

**UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI**

Grzegorz Kaczmarczyk

**RECEPTORY DLA CHEMOKIN W INTERAKCJACH MONOCYTÓW
Z KOMÓRKAMI NOWOTWOROWYMI**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. zw. dr hab. med. Marek Zembala

Zakład Immunologii Klinicznej Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik Katedry i Zakładu: Prof. zw. dr hab. med. Marek Zembala

Kraków 2005

**Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Komitetu Badań Naukowych (grant
promotorski Nr 3PO5A 144 24)**

Składam serdeczne podziękowania Prof. zw. dr hab. med. Markowi Zembali za wszechstronną pomoc i cenne uwagi w trakcie powstawania niniejszej pracy, a także dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Immunologii Klinicznej za wskazówki merytoryczne oraz okazaną wspaniałą pomoc i wiele życzliwości.

Spis treści:

UŻYWANE SKRÓTY

1. WSTĘP.	
1. 1. Rola monocytów/makrofagów w reakcjach immunologicznych i zapalnych.	9
1. 2. Monocyty/makrofagi w reaktywności przeciwnowotworowej.	10
1. 3. Chemokiny.	13
<i>1. 3. 1. Struktura i aktywność biologiczna.</i>	13
<i>1. 3. 2. Chemokiny oddziaływujące z monocytami.</i>	15
<i>1. 3. 3. Chemokiny produkowane przez monocyty.</i>	17
1. 4. Receptory dla chemokin.	17
<i>1. 4. 1. Budowa receptorów chemokinowych i przenoszenie sygnału po połączeniu z ligandem.</i>	17
<i>1. 4. 2. Receptory chemokinowe monocytów.</i>	21
1. 5. Chemokiny i receptory chemokinowe w chorobie nowotworowej.	23
<i>1. 5. 1. Chemokiny w chorobie nowotworowej.</i>	23
<i>1. 5. 2. Receptory chemokinowe komórek nowotworowych.</i>	25
1. 6. Modulacja reaktywności immunologicznej przez gangliozydy komórek nowotworowych.	26
<i>1. 6. 1. Budowa i funkcje biologiczne gangliozydów.</i>	26
<i>1. 6. 2. Gangliozydy komórek nowotworowych w hamowaniu reaktywności przeciwnowotworowej.</i>	26
2. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY.	
2. 1. Cel pracy.	28
2. 2. Cele szczegółowe.	28
3. MATERIAŁY I METODY.	
3. 1. Izolacja monocytów.	30
3. 2. Linie komórkowe.	30
3. 3. Hodowle monocytów z komórkami nowotworowymi.	31
3. 4. Określenie ekspresji CXCR4 na monocytach po kontakcie z komórkami nowotworowymi.	31
3. 5. Ocena ekspresji CXCR4 na monocytach oddzielonych błoną mikroporową od komórek nowotworowych.	31

