekcyjny. Płytki inkubowano w 37°C przez noc, po czym zawieszano pojedynczą kolonię bakteryjną w 3ml medium LB z ampicyliną. Po 8 godz. inkubacji w 37°C z wytrząsaniem bakterie przenoszono do większej objętości pożywki i kontynuowano hodowlę do następnego dnia.

3.3.1.4 Izolacja plazmidowego DNA

3.3.1.4.1 Miniprep

W celu oceny wyizolowanych plazmidów (analiza restrykcyjna, sekwencjonowanie), izolowano plazmidowy DNA z 3ml hodowli bakteryjnej.

Izolację plazmidowego DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu do izolacji z mini-hodowli firmy A&A Biotechnology według protokołu dołączonego przez producenta. Zawiesinę bakterii wirowano przy 4000×g przez 1 min., a osad rozpuszczono w 200µl buforu L1. Następnie prowadzono lizę alkaliczną bakterii używając buforu lizującego (L2), dodawano 400µl buforu GL3 i wirowano (12000×g, 1 min). Supernatant nakładano na kolumnienki i wirowano przez 10 minut przy 10000×g. Po przemyciu roztworem W i A1, z kolumnienek eluowano związane na złożu plazmidowe DNA niewielką objętością sterylnej H₂O. Stężenie plazmidów oznaczano przy użyciu zestawu odczynników i aparatu Quibit. Tak przygotowany plazmidowy DNA poddawano analizie restrykcyjnej a następnie sekwencjonowaniu w Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

3.3.1.4.2 Midiprep

Plazmidowe DNA przeznaczone do transfekcji komórek izolowano przy użyciu zestawu odczynników Midiprep A&A Biotechnology (Polska).

Hodowlę bakteryjną (100ml) wirowano (7500×g, 20min), a następnie osad zawieszano w 5ml roztworu L1. Lizę bakterii prowadzono w 5ml roztworu L2, a następnie neutralizowano dodając 5ml roztworu L3 i nakładano na wkład filtrujący. Po wirowaniu (1500×g, 5min) przesącz nakładano na kolumnę. Po filtracji kolumnę płukano 20 ml roztworu K2. Plazmid eluowano poprzez dodanie 6ml roztworu K3. Plazmidowy DNA wytrącano izopropanolem i wirowano przez 30 min. przy 8000×g. Osad przepłukiwano schłodzonym 70% etanolem, ponownie wirowano, osuszano, a następnie rozpuszczano w 300µl dejonizowanej H₂O.

3.3.2 Transfekcja komórek

Komórki HUVEC transfekowano przy użyciu zestawu odczynników FuGene HD (Roche) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe w ilości 500 tys. komórek na dołek. Po 24-godz. hodowli komórki transfekowano wektorami reporterowymi pGL3 zawierającymi gen lucyferazy świetlika (*Photinus pyralis*) pod kontrolą fragmentów promotorów cząsteczek CD54, CD62E i CD106 zawierających lub niezawierających miejsca potencjalnie wiążące białka STAT3. Wydajność transfekcji oceniano na podstawie luminescencji emitowanej przez lucyferazę pochodzącą z żebroplawa (*Renilla reniformis*) wprowadzoną do komórek przy pomocy wektora referencyjnego pRL-TK.

3.3.3 Pomiar aktywności lucyferazy

Badanie aktywności promotorów badanych cząsteczek przeprowadzono z użyciem zestawu odczynników Dual Luciferase Reporter Assay System (DLR™ Assay Promega) przy pomocy luminometru (Tuner BioSystems, USA).

Po 48 godzinach inkubacji, transfekowane komórki poddawano lizie z użyciem 100 µl *Passive Lysis Buffer* 1×. Pomiar aktywności obu lucyferaz polegał na podaniu odpowiedniego substratu i ocenie intensywności emitowanej luminescencji. Aktywność lucyferazy *Firefly* była wprost proporcjonalna do aktywności promotorów badanych genów. Wyniki przedstawiano jako iloraz wartości pomiarów aktywności lucyferaz *Firefly/Renilla*.

W doświadczeniach analizujących aktywność promotorów wartość luminescencji emitowanej przez komórki kontrolne (pusty plazmid pGL3) przyrównano do 1.

3.4 Badanie miejsc wiążących białko STAT3 w obrębie promotorów genów cząsteczek adhezyjnych

3.4.1 Przygotowanie ekstraktów jądrowych

Ekstrakty białek jądrowych przygotowano według dwuetapowego protokołu. W pierwszym etapie komórki umieszczono w roztworze hipotonicznym, a następnie w roztworze o dużym stężeniu soli. Subkonfluentne hodowle komórek HUVEC (szalka średnicy 10cm) stymulowano przez 3 godziny H6.

Komórki przemywano PBS i trypsynizowano. Osad komórek rozpuszczano w 1ml buforu A (10mM HEPES pH 7,9, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 1mM DTT, 0,1mM inhibitor proteaz) i inkubowano 20 minut na lodzie. Następnie próby intensywnie mieszano, a komórki rozdrabniano przy pomocy strzykawki z igłą insulinową. Próby wirowano przez 2 min. w 4°C przy 7000 rpm. Supernatant zawierający białka cytoplazmatyczne oczyszczano przez wirowanie (13000rpm, 4°C, 20min) i zamrażano w -80°C. Osad, zawierający białka jądrowe, zawieszano w 1ml buforu C (20mM HEPES pH 7,9, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 1mM DTT, 0,1mM inhibitor proteaz) i intensywnie mieszano w 4°C przez 30 min. Następnie próby wirowano (13000rpm, 20min, 4°C) i zamrażano w -80°C. Stężenie białka w próbie oznaczano metodą fluorymetryczną z zastosowaniem Quant-iT™ Protein Assay Kit i aparatu QUBIT quantitation platform (Invitrogen).

3.4.2 Przygotowanie i znakowanie izotopowe sondy

Sondy zsyntetyzowano przez firmę TIB MOLBIOL (Polska). Sekwencja sond odpowiadała miejscom wiązania białek STAT w obrębie promotorów genów cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106 (Tab.5).

Tab. 5. Sekwencje sond użytych w analizie miejsc wiązania białka STAT w obrębie promotorów genów cząsteczek adhezyjnych

Sonda	Sekwencja
<i>CD54F</i>	5' AGG TTT CCG GGA AAG CAG C 3'
<i>CD54R</i>	5' GCT GCT TTC CCG GAA ACC T 3'
<i>CD62EF</i>	5' TGG ATA TTC CCG GGA AAG TT 3'
<i>CD62ER</i>	5' AAC TTT CCC GGG AAT ATC CA 3'
<i>CD106F</i>	5' TTT ATC TTT CCA GTA AAG AT 3'
<i>CD106R</i>	5' ATC TTT ACT GGA AAG ATA AA 3'

Każdą nić oligonukleotydu rozpuszczano w wodzie wolnej od RNaz do stężenia 100pM/ μ l i pozostawiano na lodzie przez 30 minut. Następnie mieszano obie nici i pozostawiano w termobloku w 95°C przez 10 min. Wyznakowane sondy przenoszono następnie do temp. pokojowej.

Sondy znakowano przy użyciu izotopu α^{32} P-dATP i polimerazy Klenowa poprzez 30 min. inkubacją w 37°C. Przygotowane sondy oczyszczano z niezwiązanych nukleotydów (Mini Quick Spin Columns, Roche)

3.4.3 Przygotowanie próbek do elektroforezy

Próby do elektroforezy przygotowano według następującego protokołu:

Do próbki dodawano 10 μ g białka z ekstraktów jądrowych, 12 μ l mieszaniny reakcyjnej (4 μ l buforu wiążącego, 2 μ l BSA, 6 μ l H₂O) 1 μ l polyIdC (2 μ g/ μ l), 1,5 μ l H₂O i inkubowano 20 min. w temp. pokojowej. Następnie dodawano 1,5 μ l izotopowo znakowanej sondy i inkubowano w temp. pokojowej przez 45 min. W przypadku eksperymentu retardacji żelowej ze swoistymi przeciwciałami anti-STAT3 (supershift assay), przeciwciała dodawano do prób przed dodaniem radioaktywnie znakowanej sondy i przeprowadzano dodatkową inkubację przez godz. w temp. pokojowej (stosunek ekstraktu jądrowego do przeciwciała 2:1).

3.4.4 Elektroforeza próbek

Do rozdzielania elektroforetycznego użyto 4% żelu poliakryloamidowego w stosunku akryloamidu do bisakryloamidu 19:1. Próby rozdzielano w 0,5x buforze TBE (250mM TrisHCl, 1,9M glicyna, 10mM EDTA) w 4°C (niska temperatura zwiększa stabilność kompleksów białko-sonda). Następnie żel suszono w próżni (80°C, 45 min.) i poddawano autoradiografii w -80°C przez 24 godz. (klisze Kodak).

3.5 Analiza wpływu H6 na adhezję i transmigrację limfocytów

3.5.1 Izolacja limfocytów

Komórki jednojądrzaste izolowano z 10 ml krwi żyłnej zdrowych dawców metodą separacji w gradiencie Ficollu.

W celu oddzielenia limfocytów od monocytów i makrofagów, wykorzystano zdolność komórki zawieszono w medium RPMI i posiewano na 10cm płytkę Petriego. Po godzinnej inkubacji w 37°C pobierano supernatant zawierający limfocyty.

3.5.2 Znakowanie limfocytów

Do znakowania limfocytów użyto barwnika fluorescencyjnego PKH26 o długości fali widma emisyjnego 567 nm (SigmaAldrich) według procedury dostarczonej przez producenta. PKH26 łączy się z ogonami lipidowymi na powierzchni błony komórkowej.

3.5.3 Test adhezji

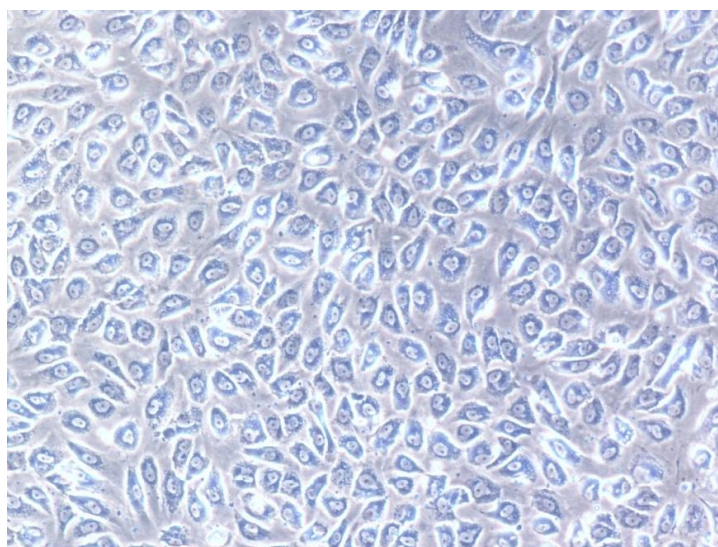
Komórki HUVEC nakładano na płytki 48 dołkowe w liczbie 50 tys. na dołek i hodowano do dnia następnego, po czym do hodowli dodawano IL-6 lub w stężeniu 30ng/ml. Następnie na aktywowane komórki HUVEC nakładano wyznakowane limfocyty ilości 5 limfocytów na 1 komórkę śródbłonka. Adhezję komórek analizowano w różnych odstępach czasowych: 30 minut, 1 godzina, 15 godzin. Po inkubacji komórki odpłukiwano przy pomocy PBS. Adhezję limfocytów do komórek śródbłonka oceniano

w mikroskopie fluorescencyjnym (Nikon..). Ocenę ilościową prowadzono w cytometrze przepływowym (FACS, BD Biosciences). Przed analizą cytometryczną, komórki adherentne odtrawiano od podłoża trypsyną w celu uzyskania pojedynczych komórek w zawieszynie [122]. Doświadczenie powtarzono 3-krotnie.

4 WYNIKI

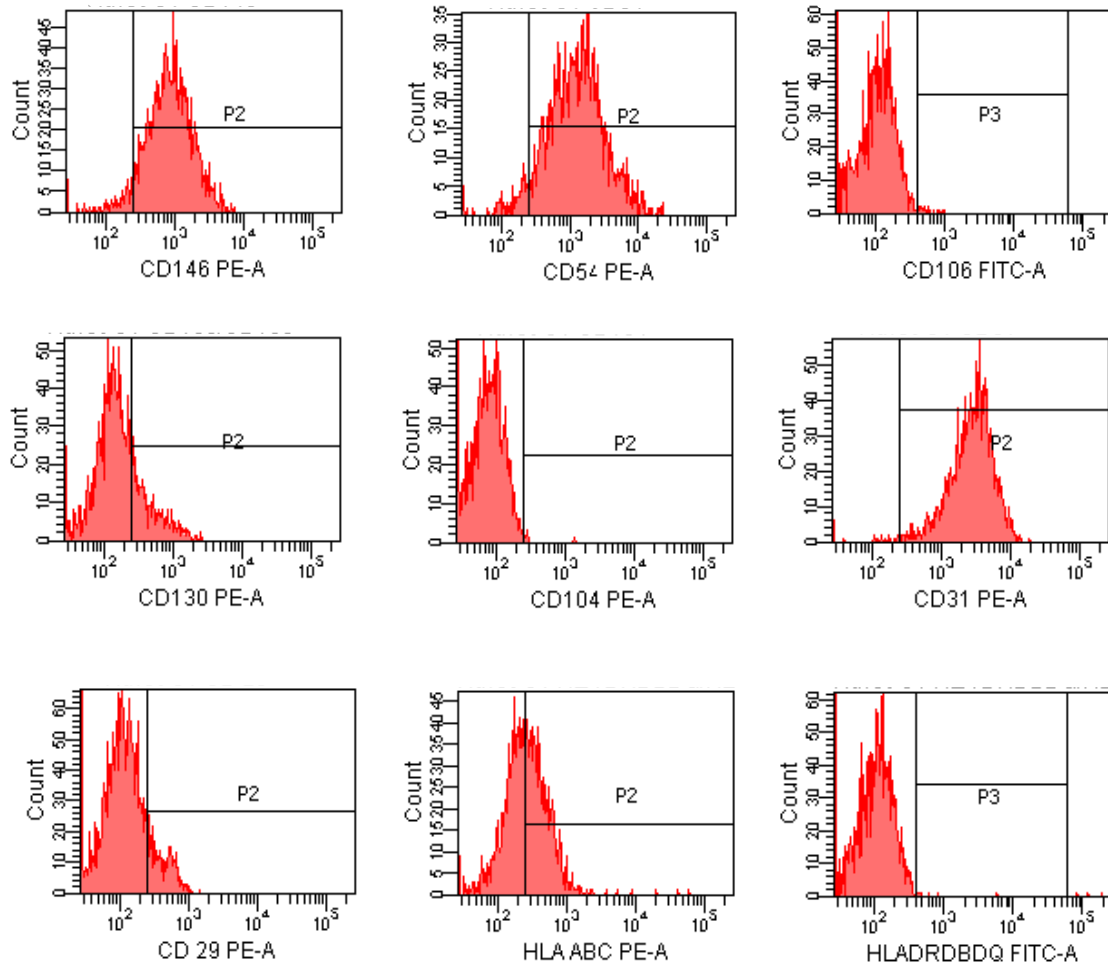
4.1 Analiza fenotypowa komórek śródbłónka

W hodowli pierwotnej komórki śródbłónka po 5 dniach uzyskały konfluentną, pojedynczą warstwę. Na rycinie 8 przedstawiono morfologię hodowanych komórek.

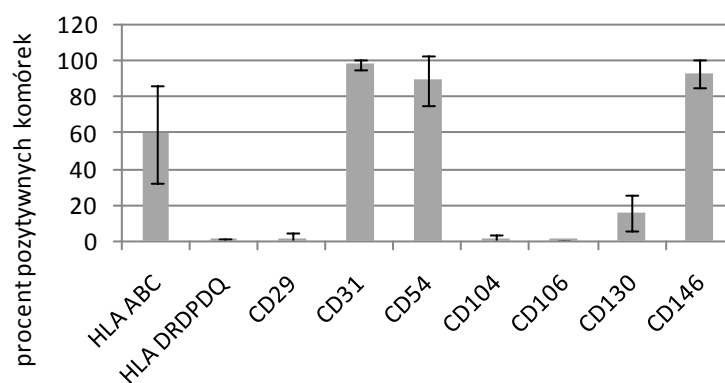


Ryc. 8. Obraz z mikroskopu kontrastowo-fazowego przedstawiający hodowlę pierwotną HUVEC (powiększenie 4x).

Po uwolnieniu komórek HUVEC z naczyń hodowlanych, oceniano ekspresję charakterystycznych antygenów powierzchniowych. Stwierdzono: wzrost intensywności fluorescencji oraz odsetek komórek reagujących z przeciwciałami: CD146, CD54, CD130, CD31, CD29, HLA ABC (Ryc.9). Największą ekspresję obserwowano w przypadku antygenów CD31, CD146 i CD54, pośrednią dla: CD130, CD29, HLA ABC. Nie stwierdzono obecności antygenów CD106, CD104 i HLA DRDPDQ (Ryc.9,10).



Analiza fenotypowa komórek HUVEC

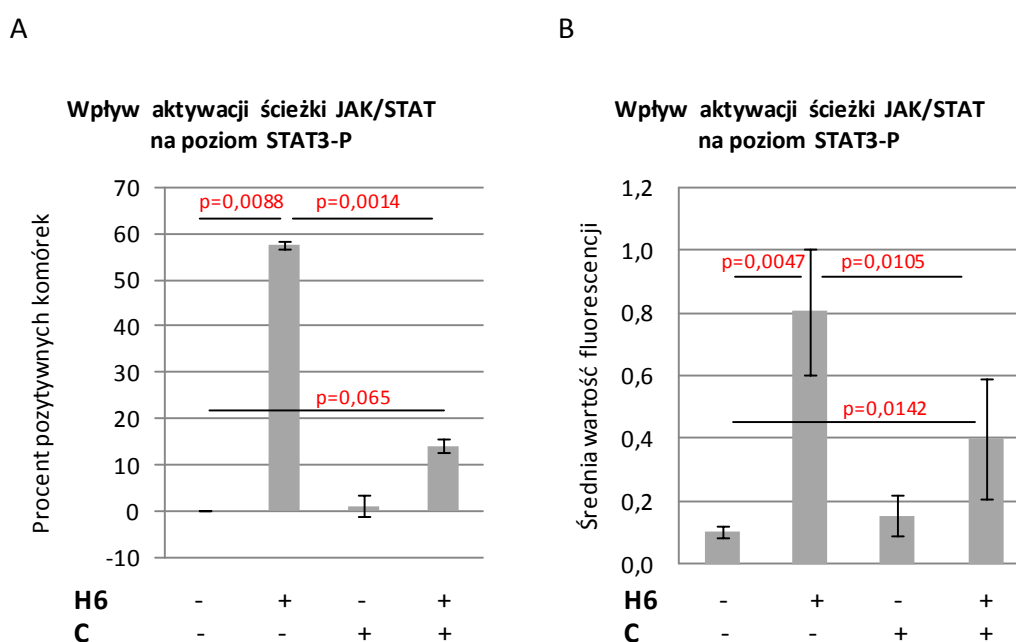


Ryc. 10. Ilościowa analiza ekspresji charakterystycznych antygenów powierzchniowych komórek HUVEC

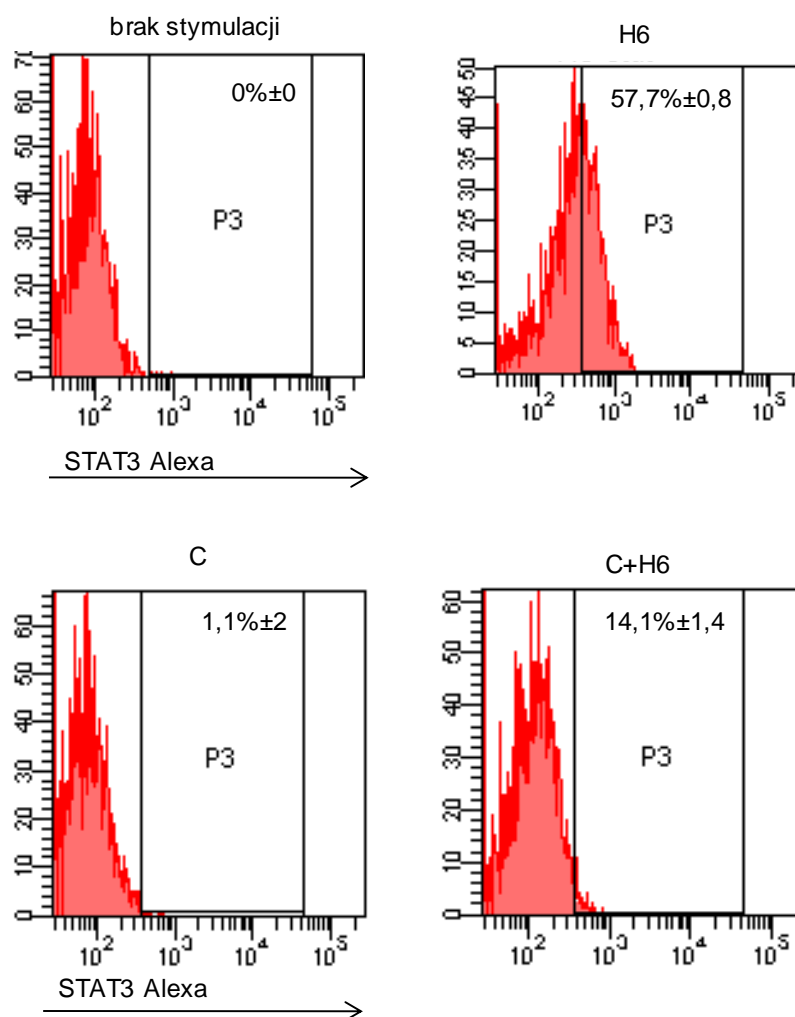
Wyniki przedstawione na wykresie stanowią średnią ze wszystkich wykonanych izolacji \pm SD.

Wpływ H6 na poziom ufosforylowanego białka STAT3

Inkubacja komórek HUVEC z H6 spowodowała istotny statystycznie wzrost poziomu fosforylacji białka STAT3 (Ry.11). Podanie kukurbitacyny w wysokim stopniu zahamowało fosforylację białka STAT3. Z kolei podanie H6 na zahamowaną ścieżkę JAK/STAT nie skutkowało istotnym statystycznie wzrostem poziomu fosforylacji analizowanego białka (procentu STAT3-P pozytywnych komórek).



Ryc. 11. Analiza ilościowa aktywacji ścieżki sygnałowej JAK/STAT na poziom wewnątrzkomórkowego poziomu ufosforylowanego białka STAT3 (STAT3-P) w komórkach HUVEC. A - procent STAT3-P pozytywnych komórek, B – średnia wartość fluorescencji komórek. H6 – aktywator ścieżki JAK/STAT, C – kukurbitacyna, inhibitor ścieżki JAK/STAT. Wyniki stanowią średnią z trzech doświadczeń \pm SD. W analizie średniej wartości fluorescencyjnej odjęto wartości MFI komórek nieznakowanych w celu bardziej przejrzystej wizualizacji wyników.



Ryc. 12. Analiza cytometryczna wewnątrzkomórkowego poziomu ufosforylowanego białka STAT3 w komórkach HUVEC poddanych działaniu aktywatora i inhibitora ścieżki JAK/STAT.

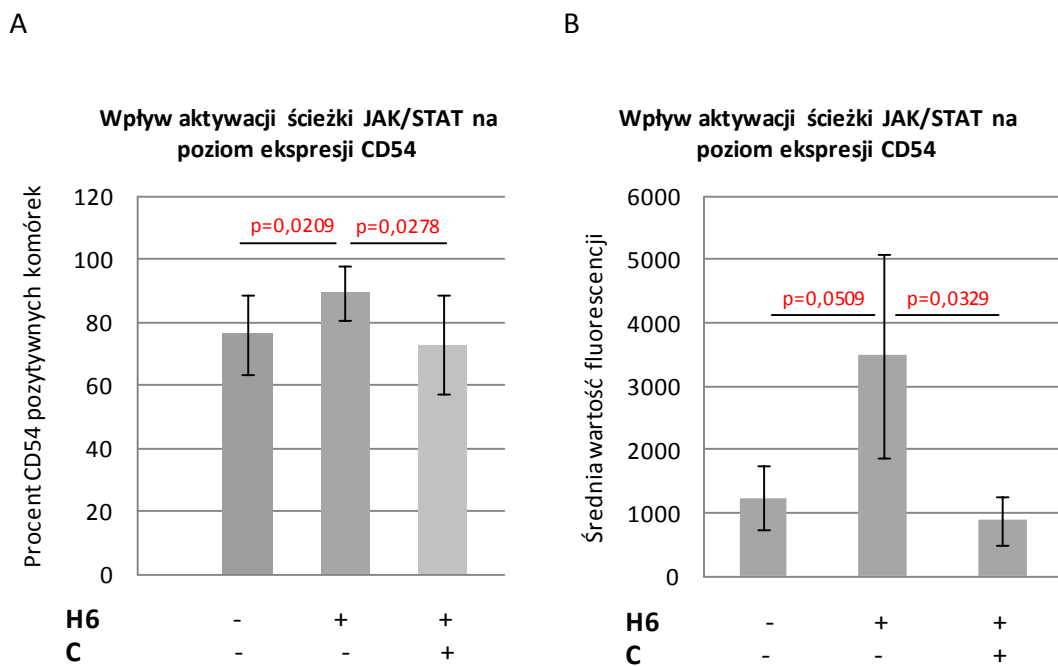
H6 – komórki poddane półgodzinnej inkubacji z H6; C – komórki poddane 15 minutowej inkubacji z kukurbitacyną; C+H6 – komórki poddane 15 minutowej inkubacji z kukurbitacyną, a po zahamowaniu ścieżki JAK/STAT półgodzinnej stymulacji przy pomocy Hyperinterleukiny-6

4.2 Wpływ aktywacji ścieżki JAK/STAT na poziom ekspresji antygenów na powierzchni śródbłónka naczyń

W doświadczeniu tym oceniano ekspresję antygenów CD54, CD62E i CD106 na powierzchni komórek HUVEC po stymulacji H6. W celu potwierdzenia udziału ścieżki JAK/STAT w regulacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych śródbłónka, przed dodaniem H6 przeprowadzono godziną inkubację komórek HUVEC z kukurbitacyną. Następnie podano H6 na 24 godziny. Dzięki preinkubacji wyeliminowano możliwość pobudzenia ścieżki sygnałowej JAK/STAT i w związku z tym regulacji ekspresji zależnych od niej genów.

Analiza cytometryczna komórek śródbłónka stymulowanych H6 wykazała istotne statystycznie zmiany ekspresji trzech analizowanych cząsteczek adhezyjnych.

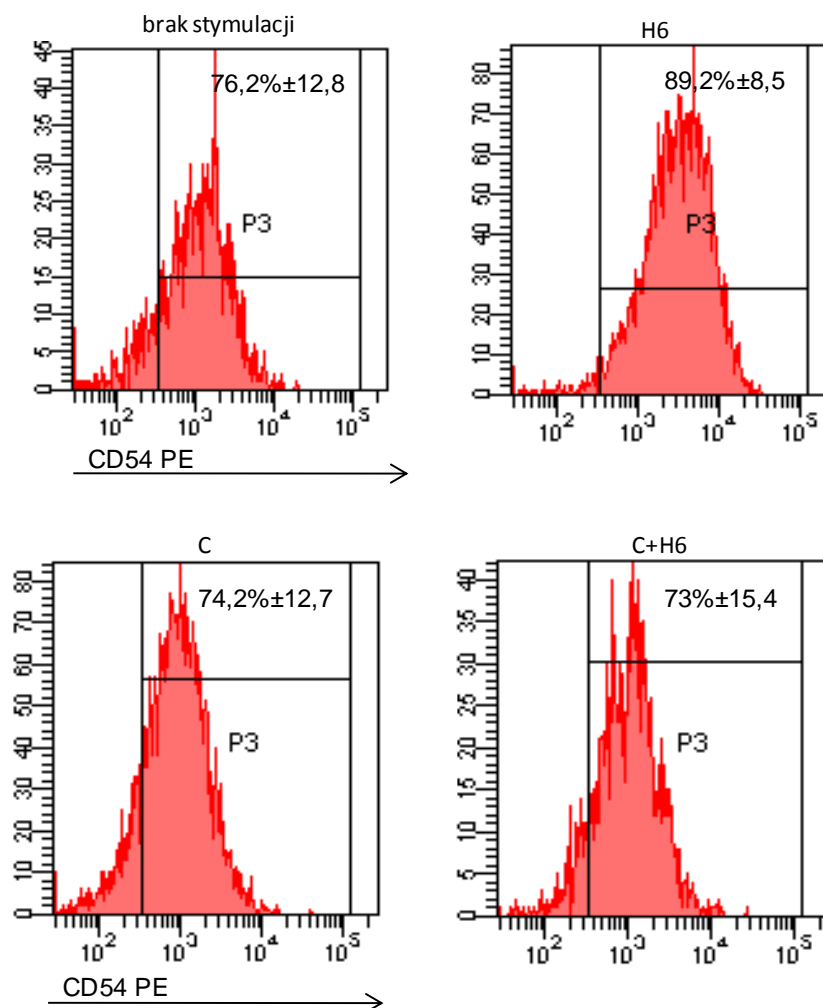
H6 spowodowała istotny statystycznie, ponad 3-krotny wzrost ekspresji antygeny CD54 na powierzchni śródbłónka naczyń. Przy preinkubacji komórek z kukurbitacyną nie zaobserwowano wzrostu poziomu ekspresji antygeny CD54 na powierzchni komórek po dodaniu H6 (Ryc.13,14).



Ryc. 13. Analiza ilościowa aktywacji ścieżki sygnałowej JAK/STAT na poziom ekspresji antygeny CD54 na powierzchni śródbłonna naczyń.

A – odsetek komórek CD54 pozytywnych, B – średnia wartość fluorescencji komórek HUVEC poddanych działaniu aktywatora: H6 i inhibitora: C ścieżki JAK/STAT.

Wyniki wyrażono jako średnią z trzech doświadczeń \pm SD. W analizie średniej wartości fluorescencyjnej odjęto wartości MFI komórek nieznakowanych w celu bardziej przejrzystej wizualizacji wyników.

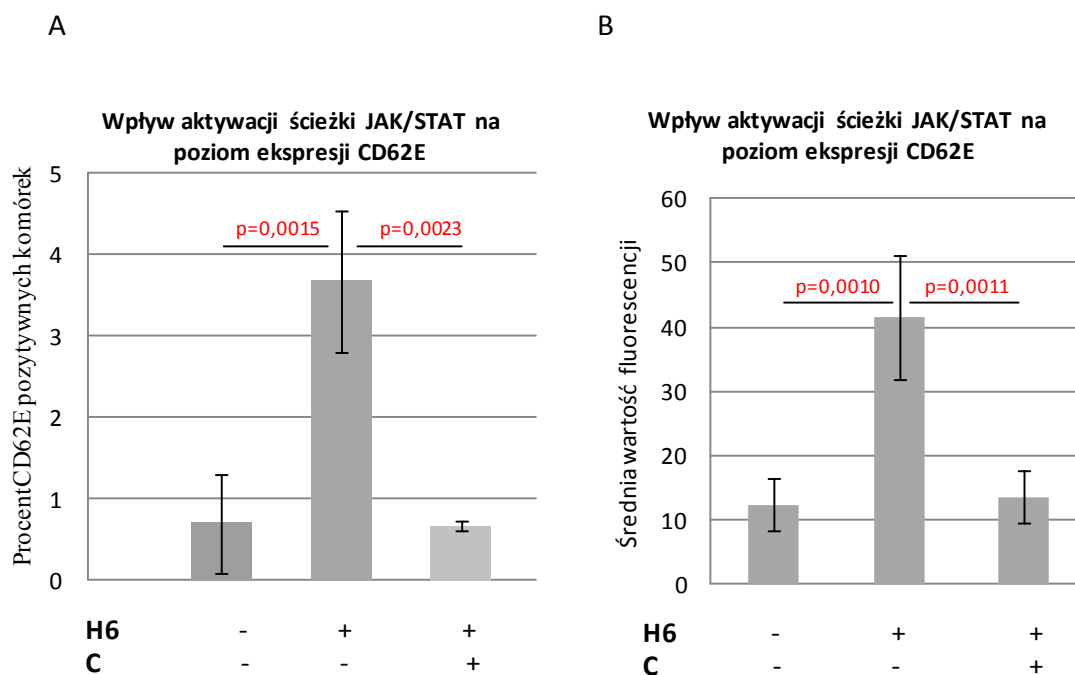


Ryc. 14 Analiza cytometryczna poziomu antygenu CD54 na powierzchni komórek HUVEC poddanych działaniu aktywatora i inhibitora ścieżki JAK/STAT.

H6 – komórki poddane 24-godzinnej inkubacji z Hyperinterleukiną-6; C – komórki poddane godzinnej inkubacji z kukurbitacyną; C+H6 – komórki poddane godzinnej inkubacji z kukurbitacyną, a po zahamowaniu ścieżki JAK/STAT stymulacji przy pomocy Hyperinterleukiny-6.

Podobne wyniki otrzymano w przypadku dwóch pozostałych analizowanych antygenów: CD62E i CD106.

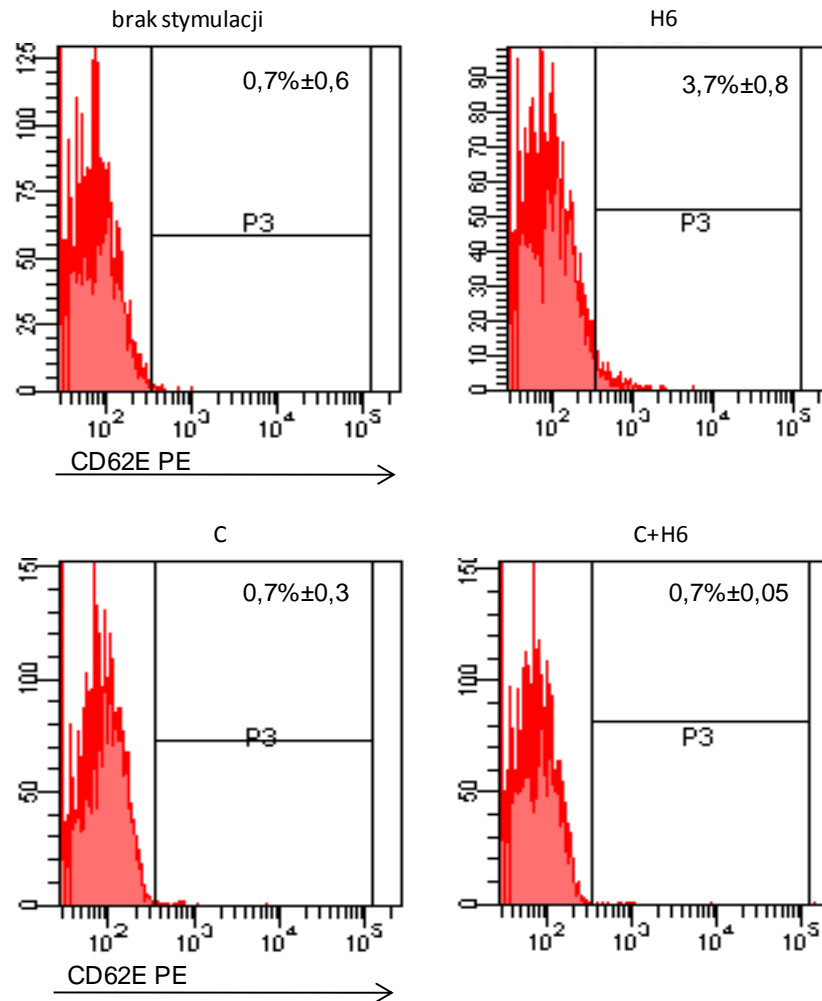
Inkubacja z H6 spowodowała 3-krotny wzrost poziomu ekspresji antygeny CD62E. Z kolei w obecności inhibitora ścieżki JAK/STAT nie obserwowano istotnego statystycznie wzrostu poziomu ekspresji powyższego antygeny (Ryc.15,16).