3. 6. Ocena ekspresji innych receptorów chemokinowych na monocytach.	32
<i>3.6.1. Określenie efektu nadsączy z hodowli komórek nowotworowych.</i>	32
<i>3.6.2. Określenie efektu gangliozydów.</i>	32
3. 7. Badanie ekspresji HLA klasy I i II na monocytach.	33
3. 8. Chemotaksja monocytów.	33
3. 9. Ekspresja mRNA receptorów chemokinowych w monocytach.	34
3. 10. Ekspresja cytoplazmatyczną CXCR4 w monocytach.	35
3. 11. Wydzielanie TNFα, IL-10 i IL-12p40 przez monocyty.	35
3. 12. Produkcja ROI przez monocyty.	36
3. 13. Wydzielanie chemokin przez monocyty.	37
3. 14. Analiza statystyczna.	37
4. WYNIKI.	
4. 1. Ekspresja CXCR4 na monocytach po kontakcie z komórkami nowotworowymi.	38
4. 2. Ekspresja CXCR4 na monocytach hodowanych z komórkami nowotworowymi poddanymi uprzednio działaniu inhibitora syntezy gangliozydów.	38
4. 3. Ekspresja CXCR4 na monocytach hodowanych z komórkami nowotworowym oddzielonymi błoną mikroporową.	39
4. 4. Ekspresja CCR1, CCR5 i CXCR4 na monocytach poddanych działaniu nadsączy z hodowli komórek nowotworowych.	39
4. 5. Wpływ gangliozydów na ekspresję CCR1, CCR2, CCR5 i CXCR4 na monocytach.	40
4. 6. Wpływ różnych gangliozydów na ekspresję CCR1, CCR5 i CXCR4.	41
4. 7. Ekspresja HLA klasy I (ABC), HLA klasy II (DR) na monocytach hodowanych w obecności gangliozydów.	41
4. 8. Wpływ gangliozydów na migrację monocytów do mieszaniny chemokin.	41
4. 9. Wpływ gangliozydów GM₂ i GT_{1b} na migrację monocytów do poszczególnych chemokin.	42
4. 10. Ekspresja mRNA dla receptorów CCR1, CCR5 i CXCR4 w monocytach niestymulowanych oraz poddanych działaniu gangliozydów GM₂ i GT_{1b}.	42
4. 11. Wpływ gangliozydów GM₂ i GT_{1b} na ekspresję cytoplazmatyczną CXCR4 na monocytach.	43

4. 12. Wpływ gangliozydów na wydzielanie cytokin: TNFα, IL-10 i IL-12 przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.	43
4. 13. Wpływ gangliozydów na produkcję reaktywnych form tlenu (ROI) przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.	44
4. 14. Wpływ gangliozydów na produkcję anionorodnika ponadtlenowego (O$_2^-$) przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.	44
4. 15. Indukcja sekrecji chemokin przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.	45
4. 16. Wpływ gangliozydów na wydzielanie MIP-1α przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.	45
5. DYSKUSJA.	47
6. WNIOSKI.	56
7. STRESZCZENIE.	58
8. PIŚMIENNICTWO.	60
9. TABELLE I FIGURY.	85

UŻYWANE SKRÓTY:

ADCC	(antibody-dependent cellular cytotoxicity) – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
ANG	(angiopoetine) - angiopoetyna
CCL, CXCL	chemokiny grupy CC i CXC
CCR, CXCR	receptory dla chemokin z grupy CC i CXC
CD	(cluster of differentiation) – kompleks różnicowania
CSF	(colony stimulating factor) - czynnik stymulujący powstawanie kolonii
DAG	diacylglicerol
EGF	(epidermal growth factor) – epidermalny czynnik wzrostu
EGFR	(epidermal growth factor receptor) receptor epidermalnego czynnika wzrostu
ELR	konserwatywna sekwencja trzech aminokwasów Glu-Leu-Arg w obrębie grupy chemokin CXC
ERK	(extracellular-signal-regulated kinase) – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
EGF	(endothelial growth factor) – endotelialny czynnik wzrostu
GAGs	glukozaaminoglikany
G-CSF	(granulocyte - colony stimulating factor) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
GD, GM, GT	(disialo-, monosialo-, trisialo ganglioside) – gangliozydy z jedną, dwoma lub trzema resztami kwasu sialowego
GDP (GTP)	guanozyna di(tri)-fosforan
GM-CSF	(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
HCC	(hemofiltrate C-C chemokine) – chemokina C-C pochodząca z hemofiltratu
HGF	(Hepatocyte Growth Factor) – czynnik wzrostu hepatocytów
IFN γ	interferon γ
IFN γ -R	receptor dla IFN γ
IL	interleukina
iNOS	(inducible nitric oxide synthase)- indukowalna syntaza tlenku azotu