Ryc. 15. Analiza ilościowa aktywacji ścieżki sygnałowej JAK/STAT na poziom ekspresji antygeny CD62E na powierzchni śródbłónka naczyń.

A - odsetek CD62E pozytywnych komórek, B – średnia wartość fluorescencji komórek HUVEC poddanych działaniu aktywatora (H6) i inhibitora (kukurbitacyny – C) ścieżki JAK/STAT.

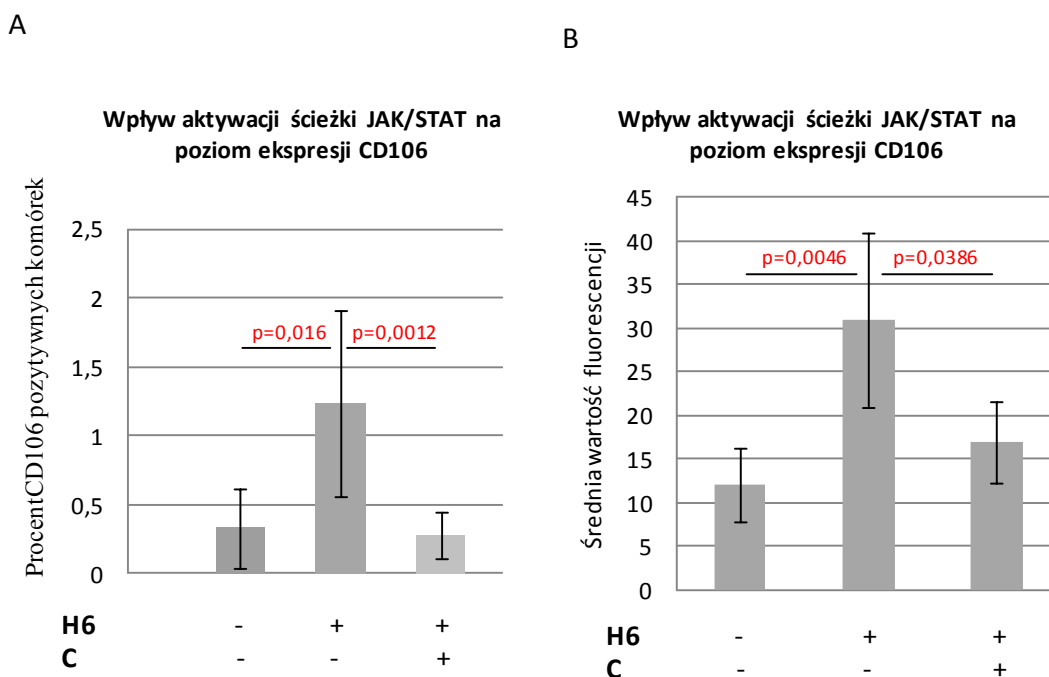
Wyniki wyrażono jako średnią z trzech doświadczeń \pm SD. W analizie średniej wartości fluorescencyjnej odjęto wartości MFI komórek nieznakowanych w celu bardziej przejrzystej wizualizacji otrzymanych wyników.



Ryc. Analiza cytometryczna poziomu antygenu CD62E na powierzchni komórek HUVEC poddanych działaniu aktywatora i inhibitora ścieżki JAK/STAT.

H6 – komórki poddane 24-godzinnej inkubacji z H6; C – komórki poddane godzinnej inkubacji z kukurbitacyną; C+H6 – komórki poddane godzinnej inkubacji z kukurbitacyną, a po zahamowaniu ścieżki JAK/STAT stymulacji przy pomocy Hyperinterleukiny-6

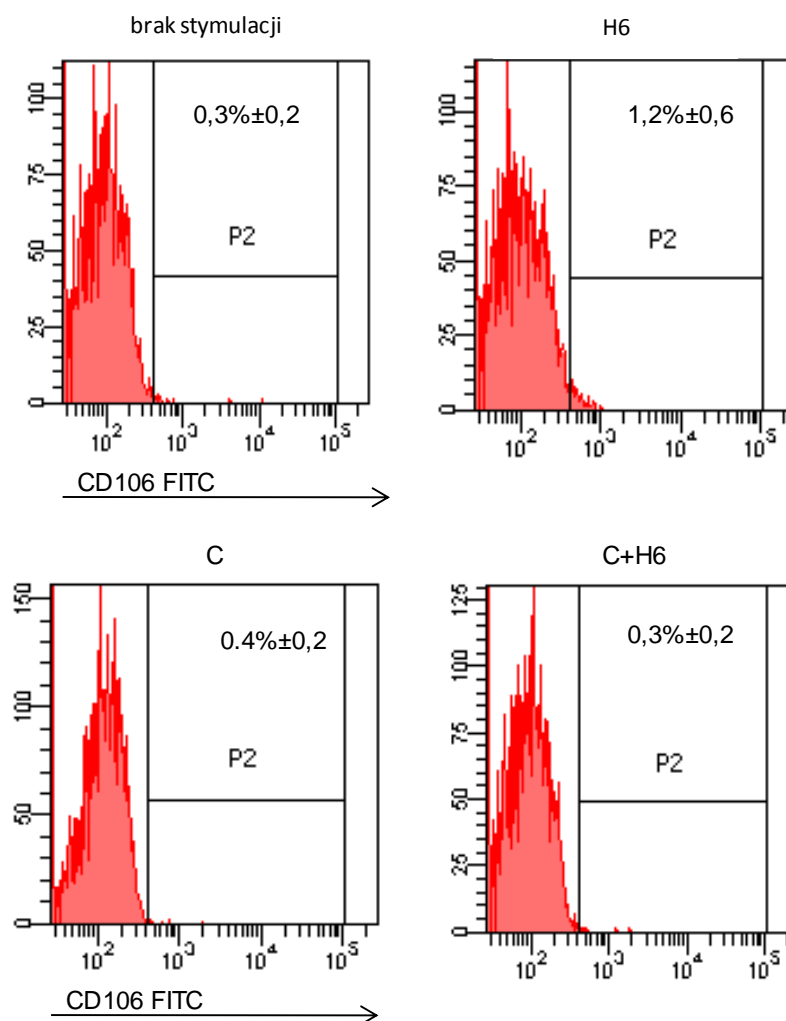
Po stymulacji komórek HUVEC H6 zaobserwowano ok.1,5-krotny wzrost poziomu ekspresji antygenu CD106 na ich powierzchni. Podobnie jak w przypadku CD54 i CD106, po zahamowaniu ścieżki JAK/STAT, H6 nie wpłynęła na istotną statystycznie zmianę poziomu ekspresji badanego antygenu.



Ryc. 17. Analiza ilościowa aktywacji ścieżki sygnałowej JAK/STAT na poziom ekspresji antygenu CD106 na powierzchni śródbłónka naczyń.

A - procent CD106 pozytywnych komórek, B – średnia wartość fluorescencji komórek HUVEC poddanych działaniu aktywatora (H6) i inhibitora (kukurbitacyny – C) ścieżki JAK/STAT.

Wyniki wyrażono jako średnią z trzech doświadczeń \pm SD. W analizie średniej wartości fluorescencyjnej odjęto wartości MFI komórek nieznakowanych w celu bardziej przejrzystej wizualizacji otrzymanych wyników.



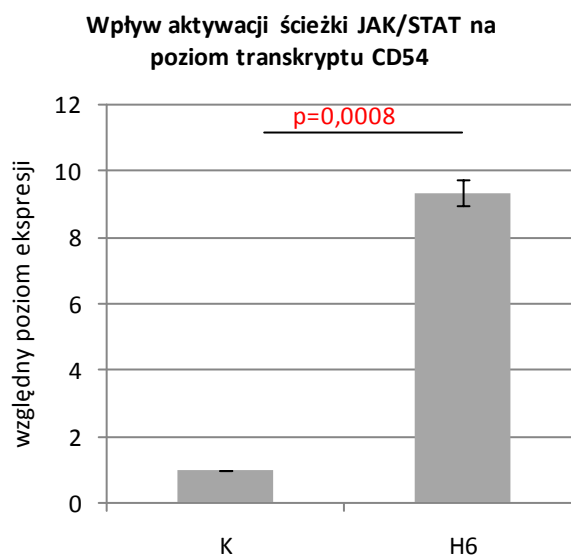
Ryc. Analiza cytometryczna poziomu antygenu CD106 na powierzchni komórek HUVEC poddanych działaniu aktywatora i inhibitora ścieżki JAK/STAT.

H6 – komórki poddane 24-godzinnej inkubacji z Hyperinterleukiną-6; C – komórki poddane godzinnej inkubacji z kukurbitacyną; C+H6 – komórki poddane godzinnej inkubacji z kukurbitacyną, a po zahamowaniu ścieżki JAK/STAT stymulacji przy pomocy Hyperinterleukiny-6

4.3 Wpływ aktywacji ścieżki JAK/STAT na poziom transkryptów antygenów CD54, CD62E i CD106

Wpływ aktywacji ścieżki sygnałowej JAK/STAT na poziom transkryptów antygenów CD54, CD62E i CD106 badano poprzez 3-godziną inkubację komórek HUVEC z H6. Poziom transkryptów cząsteczek adhezyjnych oznaczano metodą RT-qPCR z zastosowaniem swoistych starterów i normalizowano względem mRNA genu referencyjnego - PBGD.

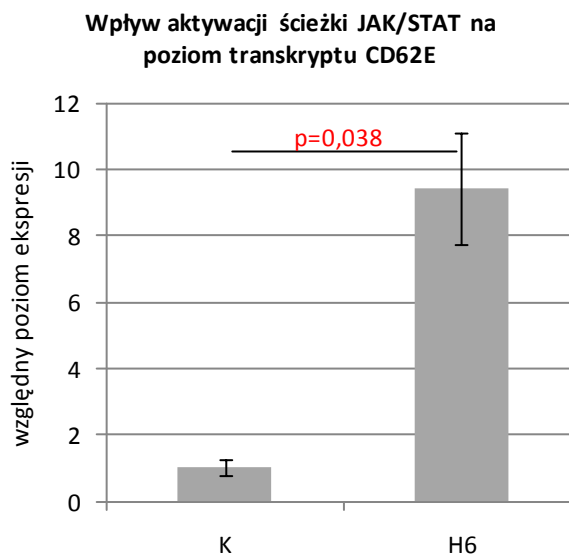
W wyniku 3-godzinnej inkubacji komórek z H6 zaobserwowano istotny statystycznie, ponad 6-krotny wzrost poziomu transkryptu CD54 (Ryc.19).



Ryc.19. Wpływ aktywatora ścieżki JAK/STAT – H6, na poziom transkryptu CD54

Komórki śródbłónka naczyń inkubowano przez 3 godziny z 10ng/ml Hyperinterleukiny-6 (H6) i porównywano względem komórek nie poddanych działaniu substancji stymulującej (K). Wpływ badanej substancji na poziom transkryptu CD54 określono metodą RT-qPCR i normalizowano względem genu referencyjnego PBGD. Wyniki wyrażono jako średnią z 4 doświadczeń \pm SD.

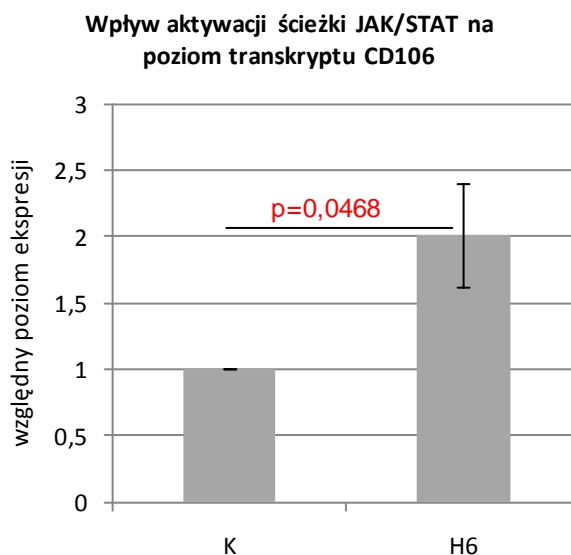
Podobne wyniki otrzymano w przypadku antygenu CD62E. 3 godzinna inkubacja komórek z H6 przyczyniła się do istotnego statystycznie, ponad dziewięciokrotnego wzrostu poziomu transkryptu CD62E (Ryc.20).



Ryc. 20. Wpływ aktywatora ścieżki JAK/STAT – H6, na poziom transkryptu CD62E

Komórki śródbłónka naczyń inkubowano przez 3 godziny z 10ng/ml Hyperinterleukiny-6 (H6) i porównywano względem komórek nie poddanych działaniu substancji stymulującej (K). Wpływ badanej substancji na poziom transkryptu CD62E określono metodą RT-qPCR i normalizowano względem genu referencyjnego PBGD. Wyniki wyrażono jako średnią z 4 doświadczeń ±SD.

W przypadku cząsteczki CD106 w komórkach HUVEC zaobserwowano ok. 2-krotny wzrost ekspresji swoistego mRNA po stymulacji H6 (Ryc.21).



Ryc. 21. Wpływ aktywatora ścieżki JAK/STAT – H6, na poziom transkryptu CD106

Komórki śródbłonna naczyń inkubowano przez 3 godziny z 10ng/ml H6 i porównywano względem komórek nie poddanych działaniu substancji stymulującej (K). Wpływ badanej substancji na poziom transkryptu CD106 określono metodą RT-qPCR i normalizowano względem genu referencyjnego PBGD. Wyniki wyrażono jako średnią z 4 doświadczeń \pm SD.

4.4 Analiza aktywności transkrypcyjnej promotorów antygenów CD54, CD62E i CD106

4.4.1 Analiza komputerowa fragmentów promotorów antygenów CD54, CD62E i CD106

Za pomocą programu TFSEARCH, wersja 1.3, przeprowadzono analizę 1000-nukleotydowych fragmentów promotorów cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106 w celu ustalenia, czy czynniki transkrypcyjne STAT3 wiążą się w obrębie sekwencji analizowanych promotorów.

Analiza sekwencji fragmentów promotorów cząsteczek adhezyjnych wykazała miejsca wiązania białek STAT w obrębie wszystkich analizowanych cząsteczek. W przypadku promotora cząsteczki CD54, białka STAT wiążą się w regionie 35-44 nt przed miejscem startu transkrypcji, cząsteczki CD62E 151-161 nt przed miejscem startu transkrypcji a dla cząsteczki CD106 245-253 nt przed miejscem startu transkrypcji (Ryc.22).

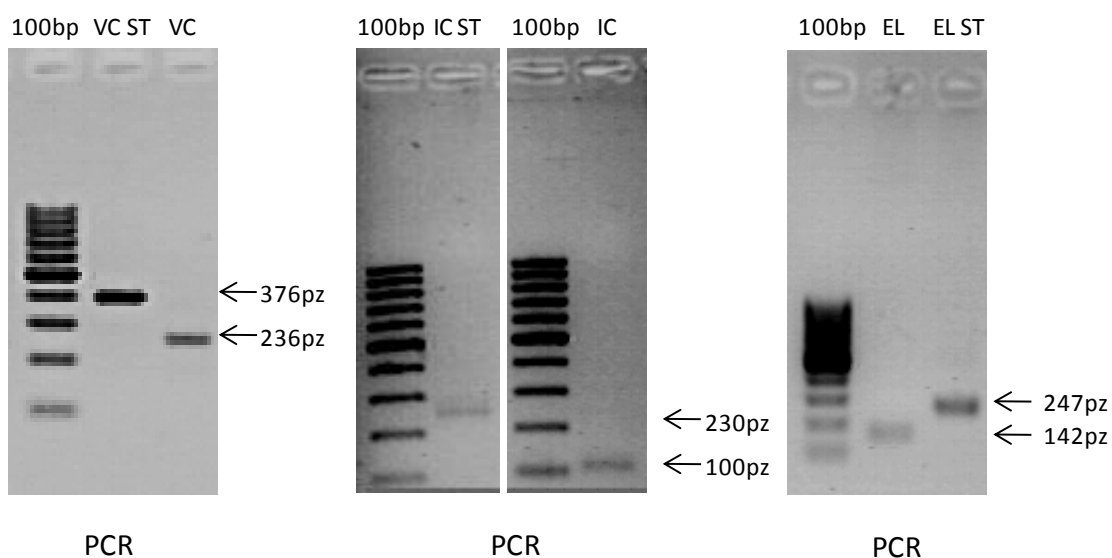
A	CGAGGTTTCC GGGAAAGCAG CACCGCCCCT TGGCCCCCAG GTGGCTAGCG	entry	score
	<----->	M00223 STATx	100.0
	<----->	M00223 STATx	93.3
	<----->	M00147 HSF2	86.5
	<----->	M00008 Sp1	86.3
	<----->	M00032 c-Ets-	86.3
	<----->	M00087 Ik-2	85.5
	<----->	M00073 deltaE	85.2
B	AGTTTCTGAC ATCATTGTAA TTTTAAGCAT CGTGGATATT CCCGGGAAAG	entry	score
	<----->	M00088 Ik-3	91.1
	<----->	M00054 NF-kap	89.4
	<----->	M00075 GATA-1	88.2
	<----->	M00052 NF-kap	88.1
	<----->	M00136 Oct-1	88.1
	<----->	M00041 CRE-BP	87.8
	<----->	M00223 STATx	87.5
	<----->	M00223 STATx	87.5
	<----->	M00101 CdxA	87.1
C	ATTGGATTCA GAAAGCTTCA TTCTGCAATC AGCATTGTCC TTTATCTTTC	entry	score
	<----->	M00223 STATx	89.4
	<----->	M00075 GATA-1	88.6
	<----->	M00100 CdxA	88.5
	<----->	M00116 C/EBPa	88.0
	<----->	M00077 GATA-3	87.5
	<----->	M00109 C/EBPb	87.4
	<----->	M00126 GATA-1	87.3
	<----->	M00128 GATA-1	87.2
	<----->	M00127 GATA-1	86.7
	<----->	M00203 GATA-X	86.3
	<----->	M00100 CdxA	85.9
	<----->	M00117 C/EBPb	85.6
	CAGTAAAGAT AGCCTTTTGG AGTCGAAGAT GAGGAAAAGC CTGTATTTTA	entry	score
	<----->	M00216 TATA	95.0
	<----->	M00101 CdxA	92.9
	<----->	M00076 GATA-2	89.7
<----->	M00252 TATA	89.5	
<----->	M00223 STATx	89.4	
<----->	M00126 GATA-1	87.3	
<----->	M00100 CdxA	87.2	
<----->	M00127 GATA-1	86.7	
<----->	M00101 CdxA	86.4	

Ryc. 22. Analiza promotorów cząsteczek adhezyjnych CD54 (A), CD62E (B), CD106 (C) przy pomocy programu TF Search wersja 1.3 w celu poszukiwania miejsc wiązania białek STAT.

Analiza komputerowa wykazała obecność miejsc wiążących białka STAT we wszystkich badanych cząsteczkach (zaznaczone na żółto) w różnych lokalizacjach od miejsca inicjacji transkrypcji.

4.4.2 Konstrukcja wektorów reporterowych

W pierwszym etapie tworzenia wektorów reporterowych zawierających fragmenty promotorów cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106 połączono produkty PCR (wytrawione z wektora przejściowego pGEM-Teasy) z właściwymi miejscami restrykcyjnymi wektora pGL3. Wielkość uzyskanych produktów reakcji PCR analizowano w 2% żelu agarozowym względem markera masy DNA i przedstawiono na Ryc. 23.

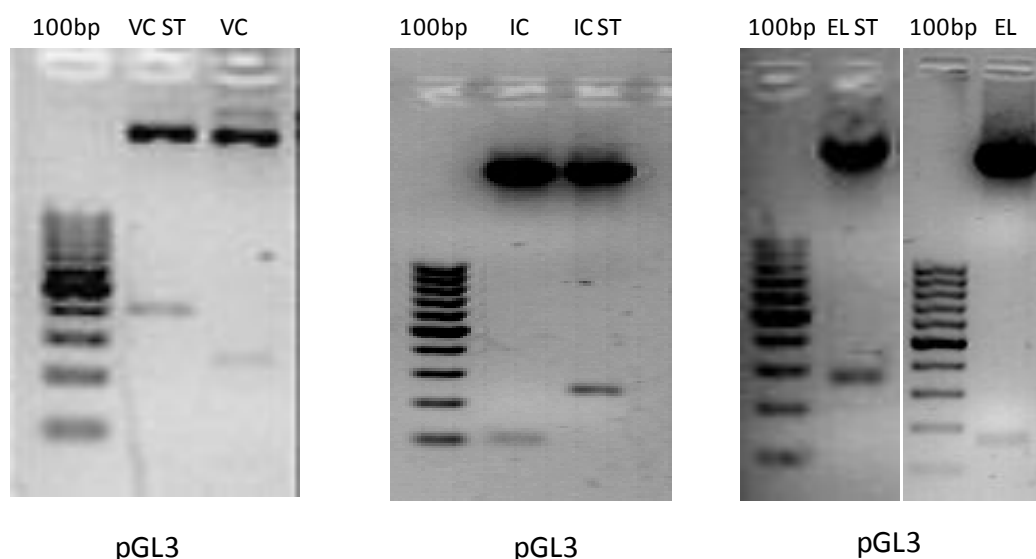


Ryc. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR

100bp – marker 100bp (Fermentas), VC ST-fragment promotora CD106 wiążący białko STAT (376 pz), VC –fragment promotora CD106 bez miejsca wiązania białka STAT (236 pz), IC ST-fragment promotora CD54 wiążący białko STAT (230 pz), IC- fragment promotora CD54 bez miejsca wiązania białka STAT (100 pz), EL ST-fragment promotora CD62E wiążący białko STAT (247 pz), EL- fragment promotora CD62E bez miejsca wiązania białka STAT (142 pz).

W wektorze przejściowym pGEM-Teasy utworzono fragmenty z odpowiednimi miejscami restrykcyjnymi, umożliwiającymi uzyskanie końcowego konstruktów wektora reporterowego pGL3. W celu potwierdzenia prawidłowo zrekombinowanych plazmidów i braku mutacji we wklonowanych fragmentach, wektory poddano sekwencjonowaniu.

Następnie fragment promotora wytrawiono z wektora przejściowego pGEM t-easy i wklonowano do wektora reporterowego pGL3 zawierającego gen lucyferazy pod fragmentami promotorów cząsteczek adhezyjnych zawierających i niezawierających miejsca wiązania białek STAT. Przeprowadzona analiza restrykcyjna i sekwencjonowanie potwierdziły poprawność powstałego konstruktów (Ryc.24).

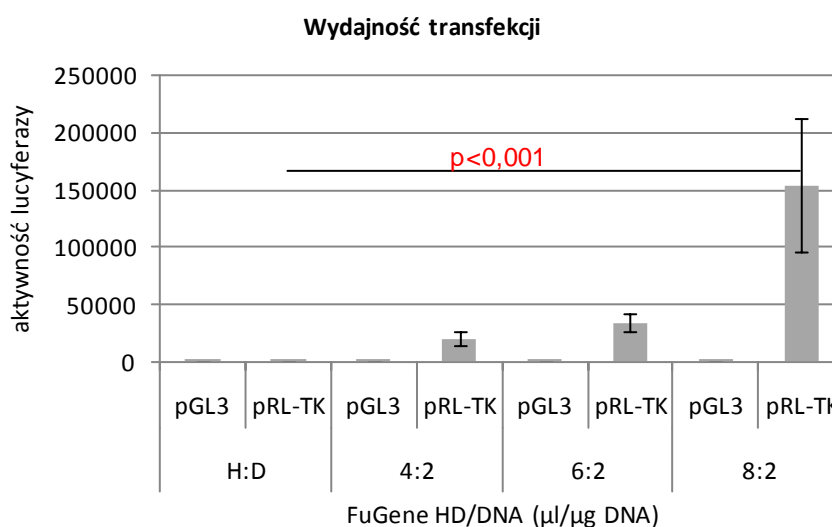


Ryc. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia wektora pGL3 zawierającego fragmenty promotorów badanych genów

100bp – marker 100bp (Fermentas), VC ST-fragment promotora CD106 wiążący białko STAT, VC –fragment promotora CD106 bez miejsca wiązania białka STAT, IC ST- fragment promotora CD54 wiążący białko STAT, IC- fragment promotora CD54 bez miejsca wiązania białka STAT, EL ST-fragment promotora CD62E wiążący białko STAT, EL- fragment promotora CD62E bez miejsca wiązania białka STAT

4.4.3 Wpływ H6 na aktywność transkrypcyjną promotorów cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106.

Komórki linii pierwotnej śródbłonna naczyń stansfekowano wektorem reporterowym pGL3 zawierającym gen lucyferazy pod kontrolą fragmentów ludzkich promotorów cząsteczek adhezyjnych. Do transfekcji użyto sześciu różnych wektorów: CD54 – fragment promotora cząsteczki CD54 niezawierający miejsca wiązania białka STAT, CD54 STAT - fragment promotora cząsteczki CD54 zawierający miejsce wiązania białka STAT, CD62E - fragment promotora cząsteczki CD62E nie zawierający miejsca wiązania białka STAT, CD62E STAT - fragment promotora cząsteczki CD62E zawierający miejsce wiązania białka STAT, CD106 - fragment promotora cząsteczki CD106 niezawierający miejsca wiązania białka STAT, CD106 STAT - fragment promotora cząsteczki CD106 zawierający miejsce wiązania białka STAT. Najwyższą wydajność transfekcji uzyskano przy proporcji odczynnika transfekcyjnego do DNA 8:2 (μl FuGene: μg DNA) (Ryc. 25).

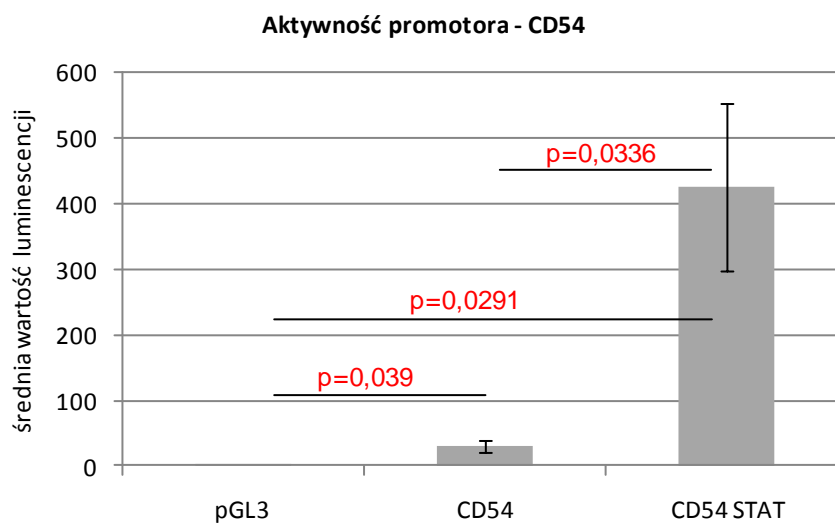


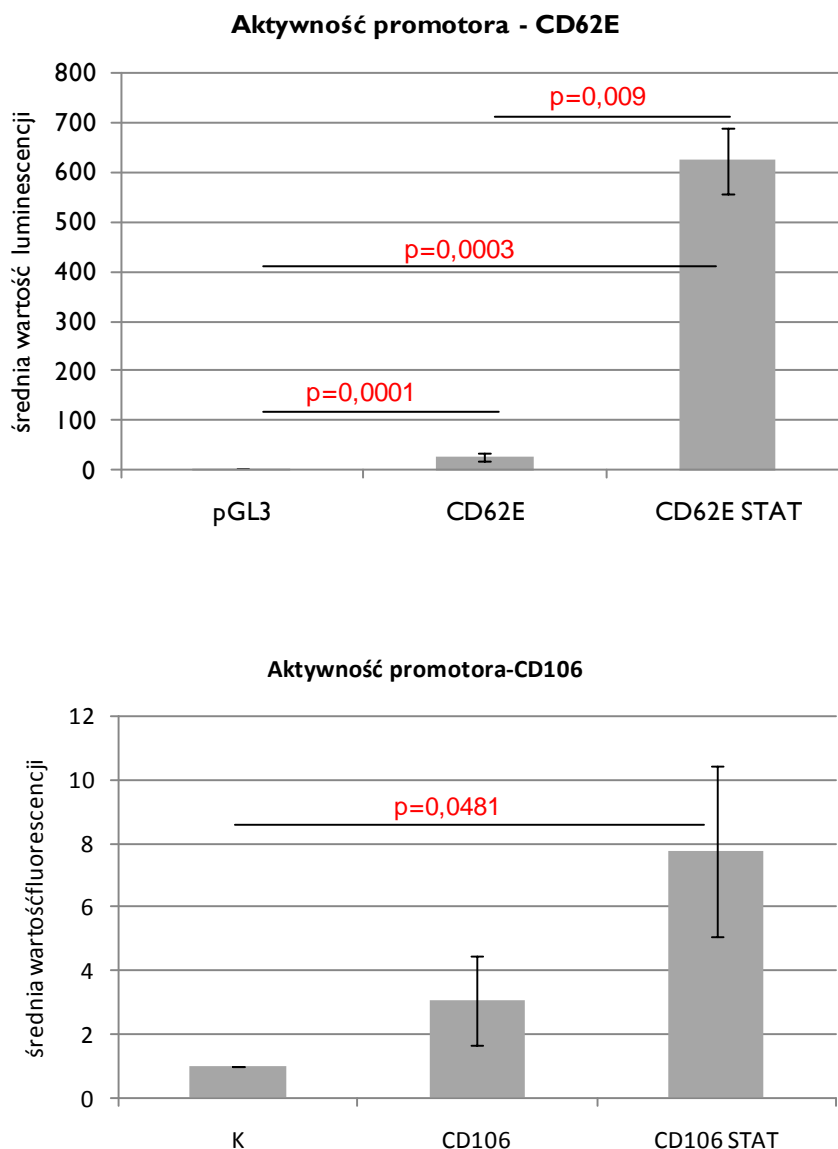
Ryc. 25. Wpływ stosunku ilości FuGene/DNA na wydajność transfekcji

Komórki HUVEC poddano kotransfekcji dwoma wektorami: wektorem pGL3 Basic pozbawionym promotora i wektorem referencyjnym pRL-TK. Do transfekcji użyto 3 różnych stosunków FuGene HD/DNA ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA): 4:2, 6:2 i 8:2. HD-kontrola bez dodania DNA.

W wyniku pobudzenia aktywności ścieżki sygnałowej JAK/STAT przez H6 zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ilości emitowanej luminescencji w przypadku wszystkich analizowanych fragmentów promotorów cząsteczek adhezyjnych zawierających miejsca wiązania białek STAT3. Najwyższy poziom aktywności transkrypcyjnej promotora zaobserwowano w przypadku cząsteczek CD54 i CD62E (około 500-krotny wzrost emitowanej luminescencji). Cząsteczka CD106 wykazała najniższą aktywność po stymulacji H6. Aktywność transkrypcyjna promotora po inkubacji z H6 wzrosła tylko 8-krotnie.

W przypadku fragmentów promotorów niezawierającego miejsc wiązania białek STAT, zaobserwowano tylko niewielki wzrost aktywności transkrypcyjnej promotorów ponad poziom kontrolny (transfekcja pustym wektorem pGL3 Basic niezawierającym promotora).





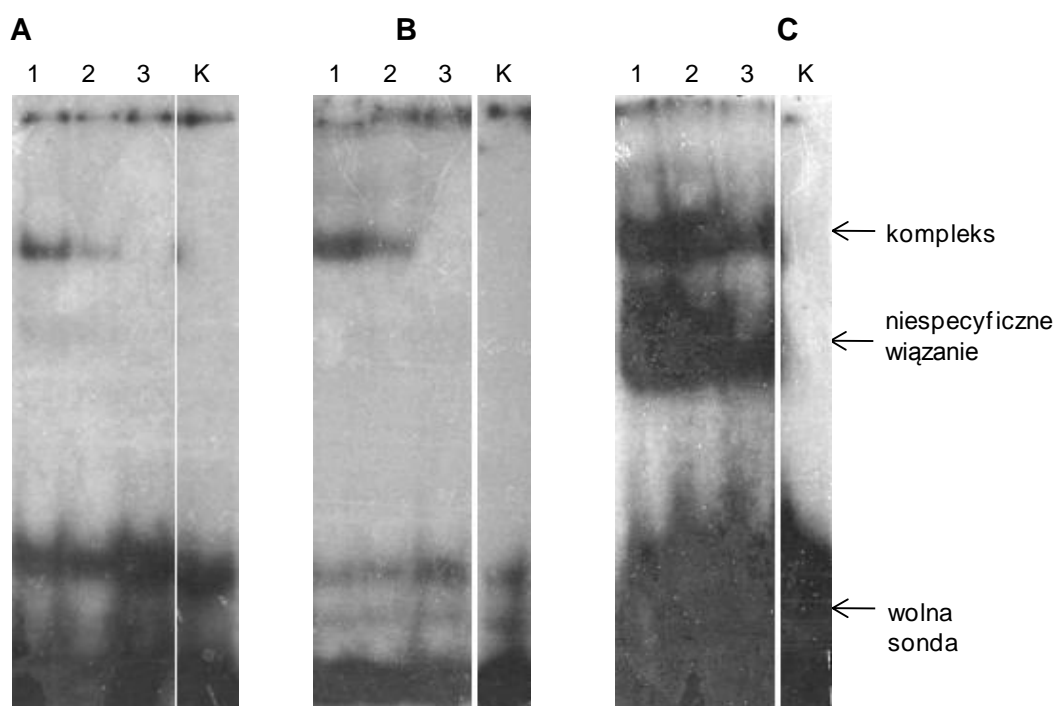
Ryc. 26. Wpływ H6 na aktywność transkrypcyjną promotorów cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i 106

Komórki kotransfekowano wektorami reporterowymi pGL3, zawierającymi gen lucyferazy *Firefly* pod kontrolą fragmentu promotora cząsteczki adhezyjnej (CD54, CD62E lub CD106) zawierającego miejsce wiązania białka STAT (CD54 STAT, CD62E STAT, CD106 STAT) i niezawierającego miejsc wiązania STAT oraz wektorem referencyjnym pRL-TK zawierającym gen lucyferazy *Renilla*. Następnie komórki inkubowano z 30ng/ml H6 przez 30 minut. Aktywność transkrypcyjną fragmentów promotorów określono na podstawie intensywności luminescencji emitowanej przez lucyferazę *Firefly* z uwzględnieniem wydajności transfekcji, mierzonej aktywnością lucyferazy *Renilla*. Wyniki stanowiące średnią z trzech doświadczeń (\pm SD), porównano do próby kontrolnej.