JAK/STAT	(Janus kinases/signal transducer and activator of transcription) – kinazy Janus/przenośniki sygnału i aktywatory transkrypcji
JNK	(c-Jun NH2-terminal protein kinase) – kinaza białkowa na N-końcu białka c-Jun
LTs	(leukotriens) - leukotrieny
MAP	(mitogen activated proteins) – białka aktywowane mitogenami
MAPK	(mitogen-activated protein kinases) – aktywowane mitogenami kinazy białek
M-CSF	(macrophage colony-stimulating factor) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagowych
MGSA/GRO	(Melanoma Growth Stimulating Activity/Growth-regulated oncogene) - aktywność stymulująca wzrost czerniaka/onkogen związany ze wzrostem
MMP	(metalloproteinase) – metaloproteinaza
MTC	(macrophage-mediated tumor cytotoxicity) – cytotoksyczność zależna od makrofagów
NO	(nitric oxide) - tlenek azotu
PAF	(platelet activating factor) - czynnik aktywujący płytki krwi
PBMC	(peripheral blood mononuclear cells) – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PDGF	(plated derived growth factor) – płytkowy czynnik wzrostu
PF	(platelet factor) – czynnik płytkowy
PG	(prostaglandin) - prostaglandyna
PKC	(protein kinase C) – kinaza białkowa C
PKA	(cAMP-dependent kinase) – kinaza białkowa zależna od cAMP
PLC	(phospholipase C) - fosfolipaza C
PRR	(pattern recognition receptors) – receptory rozpoznające wzór strukturalnych składników błony komórkowej
PTK	(tyrosine-protein kinase) – kinaza tyrozynowa
RANTES	(regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted) - regulowany przez aktywację; ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T
RGS	(regulators of G-protein signaling) – białka regulujące sygnałowanie białek G

RNI	(reactive nitrogen intermediates) - reaktywne formy azotu
ROI	(reactive oxygen intermediates) - reaktywne formy tlenu
TGF	(transforming growth factor) – transformujący czynnik wzrostu
TIM	(tumour infiltrating macrophages) - makrofagi naciekające guz
TLR	(Toll-like receptors) – receptory Toll-podobne
TNF	(tumour necrosis factor) - czynnik martwicy nowotworu
uPA	(urokinase plasminogen activator) – aktywator plazminogenu
VCAM	(vascular cell adhesion molecule) - cząstka adhezyjna komórek naczyń
VEGF	(vascular endothelial growth factor) - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
VLA	(very late antigens) – bardzo późne antygeny

1. WSTĘP.

1.1. Monocyty/makrofagi w reakcjach immunologicznych i zapalnych.

Monocyty/makrofagi stanowią istotny element odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenia, proces nowotworowy i stres. Odgrywają także istotną rolę w regulacji procesu zapalnego, swoistej odporności komórkowej i przebudowie otaczającej tkanki. Monocyty krążące w krwioobiegu stanowią heterogenną populację komórek, które po opuszczeniu łożyska naczyniowego różnicują się w kierunku dojrzałych makrofagów tkankowych (makrofagi płucne, otrzewnowe, komórki Kupffera, itp.). Ekspresja molekuł adhezyjnych umożliwia adhezję monocytów do śródbłonna naczyniowego i jest etapem wstępnym w procesie ich migracji do tkanek.

Chemokiny umożliwiają migrację monocytów do ogniska zapalnego lub nowotworu. Aktywacja monocytów/makrofagów prowadzi do uwalniania przez nie szeregu różnych czynników (zidentyfikowano ich ponad 120), m.in.: cytokiny: interleukiny (IL) IL-1, IL-6, IL-12), czynnik martwicy nowotworu ($\text{TNF}\alpha$, tumor necrosis factor α), interferon α i β ($\text{IFN}\alpha$ i β , interferon α i β) oraz czynniki wzrostowe np.: płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, platelet derived growth factor), czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, vascular endothelial growth factor), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF, macrophage colony-stimulating factor), reaktywne formy tlenu (ROI, reactive oxygen intermediates) i azotu (RNI, reactive nitrogen intermediates), metabolity kwasu arachidonowego (prostaglandyny, leukotrieny), czynnik aktywujący płytki krwi (PAF, platelet activating factor), składniki dopełniacza (C1-C5, czynnik B, D, properdyna), czynniki krzepnięcia (V, VII, IX, X, protrombina), proteazy.