4.5 Identyfikacja miejsc wiązania białek STAT w obrębie promotorów cząsteczek adhezyjnych

Analiza aktywności transkrypcyjnej promotorów cząsteczek wykazała, że do aktywacji transkrypcji zależnej od H6, niezbędne jest miejsce wiązania białek STAT. W celu określenia, czy białka STAT wiążą się bezpośrednio z tymi sekwencjami w obrębie promotorów, przeprowadzono analizę EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

Ekstrakty jądrowe komórek HUVEC aktywowanych przy pomocy H6, inkubowano ze znakowaną radioizotopowo sondą o sekwencji obejmującej potencjalne miejsca wiązania białek STAT. Po godzinnej inkubacji wykonano elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących.



Ryc. 27. Wpływ Hyperinterleukiny-6 na wiązanie białek STAT w obrębie promotorów cząsteczek adhezyjnych

A) Analiza EMSA promotora cząsteczki CD62E

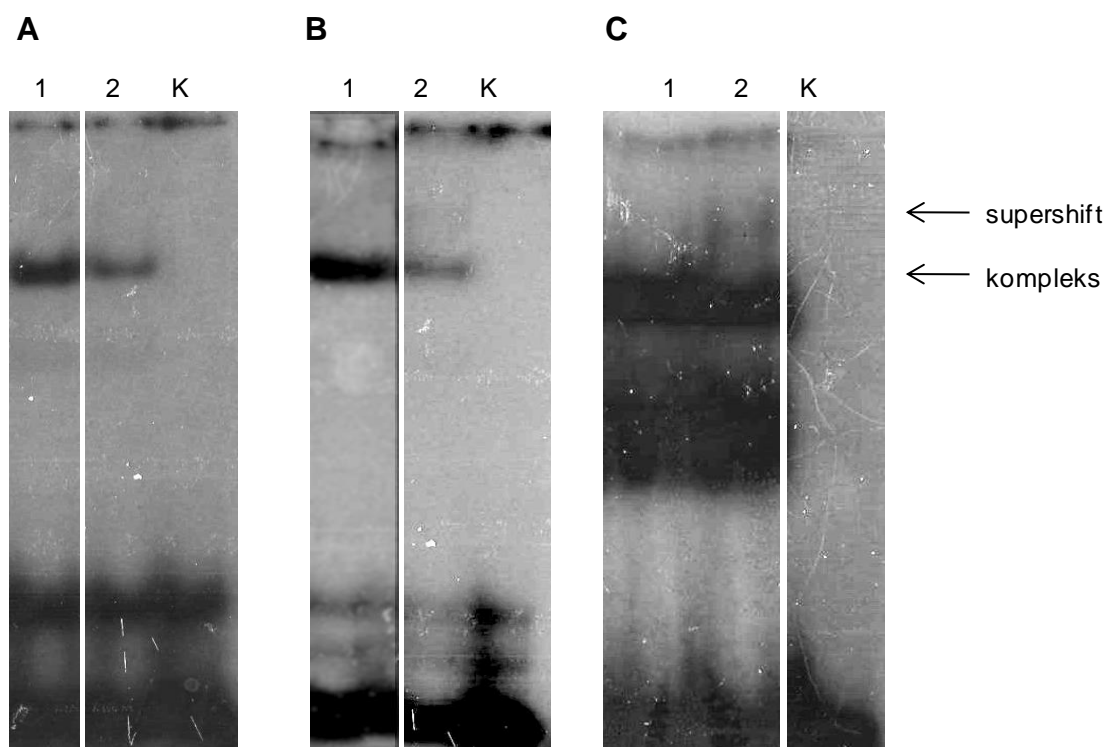
B) Analiza EMSA promotora cząsteczki CD54

C) Analiza EMSA promotora cząsteczki CD106

1 – ekstrakt jądrowy inkubowany ze znakowaną sondą, 2 – ekstrakt jądrowy inkubowany z e znakowaną i nieznakowaną sondą w stosunku 2:1, 3 – ekstrakt jądrowy inkubowany z e znakowaną i nieznakowaną sondą w stosunku 1:1, K – kontrola bez dodatku ekstraktu jądrowego

W wyniku rozdziału elektroforetycznego sondy inkubowanej z ekstraktem jądrowym uzyskano sygnały wskazujące na wolniejszą migrację sondy. W przypadku prób inkubowanych ze znakowaną i nieznakowaną sondą (w stosunku 2:1 i 1:1) obserwowano zmniejszenie intensywności fluorescencji w przypadku wszystkich analizowanych promotorów.

W celu określenia, czy białko wchodzące w skład wolniej migrującego kompleksu odpowiada białku STAT3, przeprowadzono reakcję *Supershift*. Ekstrakt jądrowy inkubowano przez godzinę z przeciwciałem anti-STAT3. Po tym czasie dodano znakowanej izotopowo sondy i inkubowano przez kolejną godzinę. Następnie próby poddano elektroforezie w warunkach niedenaturujących w 4°C (Ryc. 28).



Ryc. 28. Identyfikacja białka wchodzącego w skład kompleksu ekstraktu jądrowego z sondą

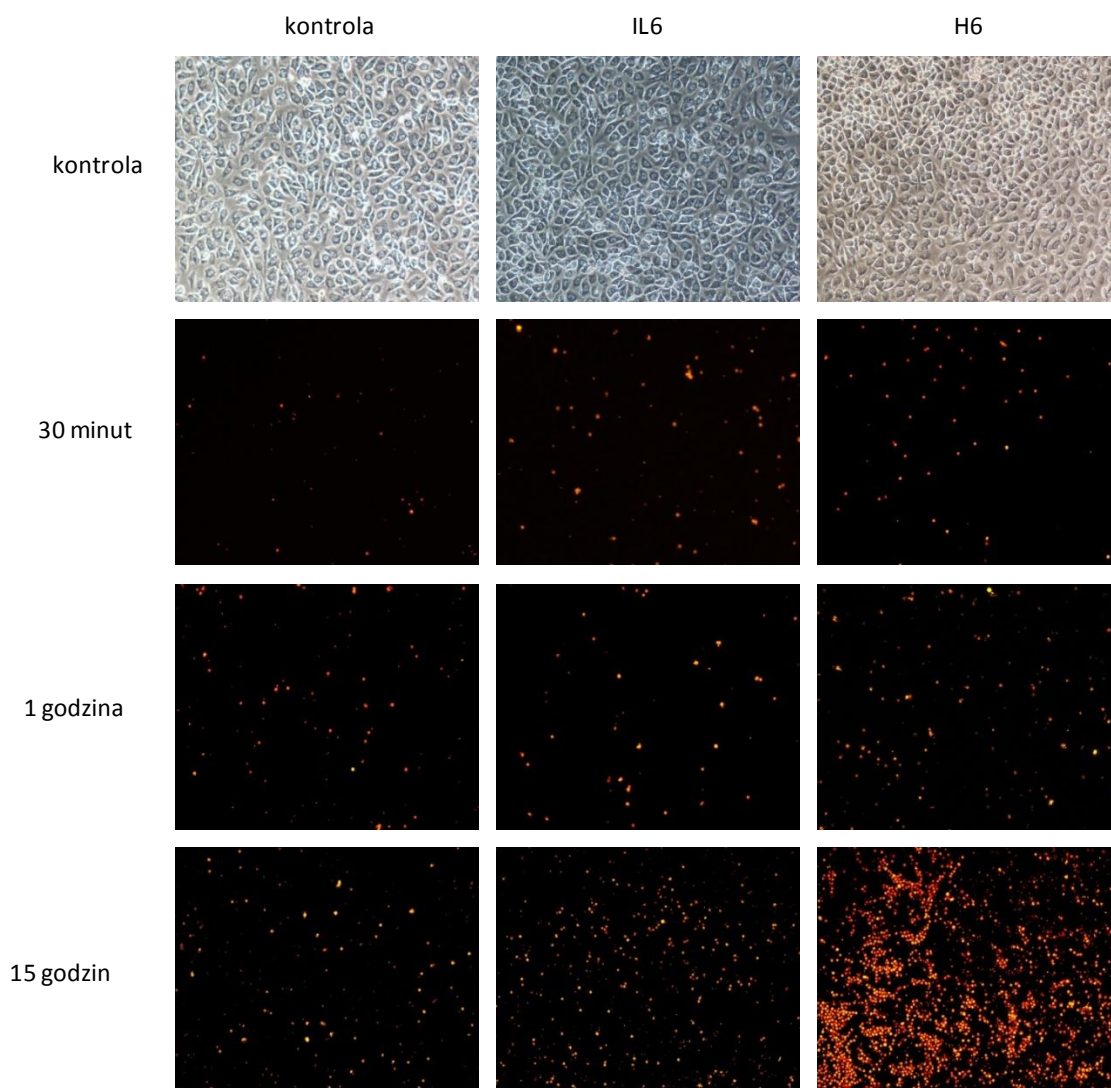
- A) Analiza EMSA promotora cząsteczki CD62E
 B) Analiza EMSA promotora cząsteczki CD54
 C) Analiza EMSA promotora cząsteczki CD106
 1 – ekstrakt jądrowy inkubowany ze znakowaną sondą, 2 – ekstrakt jądrowy inkubowany z e znakowaną i przeciwciałem anti-STAT3, K – kontrola bez dodatku ekstraktu jądrowego

Zarówno w przypadku cząsteczki CD54 jak i CD106 obserwowano dodatkowy widoczny prążek opóźnienia migracji w żelu (przeciwciała związane z białkiem i sondą migruje wolniej niż białko związane z sondą). Wykazano, że białko występujące w kompleksie ze znakowaną sondą reaguje z przeciwciałem anti-STAT3. W przypadku cząsteczki CD62E nie zaobserwowano dodatkowego prążka. Jednak dodanie przeciwciała anti-STAT3 spowodowało osłabienie sygnału sondy związanej z białkiem, w porównaniu do próby kontrolnej, bez przeciwciała.

4.6 Ocena stopnia przylegania limfocytów do śródbłonna naczyń na skutek stymulacji komórek HUVEC IL6 i Hyperinterleukiną-6

W celu określenia wpływu H6 na fizjologiczną aktywność śródbłonna, przeprowadzono testy adhezji limfocytów do zaktywowanych komórek śródbłonna w trzech czasach inkubacji: 30 minut, 1 godzina, 15 godzin (Ryc. 29).

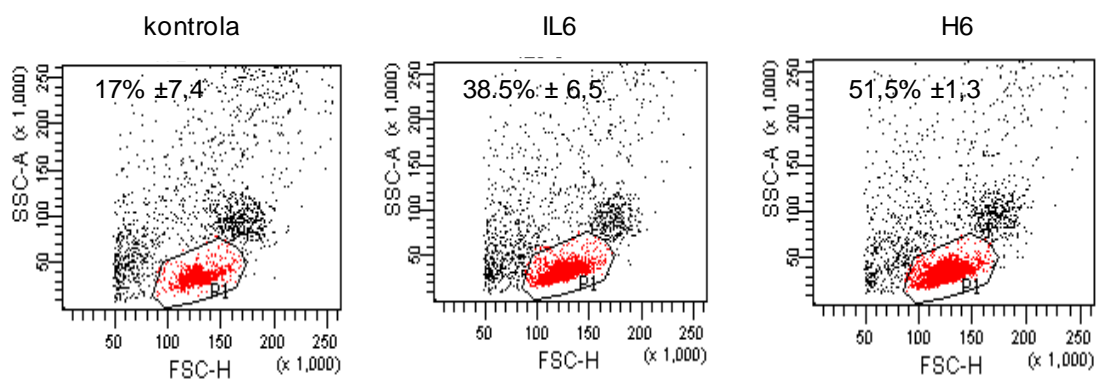
Rycina pokazuje, że w statycznych warunkach H6 w istotny sposób wpływa na aktywację śródbłonna poprzez zwiększoną adhezję limfocytów na jego powierzchni po całonocnej inkubacji. Niewielkie zmiany w adhezji widoczne są także po pół godzinnej i godzinnej inkubacji. Inkubacja komórek śródbłonna z Interleukiną-6 nie spowodowała istotnie zwiększonej adhezji limfocytów w stosunku do komórek kontrolnych.



Ryc. 29. Analiza mikroskopowa przylegania limfocytów do zaktywowanego śródbłonka w zależności od czasu.

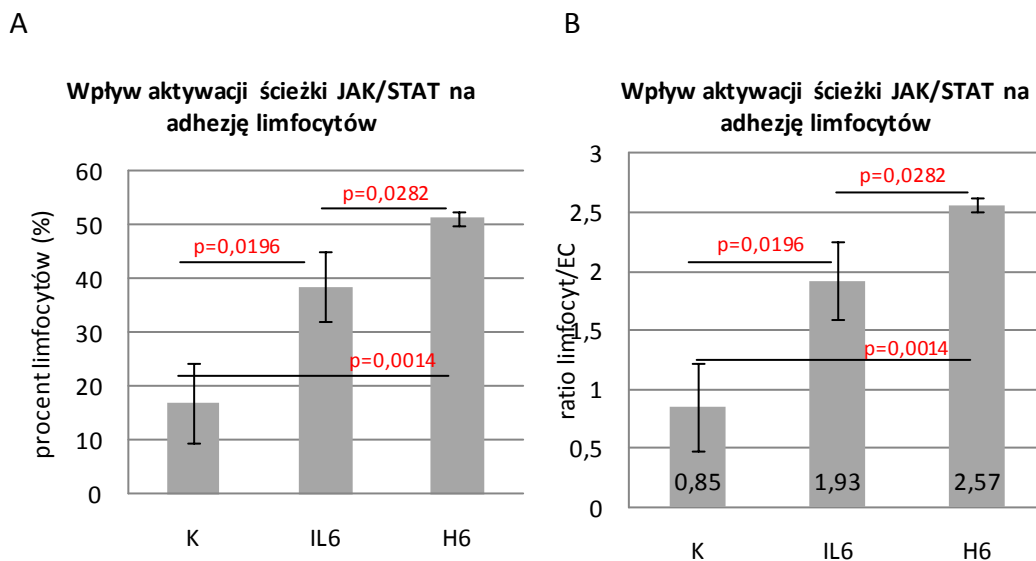
Limfocyty wyznakowane PKH26 (Sigma) (kolor pomarańczowy) podano na zaktywowane komórki śródbłonka (hodowla jednowarstwowa komórek pokazana w kontroli) w stosunku 5 limfocytów na 1 komórkę śródbłonka i inkubowano w 37°C przez 30 minut, godzinę i 15 godzin w warunkach statycznych. Po przepłukaniu, komórki analizowano na mikroskopie fluorescencyjnym.

W celu ilościowej oceny poziomu przylegania limfocytów do śródbłonka przeprowadzono analizę cytometryczną odtrawionych komórek w trzech niezależnych powtórzeniach po całonocnej inkubacji. Wyniki przedstawiono jako ilość limfocytów zakotwiczonych na jednej komórce śródbłonka (Ryc. 30).



Ryc. 30. Analiza cytometryczna stopnia przylegania limfocytów do zaktywowanego śródbłonka naczyń

Komórki śródbłonka inkubowano z IL6 i H6. Na zaktywowany śródbłonek nałożono znakowane limfocyty (w ilości 5 limfocytów na 1 komórkę śródbłonka) i inkubowano przez 15 godzin. Po tym czasie przeprowadzono analizę cytometryczną. Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 doświadczeń \pm SD.



Ryc. 31. Ocena stopnia przylegania limfocytów do śródbłonna naczyń po stymulacji H6 i IL6.

Komórki HUVEC poddano godzinnej inkubacji z H6 i IL6 (30ng/ml). Na zaktywowany śródbłonek podano znakowane PKH26 limfocyty. Po 20 godzinach inkubacji oceniano poziom limfocytów, które uległy adhezji do komórek zaktywowanego śródbłonna (H6, IL6) względem kontrolnych komórek śródbłonna (K).

A) Odsetek limfocytów, które uległy adhezji do śródbłonna

B) Ilość limfocytów przypadających na jedną komórkę śródbłonna

Wyniki stanowią średnią z trzech doświadczeń \pm SD

Analiza cytometryczna wykazała, że IL6 wpływa na wzrost przylegania limfocytów do powierzchni komórek HUVEC. W wyniku inkubacji z IL-6 doszło do dwukrotnego zwiększenia liczby limfocytów przylegających do jednej komórki śródbłonna.

Stymulacja komórek HUVEC H6 prowadziła do 2,5-krotnego zwiększenia liczby limfocytów przylegających do jednej komórki śródbłonna.

5 WNIOSKI

1. H6 aktywuje ścieżkę sygnałową JAK/STAT w komórkach HUVEC poprzez indukcję fosforylacji wewnątrzkomórkowego białka STAT3.
2. Aktywacja ścieżki sygnałowej JAK/STAT poprzez H6 stymuluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106 zarówno na poziomie transkrypcji jak i białka obecnego na powierzchni komórek śródbłonna.
3. Wzrost ekspresji genów cząsteczek CD54, CD62E i CD106 indukowany jest przez H6, poprzez wiązanie się czynnika STAT3 w obrębie promotorów tych genów.
4. H6 zwiększa adhezję limfocytów do komórek śródbłonna naczyń.

6 DYSKUSJA

Do poznania przyczyn zjawisk fizjologicznych i patologicznych w organizmie ludzkim niezbędna jest wiedza na temat mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za przekazywanie informacji między komórkami oraz między komórkami, a otaczającym środowiskiem. Istotną rolę w tych mechanizmach pełni śródbłonek naczyń. Komórki endotelialne wykazują dużą heterogenność strukturalną i funkcjonalną. Umożliwiają one migrację limfocytów z krążenia do przestrzeni pozanaczyniowej oraz tkanek nielimfoidalnych. Procesy te odgrywają fundamentalną rolę w regulacji rozmaitych fizjologicznych i patologicznych zjawisk takich jak: gojenie ran, zapalenia, powstawanie przerzutów nowotworowych, angiogeneza. Wykazano, że swoiste naprowadzanie limfocytów uzależnione jest od obecności molekuł adhezyjnych zwanych receptorami naprowadzającymi. Częsteczki adhezyjne obecne są zarówno na powierzchni krążących limfocytów, jak i na komórkach endotelialnych.

Kontakt limfocytów z komórkami śródbłonna zapoczątkowuje tzw. kaskadę adhezyjną. We wczesnych etapach kaskady zaangażowane są molekuly E-selektyna i P-selektyna, w etapach późniejszych biorą udział cząsteczki ICAM-1, VCAM-1 i inne. Swoiste rozpoznawanie sygnałów przypisywane jest adresynom. Jest to grupa glikoprotein o charakterze śluzowym, lub też mieszanym immunoglobulinowo/śluzowym. Ekspresja adresyn na powierzchni komórek endotelialnych różni się w zależności od rodzaju tkanki, a ich struktura jest modyfikowana przez mikrośrodowisko potranslacyjne.

Efektywna odpowiedź immunologiczna przeciwko patogenom wymaga aktywnej migracji limfocytów T i B z krążenia do wtórnych narządów chłonnych. Transmigracja naiwnych limfocytów T przez śródbłonek naczyń umożliwia prezentację antygenów w kontekście MHC klasy I i II wyspecjalizowanym komórkom prezentującym antygen (APC), która prowadzi do indukcji proliferacji i sekrecji cytokin przez aktywowane limfocyty. Proces transmigracji limfocytów T do obwodowych węzłów chłonnych odbywa się wieloetapowo. W pierwszej fazie zależy od ekspresji cząsteczek adhezyjnych L-selektyny obecnej na powierzchni limfocytów oraz adresyny PNA_d (Peripheral Node Addressin) obecnej na komórkach śródbłonkowych. W drugiej fazie transmigracji, pod wpływem chemokin z rodziny –CXC– następuje

wzrost powinowactwa integryn VLA-4 oraz LFA-3, ulegających ekspresji na powierzchni limfocytów, do odpowiednich ligandów na powierzchni komórek śródbłonkowych VCAM-1 i ICAM-1. [12,13]. Pod wpływem PECAM-1 dochodzi do transmigracji limfocytów przez połączenia międzykomórkowe sąsiadujących komórek śródbłonkowych. Liczne prace doświadczalne sugerują zaburzenia transmigracji limfocytów do obwodowych węzłów chłonnych w zakażeniach wirusem HIV, *Helicobacter Pylori* oraz białaczkach .

Wyniki wcześniejszych badań sugerują, że kluczową rolę w regulacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonka odgrywają cytokiny. Wykazano, że IL-7 i jej agonistyczny receptor silnie indukują proliferację komórek śródbłonka naczyniowego uzyskanych z obwodowego węzła chłonnego chorego na zaawansowanego czerniaka. Podobne właściwości wykazują IL-2 i IL-4, co wynika z faktu wykorzystania wspólnej podjednostki γ C receptora w przekaźnictwie sygnału [123]. Ponadto, właściwości nasilające ekspresję cząsteczek adhezyjnych wykazano dla IL-1, IFN γ , TNF- α oraz chemokin z grupy RANTES [55, 58].

IL-6 jest plejotropową cytokiną, która działa na wiele rodzajów komórek. Wytwarzana jest przede wszystkim przez keratynocyty, monocyty i makrofagi, ale także przez fibroblasty, komórki śródbłonka, limfocyty T i B. Bierze udział we wzbudzaniu reakcji ostrej fazy, uczestniczy w aktywacji limfocytów T rozpoznających antygen i przekształceniu ich w kierunku limfocytów T cytotoksycznych, stymuluje limfocyty B w kierunku komórek plazmatycznych uwalniających immunoglobuliny. Ostatnie badania sugerują także jej istotną rolę w procesie migracji limfocytów przez komórki śródbłonka naczyń [74-76].

IL-6 odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu chorób zwłaszcza o podłożu infekcyjnym i zapalnym. Nieliczne dane literaturowe sugerują, że IL-6 może regulować aktywność EC stymulowanych TNF- α w pierwszej fazie procesu zapalnego [55]. Dotyczy to przede wszystkim nasilenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek EC wchodzących w skład kompleksów c-SMAC i p-SMAC odpowiedzialnych za transmigrację limfocytów oraz prezentację antygenów na powierzchni EC efektorowym limfocytom T.

Receptor błonowy dla IL-6 składa się z 80kDa glikoproteiny łączącej ligand (gp 80/IL-6R) oraz podjednostki receptora odpowiedzialnej za transdukcję sygnału – gp 130 [124]. W osoczu ludzkim występują rozpuszczalne formy receptora α (sIL-6R/sgp 80) i β (sgp130) [125]. Stężenie sIL-6R i sgp 130 w osoczu wynosi odpowiednio ok.100ng/ml i 400ng/ml. W osoczu IL-6 pojawia się w stanach zapalnych i nowotworowych, gdzie występuje w trzech formach: wolnej, oraz w związanej z receptorami: IL-6/sIL-6R i IL-6/sIL-6R/sgp 130. W kompleksie z sIL-6R, IL-6 odgrywa funkcję agonisty, podczas gdy sgp130 hamuje aktywność IL-6/sIL-6R [126, 127]. Kompleks IL-6/sIL-6R może aktywować zarówno komórki które posiadają oba receptory jak i te które mają tylko gp 130. Natomiast wolny sgp 130 hamuje aktywację komórek zarówno przez wolną IL-6 jak i jej kompleksy [66, 128].

Szereg komórek układu immunologicznego oraz naczyniowego wykazuje ekspresję podjednostki gp 130 i brak ekspresji gp 80 na powierzchni, co istotnie ogranicza aktywność biologiczną IL-6. Obecność sIL-6R zwiększa efektywność samej IL-6 i jednocześnie kompensuje brak odpowiedniej liczby cząsteczek gp80 [129]. Do komórek, które reagują na kompleks IL-6/sIL-6R, a nie na wolną IL-6, należą m.in. hematopoetyczne komórki progenitorowe, komórki endotelialne, neurony, osteoblasty oraz limfocyty [68, 84, 129, 130].

W roku 1996 Rose-John i wsp. połączyli IL-6 z jej sIL-6R za pomocą peptydowego linkera, a uzyskane w ten sposób białko nazwano Hyper-IL-6 (H6) [87]. Cząsteczka fuzyjna wykazuje 10-1000 razy większą aktywność biologiczną niż rozpuszczalny kompleks IL-6/sIL-6R, posiada szersze spektrum działania [87, 131], a czas jej połowicznego rozkładu jest wydłużony [128].

Wyniki nielicznych badań klinicznych wykazały przeciwczeraniakową aktywność IL-6 [132]. Wprowadzenie genów IL-6 i sIL-6R do komórek czerniaka nasiliło przeciwnowotworowe działanie szczepionki w mysim modelu odrzucenia czerniaka [133]. Od 1997 roku w zakładzie Immunologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii prowadzona jest immunoterapia chorych na zaawansowanego czerniaka za pomocą genetycznie modyfikowanej, komórkowej szczepionki nowotworowej (GMTV). Zastosowanie strategii GMTV ma na celu indukcję odpowiedzi przeciwczeraniakowej, poprzez nasilenie efektorowych swoistych mechanizmów cytotoksycznych na obwodzie oraz powstanie efektorowych komórek

pamięci immunologicznej. Składnikami szczepionki są genetycznie modyfikowane genem H6, linie komórkowe ludzkiego czerniaka Mich1 i Mich2 [128].

Badanie odpowiedzi klinicznej u chorych na zaawansowanego czerniaka leczonych GMTV są bardzo obiecujące [118]. Jednak dokładny mechanizm działania szczepionki i jej wpływ na swoistą odpowiedź immunologiczną nie został do końca poznany. Niejasny jest wpływ samego białka H-6 na śródbłonek naczyniowy, szczególnie w kontekście jego roli w regulacji transmigracji limfocytów do miejsc podania szczepionki. Nieliczne doniesienia literaturowe sugerują udział nadekspresji cząsteczek adhezyjnych w nasileniu transmigracji do środowiska guza. Natomiast brak jest doniesień naukowych na temat udziału ścieżki sygnałowej JAK/STAT w regulacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych w modelu śródbłonka naczyń.

Do aktywacji komórek śródbłonka naczyń dochodzi na skutek działania na nie różnych cytokin. Wykazano, że IL-1 i TNF α zwiększają ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka naczyń poprzez ścieżkę sygnałową kinaz MAP [49, 50]. Z kolei w przypadku stymulacji komórek śródbłonka IL-6, naukowcy potwierdzili udział białek STAT w wewnątrzkomórkowym przekaznictwie sygnału [82].

Uaktywnienie wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych przez IL-6 wymaga współdziałania trzech cząsteczek (IL-6, gp80 i gp130). Ich dostępność może być czynnikiem ograniczającym aktywację wewnątrzkomórkowej sygnalizacji. W związku z tym, do badania użyto fuzyjne białko łączące IL-6 z jej sIL-6R.

Nasze wcześniejsze badania potwierdziły, że komórki HUVEC w pierwotnej hodowli jednowarstwowej nie posiadają na swojej powierzchni receptora α dla IL-6 (IL-6 R α /gp80). W związku z tym, są one niewrażliwe na działanie IL-6. Przeprowadzono także analizę wpływu IL-6 i H6 na ekspresję antygenów powierzchniowych ustalonych linii śródbłonka naczyń (dar prof. Claudine Kiedy). Otrzymane wyniki potwierdziły, że IL-6 nie wpływa na komórki śródbłonka pozbawione IL-6 R α . Z kolei H6 w istotnym stopniu zwiększała ekspresję antygenów na powierzchni śródbłonka ustalonych linii. Zastosowanie H6 pozwoliło na badania aktywacji komórek śródbłonka naczyń.

W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach, jako modelu komórek śródbłonka użyłam komórki HUVEC. Jest to obecnie najczęściej stosowany model w tego typu badaniach [55, 58]. Posiada jednak szereg ograniczeń. Komórki HUVEC utrzymywane w pierwotnej hodowli jednowarstwowej, która jest hodowlą statyczną,

mogą tracić pewne cechy. Wcześniej wykazano brak ekspresji niektórych antygenów powierzchniowych w hodowli jednowarstwowej ustalonych linii komórek śródbłonka (nieopublikowane wcześniejsze badania w Zakładzie Immunologii Nowotworów, ustne doniesienia prof. Kiedy). Powyższe cechy utrzymywały się z kolei w warunkach hodowli kinetycznej na mikrokulkach w zawieszynie. Ponadto, cechy komórek śródbłonka ujawniają się w modelach konstruktów z rolującymi leukocytami (informacja ustna profesor Kiedy).

W mojej pracy podjęłam próbę zbadania wpływu H6 oraz ścieżki transdukcji sygnałów JAK/STAT, na proces regulacji funkcji komórek śródbłonka naczyń. W związku z powyższym, w pierwszym etapie doświadczeń oceniałam wpływ H6 na poziom ekspresji cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E, CD106 na powierzchni komórek HUVEC (na poziomie białka i transkryptów). Aby określić mechanizm indukcji ekspresji powyższych antygenów przeprowadziłam badanie aktywności fragmentów promotorów genów CD54, CD62E, CD106 wiążących białko STAT3 po inkubacji z H6. Ponadto, wykonałam analizę funkcjonalną miejsc wiązania białka STAT3 w obrębie promotorów genów cząsteczek CD54, CD62E oraz CD106. W następnym etapie badań dokonałam oceny aktywacji ścieżki sygnałowej JAK/STAT i jej wpływu na ścisłą adhezję limfocytów do komórek śródbłonka naczyń.

Poszerzenie wiedzy na temat udziału kompleksu H6 +JAK/STAT w regulacji ekspresji kluczowych dla transmigracji cząsteczek adhezyjnych pozwoli określić rolę Hyper-IL6 jako molekularnego adiuwanta w formulacji szczepionki.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono ocenę wpływu H6 na aktywację ścieżki sygnałowej JAK/STAT. W tym celu komórki HUVEC indukowano H6. Aby określić udział ścieżki JAK/STAT w zależnej od H6 indukcji przekaźnictwa sygnału, zastosowano inhibitor ścieżki JAK/STAT – kukurbitacynę. Wykazano, że H6 istotnie zwiększa poziom fosforylacji STAT3 po 30 minutowej inkubacji. Kinetyka reakcji w komórkach HUVEC była identyczna z tą obserwowaną w komórkach wątrobiaka HepG2 [86]. Rakemann i wsp. wykazali, że w przypadku stymulacji 10-krotnie wyższą ilością IL-6, poziom ufosforylowania STAT, podobny do tego po stymulacji H6, obserwowano znacznie później. Poziom ten stopniowo malał. Thiel i wsp. prowadzili również badania z użyciem komórek HepG2. Wyniki analizy EMSA oceniającej poziom jądrowego, ufosforylowanego białka STAT3 wykazały, że

maksymalny jego poziom obserwowany był po 30 minutach inkubacji zarówno z IL-6 jak i z IL-6 + sIL-6R. Po tym czasie białko to zanikało i pojawiało się ponownie po ok. 3 godz. stymulacji [94]. Natomiast w badaniach Rakemann i wsp., poziom białka STAT3-P obniżał się po 3 godz., ale był obecny przez cały czas stymulacji. Powodem powyższych różnic może być fakt, że badania Rakemanna i wsp. opierały się na analizie białka STAT w cytoplazmie, podczas gdy Thiel analizował jego jądrową akumulację. Mechanizm zanikania ufosforylowanego białka STAT w jądrze nie jest poznany. Z kolei różnice poziomu tego białka w cytoplazmie i jądrze mogą być spowodowane tym, że tylko niewielka część (15-20%) aktywowanego białka STAT ulega translokacji do jądra.

W celu potwierdzenia indukcji fosforylacji białka STAT3 przez H6, komórki HUVEC inkubowano z inhibitorem ścieżki sygnałowej JAK/STAT – kukurbitacyną. Wcześniejsze badania Blaskovich i wsp. wykazały, że kukurbitacyna (JSI-124) hamuje zarówno fosforylację białka STAT3 jak i kinazy JAK2 – dwóch istotnych elementów zależnej od IL-6 kaskady przekazywania sygnału [119]. W celu potwierdzenia wpływu H6 na wzrost wewnątrzkomórkowej puli ufosforylowanego białka STAT3, komórki HUVEC przed podaniem H6 inkubowano z kukurbitacyną. Zgodnie z oczekiwaniami, po inkubacji z H6, 50% komórek wykazywało obecność wewnątrzkomórkowego ufosforylowanego białka STAT. Z kolei preinkubacja z kukurbitacyną, a następnie inkubacja z H6 powodowała fosforylację STAT3 tylko 13% komórek. Potwierdza to hipotezę, że H6 poprzez ścieżkę sygnałową JAK/STAT reguluje poziom ufosforylowania wewnątrzkomórkowego białka STAT3.

Watson i wsp. wykazali, że IL-6 zwiększa ekspresję cząsteczek CD54, CD62E i CD106 na powierzchni śródbłonna. Na wzrost ilości cząsteczek CD54 ma też wpływ podwyższona temperatura [78, 81]. W wielu doświadczeniach wykazano, że komórki śródbłonna naczyń, w tym komórki HUVEC w jednowarstwowej hodowli pierwotnej, nie wykazują ekspresji błonowego receptora α -IL-6R. Wcześniejsze badania przeprowadzone w Zakładzie Immunologii Nowotworów wykazały, że IL-6 nie wpływa na zmiany ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Z kolei H6 może brać udział w aktywacji drogi przekaznictwa sygnału w komórkach nie wykazujących ekspresji gp80. Nasze wcześniejsze nieopublikowane badania wykazały że na skutek stymulacji H6 dochodzi do wzrostu ekspresji tylko trzech cząsteczek na powierzchni śródbłonna: CD54, CD62E i CD106.

W niniejszej pracy wykazano, że ekspresja antygenu CD106 nie jest tak wrażliwa na działanie H6 jak ma to miejsce w przypadku dwóch pozostałych antygenów. Po aktywacji ścieżki JAK/STAT zaobserwowano tylko 1,5-krotny wzrost poziomu ekspresji antygenu CD106, podczas gdy ekspresja cząsteczek CD54 i CD62E wzrastała 3-krotnie.