Monocyty regulują również procesy zapalne poprzez produkcję transformującego czynnika wzrostu ($\text{TGF-}\beta$, transforming growth factor), który powoduje zahamowanie proliferacji i aktywności limfocytów w miejscu zapalenia, a wraz z IL-1, $\text{TNF}\alpha$ i PDGF bierze udział w procesach naprawczych tkanek. Regulacja procesu zapalnego może odbywać się również poprzez produkcję inhibitorów enzymów ograniczających proces zapalny (α 2-makroglobulina, α 1-antyproteaza). Monocyty posiadają zdolność do rozpoznawania struktur błon komórkowych mikroorganizmów poprzez receptory powierzchniowe rozpoznające wzór strukturalnych składników błony komórkowej (PRR, pattern recognition receptors). Wybuch

tlenowy, który zachodzi w monocytach podczas fagocytozy odgrywa główną rolę w zabijaniu wewnątrzkomórkowym pochłoniętych mikroorganizmów. W ostrych i przewlekłych procesach zapalnych oraz w reaktywności przeciwnowotworowej gospodarza monocyty/makrofagi wykazują przeciwstawne funkcje biologiczne.

1.2. Monocyty/makrofagi w reaktywności przeciwnowotworowej.

Monocyty/makrofagi stanowią istotną komponentę komórkowej reaktywności gospodarza na rozwijający się nowotwór. Stanowią one kluczowy regulator ilości i aktywności wielu innych typów komórek zaangażowanych w procesy odporności oraz produkują czynniki wzrostowe, proangiogenne oraz proteazy. Monocyty wywierają również pośredni i bezpośredni efekt cytotoksyczny na komórki nowotworowe. Funkcja naciekających nowotwór makrofagów (TIM, tumour infiltrating macrophages) w różnych typach nowotworów jest jednak zróżnicowana i niejednoznaczna [1, 2]. Aczkolwiek większość TIM pochodzi od monocytów krwi obwodowej migrujących do guza nowotworowego z krwioobiegu [3] mikrośrodowisko nowotworu umożliwia również lokalną proliferację makrofagów [4].

Migracja monocytów do nowotworu jest sterowana poprzez miejscowo wydzielane chemokiny, np.: MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1, CCL2). Sugeruje się, że MCP-1 jest głównym czynnikiem regulującym poziom TIM [5] poprzez modulację powierzchniowej ekspresji molekuł adhezyjnych, zwłaszcza β_2 integryn (CD11b/CD18 i CD11c/CD18), które ułatwiają przyleganie monocytów do śródbłonna naczyniowego [6]. TIM stanowią główną komponentę nacieku komórek jednojądrzastych w nowotworach [7], mogą stanowić nawet 80% masy guza [8] i są zlokalizowane zarówno wewnątrz masy guza jak też na jego obrzeżach. Obecność TIM opisano w podścielisku raka okrężnicy [9], piersi [10], skóry [11], płuc, jajnika i czerniaka [12, 13]. TIM modulują wzrost nowotworu poprzez wpływ na proliferację/niszczenie komórek guza oraz neoangiogenezę.