W kolejnym etapie badań postanowiłam określić wpływ pobudzenia ścieżki sygnałowej JAK/STAT poprzez H6 na poziom transkrypcji genów wyżej wymienionych cząsteczek w komórkach HUVEC. Wykazałam, że pobudzenie aktywności ścieżki sygnałowej JAK/STAT wywołało dziewięciokrotny wzrost poziomu transkryptów CD54 i CD62E. W przypadku transkryptu cząsteczki CD106 wzrost był dwukrotnie wyższy. Wyniki te korelowały z analizą cytometryczną tych samych cząsteczek znajdujących się na powierzchni komórek śródbłónka.

Powyższe wyniki mogą sugerować, że STAT3 wpływa na wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych poprzez wiązanie się do ich promotorów. Aby dokładnie określić mechanizm regulacji transkrypcji genów badanych cząsteczek przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem wektorów reporterowych zawierających gen lucyferazy pod kontrolą różnej długości fragmentów promotorów cząsteczek adhezyjnych. Wstępna komputerowa analiza sekwencji promotorów cząsteczek CD54, CD62E i CD106 wykazała obecność miejsc wiązania białek STAT w ich obrębie. W przypadku promotora cząsteczki CD54, białka STAT wiążą się w regionie 37-46 nt przed miejscem startu transkrypcji, promotora CD62E 151-161 nt przed miejscem startu transkrypcji, a promotora CD106 245-253 nt przed miejscem startu transkrypcji.

Stymulacja H6 spowodowała prawie 8-krotny wzrost aktywności promotora CD106 i ok.500-krotny wzrost aktywności promotorów CD54 i CD62E. W przypadku wektorów reporterowych pozbawionych miejsc wiązania białka STAT nie zaobserwowano istotnego statystycznie wzrostu aktywności transkrypcyjnej promotorów.

Wung i wsp. wykazali, że aktywność promotora CD54 wzrasta po stymulacji zarówno IL-6 jak i TNF- α [77]. Sekwencja promotora odpowiedzialna za odpowiedź na IL-6 znajduje się pomiędzy -105 a -36 w regionie palindromu IRE [134]. Podobne wyniki uzyskali Caldenhoven i wsp. Przy pomocy IL-6 indukowali oni komórki HepG2 transfekowane wektorem zawierającym fragment promotora cząsteczki ICAM o długości 1014pz. W wyniku indukcji otrzymali 6-krotny wzrost aktywności promotora. Wykazali także, że delecja regionu -105 do -37 promotora ICAM

spowodowała brak wrażliwości na IL-6. Potwierdza to, że elementy związane z indukcją przez IL-6 znajduje się w regionie -105 do -37 promotora ICAM [135]. Jest to zgodne z przeprowadzoną analizą komputerową promotora i aktywnością lucyferazy w przeprowadzonych w niniejszej pracy doświadczeniach.

Niewiele wiadomo na temat wpływu IL-6 na aktywność promotorów dwóch pozostałych cząsteczek. W latach 90-tych prowadzono intensywne badania nad aktywnością promotora E-selektyny. Whitley i wsp. potwierdzili obecność sekwencji w promotorze E-selektyny, biorących udział w odpowiedzi na TNF- α [136]. Wykazano również, że miejsca te wiążą czynnik NF- κ B zarówno po stymulacji TNF- α jak i IL-1 [137]. Kilka lat później w eksperymentach polegających na delecji fragmentów promotora E-selektyny, wykazano w jego obrębie 3 miejsca wiążące NF- κ B [138, 139]. Podobne miejsca wiążące czynnik NF- κ B wykryto także w promotorze cząsteczki VCAM w odpowiedzi na TNF- α [140, 141].

Komputerowa analiza sekwencji promotorów badanych cząsteczek oraz wyniki przeprowadzonych eksperymentów nie odpowiedziały definitywnie, czy sekwencje wiążące białko STAT w obrębie promotorów badanych genów są miejscami funkcjonalnymi, przyłączającymi STAT i wpływającymi na regulację transkrypcji genów. W związku z tym przeprowadzono analizę EMSA z użyciem izotopowo znakowanej sondy obejmującej region promotora cząsteczki CD54, CD62E i CD106. Ponadto zastosowano metodę Supershift ze swoistymi przeciwciałami.

W ocenie migracji ekstraktów jądrowych ze znakowaną izotopowo sondą, w przypadku wszystkich analizowanych promotorów obserwowano szybko migrujące prążki odpowiadające niezwiązanej sondzie i prążki migrujące wolniej w żelu. W celu potwierdzenia obecności białka STAT3 w wolno migrujących kompleksach sondy z białkiem przeprowadzono analizę *Supershift*. Wyniki analizy cząsteczki CD54 wykazały obecność dodatkowego prążka w żelu. Analogiczne wyniki uzyskano w badaniu cząsteczki CD106. W przypadku cząsteczki CD62E nie zaobserwowano dodatkowego prążka, jednak w znacznym stopniu zmniejszyła się intensywność prążka sondy związanej w kompleksie. Powyższe badania wykazały obecność białka STAT w kompleksie sondy z białkiem. Tym samym wykazały na funkcjonalność sekwencji wiążących fosforyzowane białko STAT3. Udział białka STAT w regulacji promotora cząsteczki ICAM wykazał w 2005 roku Yang i wsp [142].

Liczne wcześniejsze badania potwierdziły, że stymulacja cząsteczek adhezyjnych śródbłonna, wpływa na zwiększoną adhezję leukocytów do komórek

śródbłónka umożliwiając ich migrację ze światła naczynia do tkanek [12-14, 21, 22]. Istotną rolę w tym procesie odgrywają także chemokiny [143-145]. W związku z tym pojawiło się pytanie, czy H6, poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych nasila adhezję limfocytów. W tym celu komórki HUVEC stymulowano IL-6 i H6 i nakładano na nie limfocyty izolowane od zdrowych dawców. Istotne nasilenie adhezji zaobserwowano dopiero po 15 godz. stymulacji. Wykazano, że zarówno IL-6 jak i H6 zwiększają adhezję limfocytów do zaktywowanego śródbłónka. Efekt stymulacji H6 był w naszych badaniach istotnie wyższy w porównaniu z komórkami kontrolnymi i stymulowanymi IL-6. Komórki HUVEC w pierwotnej hodowli jednowarstwowej nie wykazywały ekspresji receptora α -IL-6, zatem nie powinny być wrażliwe na działanie IL-6. W literaturze pojawiają się sprzeczne informacje na temat wpływu IL-6 na ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłónka naczyń i jej udziału w wiązaniu leukocytów do EC. Niektórzy badacze wykazali indukcję ekspresji cząsteczki ICAM [135, 146, 147], podczas gdy inni nie stwierdzili wpływu IL-6 na wzmożoną ekspresję tej cząsteczki [148, 149] oraz E-selektyny [150]. Ponadto, aktywacja przez IL-6 komórek śródbłónka izolowanych z bydłych naczyń mózgowych zwiększyła ich adhezję do limfocytów [151], podczas gdy inkubacja komórek HUVEC z IL-6 nie wpłynęła na nasiloną adhezję leukocytów [152].

Co więcej wykazano, że komórki śródbłónka hodowane w hodowli statycznej tracą niektóre cechy. Analiza piśmiennictwa wykazała, że obecnie do hodowli komórek śródbłónka naczyniowego wykorzystywany jest dynamiczny model hodowli EC w komorach przepływowych lub na mikrokulkach w zawieszynie [153]. Ostatnie nieopublikowane prace Kiedy i wsp. sugerują, że środowisko otaczające komórki śródbłónka musi być w ciągłym ruchu. Ma to zapewnić prawidłową ekspresję cząsteczek adhezyjnych oraz stworzyć optymalne warunki do badania adhezji komórek efektorowych układu immunologicznego do EC.

W modelu adhezji zastosowanym w niniejszej pracy zastosowano hodowlę mieszane komórek śródbłónka z limfocytami. Stymulacji IL-6 i H6 mogły ulegać zarówno EC jak i limfocyty. Sama aktywacja limfocytów mogła się przyczynić do ich zwiększonej adhezji do komórek śródbłónka i zmian fenotypowych EC po ich przyłączeniu.

Zbadanie wpływu cytokin na strukturę fenotypową śródbłónka naczyń przyczynić się może do zwiększenia wiedzy na temat mechanizmów komunikacji międzykomórkowej oraz transmigracji komórek układu immunologicznego. Co więcej, może także stanowić podstawę do skonstruowania nowych, potencjalnych metod diagnostyki i immunoterapii licznych schorzeń. Hamowanie procesu toczenia się, adhezji i migracji przez śródbłonek naczyń do tkanek, może być jednym ze sposobów zapobiegania szerzenia się procesów patologicznych, a cząsteczki adhezyjne mogą stać się potencjalnym celem terapeutycznym. Z drugiej strony, szersze poznanie roli cząsteczek adhezyjnych w przechodzeniu efektorowych komórek immunokompetentnych poprzez barierę naczyniową może przyczynić się do opracowania metod terapeutycznych mających na celu wzmocnienie kierunkowej, swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej na drodze nasilenia transmigracji komórek do środowiska guza.

7 STRESZCZENIE

Śródbłonek naczyń pełni kluczową rolę w regulacji licznych procesów zachodzących w organizmie, a podstawowymi elementami odpowiedzialnymi za jego funkcje są antygeny powierzchniowe. Funkcje śródbłonka naczyń modyfikowane są przez obecność cytokin oraz innych czynników wzrostu w otaczającym środowisku, poprzez ich wpływ na ekspresję antygenów powierzchniowych. Aktywacja śródbłonka pełni istotną rolę w procesie transmigracji limfocytów z przestrzeni wewnątrznacyniowej do tkanek. Proces ten jest podstawowym zjawiskiem warunkującym utrzymanie nadzoru immunologicznego w organizmie. Za aktywację śródbłonka odpowiedzialne są cytokiny prozapalne między innymi IL-6.

Od 1997 roku w Zakładzie Immunologii Nowotworów prowadzone są badania nad GMTV modyfikowaną cDNA kodującym fuzyjne białko Hyper-IL-6. Obecnie szczepionka ta jest w III fazie badań klinicznych. Badanie odpowiedzi klinicznej u chorych na zaawansowanego czerniaka leczonych GMTV są bardzo obiecujące. Ciągłe jednak niewiadomo, jaką rolę odgrywają komórki śródbłonka naczyń w regulacji lokalnych, przeciwczerśniakowych mechanizmów obronnych.

W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania wpływu H6 na regulację funkcji komórek śródbłonka naczyń. Skupiono się na ocenie wpływu H6 na ekspresję cząsteczek adhezyjnych CD54, CD62E i CD106 na powierzchni komórek śródbłonka, roli ścieżki sygnałowej JAK/STAT w tym procesie a także adhezji limfocytów do zaktywowanego śródbłonka. Badania przeprowadzono w modelowym układzie doświadczalnym *in vitro* na pierwotnej linii komórkowej EC izolowanej z ludzkiego śródbłonka naczyniowego płodowej żyły pępowinowej (HUVEC).

W doświadczeniach analizowano wpływ hybrydowego białka fuzyjnego Hyper-IL-6 na ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego hodowli pierwotnej HUVEC. W tym celu, monowarstwa komórek HUVEC poddana była stymulacji H6. Następnie przeprowadzono analizę cytometryczną pod względem obecności antygenów powierzchniowych CD54, CD62E i CD106. Oceniano także poziom transkryptów badanych cząsteczek przy pomocy techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym. Uzyskane wyniki wykazały, że H6 stymuluje zarówno poziom ekspresji badanych antygenów powierzchniowych zarówno na

powierzchni komórek śródbłonka jak i na poziomie transkryptu. Stosując syntetyczny inhibitor ścieżki sygnałowej JAK/STAT wykazano jej udział w zależnej od H6 stymulacji antygenów CD54, CD62E i CD106.

W następnym etapie doświadczeń prowadzono analizę promotorów cząsteczek adhezyjnych. Analiza komputerowa badanych promotorów wykazała obecność sekwencji wiążących białka STAT. Przy pomocy wektorów reporterowych zawierających fragmenty promotorów wiążących białka STAT wykazano, że stymulacja komórek HUVEC poprzez aktywację białek STAT wpływa na zwiększoną aktywność transkrypcyjną promotorów. Co więcej, w eksperymencie EMSA z izotopowo znakowanymi sondami potwierdzono obecność funkcjonalnych miejsc wiążących białka STAT3 w obrębie promotorów cząsteczek CD54, CD62E i CD106.

Kolejna faza badań dotyczyła oceny stopnia przylegania limfocytów do zaktywowanego śródbłonka naczyń. Zauważono, że zarówno stymulacja IL-6 jak i H6 zwiększa adhezję limfocytów. W przypadku H6 ilość limfocytów przylegająca do jednej komórki śródbłonka jest 3-krotnie wyższa w porównaniu z komórkami kontrolnymi i dwukrotnie wyższa w porównaniu z komórkami stymulowanymi IL-6. Różnice pomiędzy stopniem przylegania a użytą cytokiną wynikają z budowy komórki śródbłonka. IL-6 do aktywacji wewnątrzkomórkowych procesów wymaga obecności receptora α na powierzchni komórek docelowych. Wcześniejsze badania przeprowadzone w Zakładzie Immunologii Nowotworów wykazały brak tej podjednostki receptora na komórkach HUVEC. H6, jako białko fuzyjne łączące IL-6 z receptorem α wymaga tylko obecności receptora gp130 na powierzchni komórek HUVEC. Wykazuje zatem szersze spectrum i w związku z tym silniej aktywuje komórki śródbłonka.

Doświadczenia przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy miały na celu poszukanie odpowiedzi na pytanie, czy H6, przez aktywację ścieżki JAK/STAT, wpływa na regulację funkcji komórek śródbłonka naczyń. Oceniano to przez zmiany ekspresji cząsteczek adhezyjnych, regulacji aktywności transkrypcyjnej promotorów badanych cząsteczek a także adhezji limfocytów do zaktywowanego śródbłonka naczyń. Wykazano, że H6 wpływa na zwiększoną ekspresję wybranych antygenów powierzchniowych EC oraz na nasiloną adhezję limfocytów.

8 SUMMARY

Endothelium is an inner, continuous single-cell cellular lining of the blood and lymphatic vessels. It plays an important function in many physiological processes such as the control of vasomotor tone, blood cell trafficking, haemostatic balance, proliferation, innate and adaptive immunity. Endothelial cells can be activated by various stimuli including proinflammatory cytokines, bacterial endotoxins, hemodynamic factors and others. A fundamental event in inflammatory response is recruitment of blood lymphocytes to tissues and organs in the endothelial dependent mechanism. Recruitment is sequential, multistep cascade involving leucocytes and adhesion molecules on endothelial cells that support tethering, rolling, firm adhesion and transmigration.

Activation of intracellular pathway via IL-6 requires cooperation of three molecules-IL-6, gp80 and gp130. Their availability can be a crucial limiting factor of the JAK/STAT signaling pathway activation. For that reason the recombinant fusion protein called Hyperinretleukine-6, which combines IL-6 with its soluble receptor-gp80, was created. Since 1997 in the Department of Cancer Immunology at the University of Medical Sciences in Poznań we investigate the therapeutic potential of genetically modified, with cDNA encoding Hyper IL-6 cytokine, anti melanoma cancer vaccine in advanced melanoma patients. The results of clinical response are very promising, however immunological mechanisms of antimelanoma specific response remain unclear.

In my work I wanted to evaluate the role of H6 in the regulation of functional activity of endothelial cells. Research were focused on evaluating the role of JAK/STAT/H6 complexes in the regulation of expression of endothelial adhesion molecules and process of the adhesion of lymphocytes to activated endothelial cells. As an in-vitro model, EC isolated from human umbilical vein were used (HUVEC).

In the experiments I analyzed the impact of fusion protein H6 on the expression of adhesion proteins on the surface of HUVECs. Monolayer of EC was stimulated with H6 and then submitted to flow cytometric analysis for the presence of surface antigens: CD54, CD62E and CD106. Also, the level of CD54, CD62E and CD106 transcripts using real-time PCR was evaluated. Results showed that H6 stimulates expression of adhesion molecules both on transcript and protein level. Using

synthetic inhibitor of JAK/STAT pathway, H6-dependent activation of JAK/STAT pathway was confirmed.

In the next step the analysis of promoters of CD54, CD62E and CD106 molecules was performed. Computer analysis of investigated promoters indicated the presence of STAT binding sites in their sequence. Using reporter vectors containing STAT binding sites, I proved, that stimulation of HUVECs with H6, via activation of STAT proteins enhances transcriptional activity of adhesion molecules promoters. EMSA experiment confirmed the presence of functional STAT3 binding sites in CD54, CD62E and CD106 promoters.

The next stage of the study compared the adherence activity of IL-6 with H6. It was shown that both cytokines enhances lymphocyte binding to EC. After H6 stimulation, number of binded lymphocytes was three-fold higher comparing to unstimulated cells, and 2-fold comparing to IL-6 treatment.

The purpose of the experiments shown in this thesis was to answer the question, if H6 via activation of JAK/STAT pathway, regulates the function of endothelial cells. This was estimated by the analysis of the expression of three adhesion molecules (CD54, CD62E, CD106), regulation of transcriptional activity of promoters of those molecules and enhanced lymphocyte adhesion to EC.

This study shows, that treatment of endothelial cells with H6 increases the expression of three investigated adhesion molecules, via JAK/STAT pathway. both on transcript and on cell surface protein level. It also increased transcriptional activity of CD54, CD62E and CD106 promoters. Moreover, incubation of EC with IL-6 and H6 enhanced their adhesiveness for lymphocytes.

9 PIŚMIENICTWO

1. Briscoe, J., et al., *JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1996. **351**(1336): p. 167-71.
2. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds*. Circ Res, 2007. **100**(2): p. 174-90.
3. Jaffe, E.A., L.W. Hoyer, and R.L. Nachman, *Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2757-64.
4. Gimbrone, M.A., Jr., R.S. Cotran, and J. Folkman, *Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis*. J Cell Biol, 1974. **60**(3): p. 673-84.
5. Weibel, E.R. and G.E. Palade, *New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia*. J Cell Biol, 1964. **23**: p. 101-12.
6. Vardam, T.D., et al., *Regulation of a lymphocyte-endothelial-IL-6 trans-signaling axis by fever-range thermal stress: hot spot of immune surveillance*. Cytokine, 2007. **39**(1): p. 84-96.
7. Yoshida, M., et al., *Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton*. J Cell Biol, 1996. **133**(2): p. 445-55.
8. Hidalgo, A., et al., *Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 477-89.
9. Ni, Z. and B. Walcheck, *Cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) T cells up-regulate P-selectin ligand expression upon their activation*. Clin Immunol, 2009. **133**(2): p. 257-64.
10. Hubbard, A.K. and R. Rothlein, *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(9): p. 1379-86.
11. Celli, L., et al., *Evidence of a functional role for interaction between ICAM-1 and nonmuscle alpha-actinins in leukocyte diapedesis*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 4113-21.
12. Sans, E., E. Delachanal, and A. Duperray, *Analysis of the roles of ICAM-1 in neutrophil transmigration using a reconstituted mammalian cell expression model: implication of ICAM-1 cytoplasmic domain and Rho-dependent signaling pathway*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 544-51.
13. Slish, J.E., Jr., et al., *Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8529-33.
14. Schenkel, A.R., Z. Mamdouh, and W.A. Muller, *Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 393-400.
15. Kanters, E., et al., *Filamin B mediates ICAM-1-driven leukocyte transendothelial migration*. J Biol Chem, 2008. **283**(46): p. 31830-9.
16. Adamson, P., et al., *Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2964-73.

17. Etienne-Manneville, S., et al., *ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3375-83.
18. Yang, L., et al., *Endothelial cell cortactin phosphorylation by Src contributes to polymorphonuclear leukocyte transmigration in vitro*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 394-402.
19. Wang, Q. and C.M. Doerschuk, *The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6877-84.
20. Wang, Q. and C.M. Doerschuk, *Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6487-94.
21. Ronald, J.A., et al., *Differential regulation of transendothelial migration of THP-1 cells by ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(4): p. 601-9.
22. van Wetering, S., et al., *VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(2): p. C343-52.
23. Kelly, K.A., et al., *SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leukocyte transmigration*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(3): p. 748-56.
24. van Wetering, S., et al., *Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 9): p. 1837-46.
25. Abdala-Valencia, H. and J.M. Cook-Mills, *VCAM-1 signals activate endothelial cell protein kinase Calpha via oxidation*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6379-87.
26. Carlsen, H.S., et al., *Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules*. Blood, 2005. **106**(2): p. 444-6.
27. Barreiro, O., et al., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. J Cell Biol, 2002. **157**(7): p. 1233-45.
28. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. J Cell Biol, 2004. **167**(2): p. 377-88.
29. Arnaout, M.A., B. Mahalingam, and J.P. Xiong, *Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 381-410.
30. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
31. Marchesi, V.T. and J.L. Gowans, *The Migration of Lymphocytes through the Endothelium of Venules in Lymph Nodes: an Electron Microscope Study*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1964. **159**: p. 283-90.
32. Tiruppathi, C., et al., *Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability*. Vascul Pharmacol, 2002. **39**(4-5): p. 173-85.
33. Shaw, S.K., et al., *Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2323-30.
34. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 327-34.

35. Dejana, E., *Endothelial cell-cell junctions: happy together*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(4): p. 261-70.
36. Wegmann, F., et al., *ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1671-7.
37. Schenkel, A.R., et al., *CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 143-50.
38. Lou, O., et al., *CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 1136-43.
39. Feng, D., et al., *Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 903-15.
40. Engelhardt, B. and H. Wolburg, *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 2955-63.
41. Cinamon, G., et al., *Chemoattractant signals and beta 2 integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7282-91.
42. Millan, J., et al., *Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(2): p. 113-23.
43. Nieminen, M., et al., *Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(2): p. 156-62.
44. Dvorak, A.M. and D. Feng, *The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle*. J Histochem Cytochem, 2001. **49**(4): p. 419-32.
45. Pober, J.S., et al., *Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells*. J Immunol, 1986. **136**(5): p. 1680-7.
46. Bevilacqua, M.P., et al., *Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9238-42.
47. Bevilacqua, M.P., et al., *Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins*. Science, 1989. **243**(4895): p. 1160-5.
48. Redlich, K., et al., *Rheumatoid arthritis therapy after tumor necrosis factor and interleukin-1 blockade*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(12): p. 3308-19.
49. Hoefen, R.J. and B.C. Berk, *The role of MAP kinases in endothelial activation*. Vascul Pharmacol, 2002. **38**(5): p. 271-3.
50. Viemann, D., et al., *Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3365-73.
51. Denk, A., et al., *Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28451-8.
52. Gustin, J.A., et al., *Tumor necrosis factor activates CRE-binding protein through a p38 MAPK/MSK1 signaling pathway in endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(3): p. C547-55.
53. Ridley, S.H., et al., *Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels*, in J Immunol. 1997. p. 3165-73.

54. Dustin, M.L., et al., *Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)*. J Immunol, 1986. **137**(1): p. 245-54.
55. Kuldo, J.M., et al., *Differential effects of NF- κ B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF- α - and IL-1 β -induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(5): p. C1229-39.
56. Chang, C.H., Y. Huang, and R. Anderson, *Activation of vascular endothelial cells by IL-1 α released by epithelial cells infected with respiratory syncytial virus*. Cell Immunol, 2003. **221**(1): p. 37-41.
57. Modur, V., et al., *Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 13094-102.
58. Sawa, Y., et al., *Effects of TNF- α on leukocyte adhesion molecule expressions in cultured human lymphatic endothelium*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(7): p. 721-33.
59. Ledebur, H.C. and T.P. Parks, *Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF- κ B site and p65 homodimers*. J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 933-43.
60. Wertheimer, S.J., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor- α and phorbol myristate acetate*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 12030-5.
61. Pai, R., et al., *TNF- α stimulates monocyte adhesion to glomerular mesangial cells. The role of intercellular adhesion molecule-1 gene expression and protein kinases*. J Immunol, 1996. **156**(7): p. 2571-9.
62. Krunkosky, T.M., et al., *Tumor necrosis factor alpha (TNF α)-induced ICAM-1 surface expression in airway epithelial cells in vitro: possible signal transduction mechanisms*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **796**: p. 30-7.
63. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
64. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochem J, 1994. **300** (Pt 2): p. 281-90.
65. Stahl, N., et al., *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components*. Science, 1994. **263**(5143): p. 92-5.
66. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
67. Boulanger, M.J., et al., *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex*. Science, 2003. **300**(5628): p. 2101-4.
68. Sui, X., et al., *gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2859-63.
69. Brasier, A.R., *The nuclear factor- κ B-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation*. Cardiovasc Res. **86**(2): p. 211-8.
70. Wang, Y. and G.M. Fuller, *Phosphorylation and internalization of gp130 occur after IL-6 activation of Jak2 kinase in hepatocytes*. Mol Biol Cell, 1994. **5**(7): p. 819-28.

71. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(2): p. 227-36.
72. Chung, C.D., et al., *Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3*. Science, 1997. **278**(5344): p. 1803-5.
73. Schmitz, J., et al., *SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12848-56.
74. Bacon, K., A. Gearing, and R. Camp, *Induction of in vitro human lymphocyte migration by interleukin 3, interleukin 4, and interleukin 6*. Cytokine, 1990. **2**(2): p. 100-5.
75. Maruo, N., et al., *IL-6 increases endothelial permeability in vitro*. Endocrinology, 1992. **131**(2): p. 710-4.
76. Holzinger, C., et al., *Effects of interleukin-1, -2, -4, -6, interferon-gamma and granulocyte/macrophage colony stimulating factor on human vascular endothelial cells*. Immunol Lett, 1993. **35**(2): p. 109-17.
77. Wung, B.S., C.W. Ni, and D.L. Wang, *ICAM-1 induction by TNFalpha and IL-6 is mediated by distinct pathways via Rac in endothelial cells*. J Biomed Sci, 2005. **12**(1): p. 91-101.
78. Watson, C., et al., *IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes*. Clin Exp Immunol, 1996. **105**(1): p. 112-9.
79. Roebuck, K.A. and A. Finnegan, *Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 876-88.
80. Pober, J.S., *Endothelial activation: intracellular signaling pathways*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S109-16.
81. Chen, Q., et al., *Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1299-308.
82. Wung, B.S., et al., *Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation*. Life Sci, 2005. **78**(4): p. 389-97.
83. Modur, V., et al., *Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2752-6.
84. Romano, M., et al., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment*. Immunity, 1997. **6**(3): p. 315-25.
85. Chen, S.C., et al., *Herbal remedy magnolol suppresses IL-6-induced STAT3 activation and gene expression in endothelial cells*. Br J Pharmacol, 2006. **148**(2): p. 226-32.
86. Rakemann, T., et al., *The designer cytokine hyper-interleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription in vivo and in vitro*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1257-66.
87. Fischer, M., et al., *I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(2): p. 142-5.
88. Berenson, L.S., et al., *Selective requirement of p38alpha MAPK in cytokine-dependent, but not antigen receptor-dependent, Th1 responses*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4616-21.
89. Lee, P.J., et al., *ERK1/2 mitogen-activated protein kinase selectively mediates IL-13-induced lung inflammation and remodeling in vivo*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 163-73.

90. Tebbutt, N.C., et al., *Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1089-97.
91. Mertens, C. and J.E. Darnell, Jr., *SnapShot: JAK-STAT signaling*. Cell, 2007. **131**(3): p. 612.
92. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2623-9.
93. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334** (Pt 2): p. 297-314.
94. Thiel, S., et al., *Termination of IL-6-induced STAT activation is independent of receptor internalization but requires de novo protein synthesis*. FEBS Lett, 2000. **470**(1): p. 15-9.
95. Lackmann, M., et al., *Biomolecular interaction analysis of IFN gamma-induced signaling events in whole-cell lysates: prevalence of latent STAT1 in high-molecular weight complexes*. Growth Factors, 1998. **16**(1): p. 39-51.
96. Ndubuisi, M.I., et al., *Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer?* J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25499-509.
97. Ota, N., et al., *N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation*. Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 208-15.
98. Braunstein, J., et al., *STATs dimerize in the absence of phosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34133-40.
99. Sehgal, P.B., *Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(4): p. 329-40.
100. Levy, D.E. and J.E. Darnell, Jr., *Stats: transcriptional control and biological impact*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 651-62.
101. Sehgal, P.B., *Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(3): p. 583-94.
102. Schindler, C., et al., *Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor*. Science, 1992. **257**(5071): p. 809-13.
103. Haspel, R.L. and J.E. Darnell, Jr., *A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10188-93.
104. Shah, M., et al., *Membrane-associated STAT3 and PY-STAT3 in the cytoplasm*. J Biol Chem, 2006. **281**(11): p. 7302-8.
105. Sehgal, P.B., et al., *Different patterns of regulation of Tyr-phosphorylated STAT1 and STAT3 in human hepatoma Hep3B cells by the phosphatase inhibitor orthovanadate*. Arch Biochem Biophys, 2003. **412**(2): p. 242-50.
106. Liu, L., K.M. McBride, and N.C. Reich, *STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8150-5.
107. Reich, N.C. and L. Liu, *Tracking STAT nuclear traffic*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 602-12.
108. Marg, A., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1*. J Cell Biol, 2004. **165**(6): p. 823-33.
109. Pranada, A.L., et al., *Real time analysis of STAT3 nucleocytoplasmic shuttling*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15114-23.
110. Chatterjee-Kishore, M., et al., *How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene*. Embo J, 2000. **19**(15): p. 4111-22.

111. Burdelya, L., et al., *Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 3925-31.
112. Wang, T., et al., *Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 48-54.
113. Kortylewski, M. and H. Yu, *Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 228-33.
114. Williams, L., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 567-76.
115. Yu, H., M. Kortylewski, and D. Pardoll, *Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 41-51.
116. Kortylewski, M., et al., *Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1314-21.
117. Wang, W., et al., *Modulation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 signaling in melanoma by high-dose IFNalpha2b*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(5): p. 1523-31.
118. Nawrocki, S. and A. Mackiewicz, *Clinical trials of active cancer immunotherapy*. Expert Opin Investig Drugs, 2007. **16**(8): p. 1137-41.
119. Blaskovich, M.A., et al., *Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice*. Cancer Res, 2003. **63**(6): p. 1270-9.
120. Nefedova, Y., et al., *Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9525-35.
121. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
122. Lamerant, N. and C. Kieda, *Adhesion properties of adhesion-regulating molecule 1 protein on endothelial cells*. Febs J, 2005. **272**(8): p. 1833-44.
123. Anichini, A., et al., *Differentiation of CD8+ T cells from tumor-invaded and tumor-free lymph nodes of melanoma patients: role of common gamma-chain cytokines*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 2134-41.
124. Ward, L.D., et al., *High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 23286-9.
125. Heaney, M.L. and D.W. Golde, *Soluble cytokine receptors*. Blood, 1996. **87**(3): p. 847-57.
126. Gaillard, J.P., et al., *Interleukin-6 receptor signaling. I. gp80 and gp130 receptor interaction in the absence of interleukin-6*. Eur Cytokine Netw, 1999. **10**(1): p. 43-8.
127. Gaillard, J., et al., *Interleukin-6 receptor signaling. II. Bio-availability of interleukin-6 in serum*. Eur Cytokine Netw, 1999. **10**(3): p. 337-44.
128. Peters, M., et al., *In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3575-81.
129. Peters, M., et al., *The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6*

- and prolongation of the plasma half-life of IL-6.* J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1399-406.
130. Hirota, H., et al., *Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma.* J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2627-34.
131. Jostock, T., et al., *Immunoadhesins of interleukin-6 and the IL-6/soluble IL-6R fusion protein hyper-IL-6.* J Immunol Methods, 1999. **223**(2): p. 171-83.
132. Mackiewicz, A., et al., *Gene therapy of human melanoma. Immunization of patients with autologous tumor cells admixed with allogeneic melanoma cells secreting interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor.* Hum Gene Ther, 1995. **6**(6): p. 805-11.
133. Mackiewicz, A., et al., *Soluble interleukin 6 receptor is biologically active in vivo.* Cytokine, 1995. **7**(2): p. 142-9.
134. Naik, S.M., et al., *Interferon gamma-dependent induction of human intercellular adhesion molecule-1 gene expression involves activation of a distinct STAT protein complex.* J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1283-90.
135. Caldenhoven, E., et al., *Stimulation of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter by interleukin-6 and interferon-gamma involves binding of distinct factors to a palindromic response element.* J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21146-54.
136. Whitley, M.Z., et al., *A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 6464-75.
137. Whelan, J., et al., *An NF kappa B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription.* Nucleic Acids Res, 1991. **19**(10): p. 2645-53.
138. Lewis, H., et al., *Cooperativity between two NF-kappa B complexes, mediated by high-mobility-group protein I(Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 5701-9.
139. Schindler, U. and V.R. Baichwal, *Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 5820-31.
140. Iademarco, M.F., et al., *Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1).* J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16323-9.
141. Neish, A.S., et al., *Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter.* J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1583-93.
142. Yang, X.P., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3alpha and specificity protein 1 interact to upregulate intercellular adhesion molecule-1 in ischemic-reperfused myocardium and vascular endothelium.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(7): p. 1395-400.
143. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic.* Nature, 1998. **392**(6676): p. 565-8.
144. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions.* Science, 1998. **279**(5349): p. 381-4.
145. Cyster, J.G., *Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs.* Science, 1999. **286**(5447): p. 2098-102.
146. Buchsbaum, M.E., T.S. Kupper, and G.F. Murphy, *Differential induction of intercellular adhesion molecule-1 in human skin by recombinant cytokines.* J Cutan Pathol, 1993. **20**(1): p. 21-7.

147. Ohteki, T., et al., *Elevated production of interleukin 6 by hepatic MNC correlates with ICAM-1 expression on the hepatic sinusoidal endothelial cells in autoimmune MRL/lpr mice*. Immunol Lett, 1993. **36**(2): p. 145-52.
148. Detmar, M., et al., *Cytokine regulation of proliferation and ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro*. J Invest Dermatol, 1992. **98**(2): p. 147-53.
149. Lassalle, P., et al., *Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells during the late asthmatic reaction: role of macrophage-derived tumour necrosis factor-alpha*. Clin Exp Immunol, 1993. **94**(1): p. 105-10.
150. Delomenie, C., et al., *Modulation of human endothelial cell activation by antiproliferative cytokines: exploration of arachidonic acid and intracellular cytokine pathways as possible mechanisms of action*. Exp Cell Res, 1993. **207**(1): p. 122-30.
151. de Vries, H.E., et al., *Lymphocyte adhesion to brain capillary endothelial cells in vitro*. J Neuroimmunol, 1994. **52**(1): p. 1-8.
152. Sironi, M., et al., *IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 549-53.
153. Paprocka, M., et al., *Flow cytometric assay for quantitative and qualitative evaluation of adhesive interactions of tumor cells with endothelial cells*. Microvasc Res, 2008. **76**(2): p. 134-8.