Aczkolwiek TIM hamują wzrost ludzkich nowotworów [14] to również, zwłaszcza w zaawansowanych stadiach, działanie TIM może sprzyjać miejscowej progresji nowotworu [15]. Przeciwnowotworowa aktywność TIM jest znacząco obniżona w porównaniu do monocytów krwi obwodowej [14]. TIM mogą stymulować miejscowy wzrost i przerzutowanie nowotworów poprzez produkcję obojętnych proteaz - metaloproteinaz, (MMP, matrix metalloproteinases) 2, 7 i 9, katepsyn, które niszczą błonę podstawną, degradują i przebudowują otaczającą tkankę. W zależności od zdolności do tworzenia

przerzutów komórki nowotworowe aktywują monocyty do produkcji MMP-2 i MMP-9 [16]. TIM wydzielają również różne czynniki wzrostu: VEGF, czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, hepatocyte growth factor), PDGF, TGF β , epidermalny czynnik wzrostu (EGF, epidermal growth factor), cytokiny (IL-1, -6, -8, TNF α) i chemokiny NAP-2 (CXCL7, neutrophil activating peptide 2), ENA-78 (CXCL5, epithelial-derived neutrophil activating protein 78) i GRO α (CXCL1, growth regulated oncogene), co wspomaga proces proliferacji komórek nowotworowych i zapobiega ich apoptozie [17]. IL-8 (CXCL8), NAP-2, ENA-78 i GRO α , są silnymi czynnikami angiogennymi, podczas gdy chemokiny IP-10 (CXCL10, interferon-alpha inducible protein 10) i MIG (CXCL9, monokine induced by gamma interferon) wykazują działanie angiostatyczne [18]. Również MCP-1 stymuluje rozrost nowotworu przez zwiększanie akumulacji TIM i angiogenezy [19, 20].

Niektóre komórki nowotworowe produkują IL-10, prostaglandynę E₂ (PGE₂, prostaglandine E₂), TGF β , M-CSF i rozpuszczalną formę receptora dla TNF α (soluble TNF α , sTNF α), które hamują przeciwnowotworową aktywność monocytów. Komórki nowotworowe wpływają na funkcję monocytów również przez indukcję zmian w metabolizmie eikozanoidów: prostaglandyn (PG, prostaglandin), tromboksanów (TX, tromboxane), leukotrienów (LT, leukotriens) i kwasu hydroksyeikosanoidowego [21] oraz stymulują monocyty do produkcji PGE₂, której podwyższony poziom obserwowano w surowicy pacjentów z rakiem nerki [22] oraz różnymi typami nowotworów przewodu pokarmowego [23].

Monocyty człowieka wykazują spontaniczną cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych [24, 25]. Uważa się, że aktywność cytotoksyczna monocytów wymaga bezpośredniego kontaktu z komórką docelową [26] i jest związana z produkcją TNF α , ROI i RNI [25, 27, 28, 29, 30].

W oddziaływaniach monocytów z komórkami nowotworowymi biorą udział różne determinanty powierzchniowe:

- Receptor dla fragmentu Fc IgG (Fc γ RI, CD64) - zaangażowany w cytotoksyczność monocytów zależną od przeciwciał [31]. Ekspresja Fc γ RI jest podwyższona u pacjentów z rakiem płuc, jelita grubego [32], nerki [33] i żołądka [34], lecz ulega obniżeniu u chorych na raka płaskokomórkowego skóry [35] a w raku piersi jest niezmienną [36].

- MHC klasy II, którego ekspresja jest niezbędna dla prezentacji antygenów nowotworowych [36]. Monocyty po kontakcie z komórkami nowotworowymi wykazują znaczący wzrost ekspresji HLA-DR [37].

- CD11b (CR3, łańcuch α receptora dla składowej komplementu C3) jest receptorem biorącym udział w fagocytozie i wybuchu tlenowym w monocytach [38], ich migracji do nowotworu [39] i w procesie adhezji do lamininy [40].

Pro- i przeciwnowotworowa aktywność makrofagów, w tym TIM, zależy między innymi od rodzaju cytokin obecnych w mikrośrodowisku guza:

- $\text{TNF}\alpha$, którego produkcja wzrasta wraz ze wzrostem inwazyjności nowotworu, stymuluje autokrynnie aktywność przeciwnowotworową monocytów [41], wzmacnia ekspresję HLA-DR [42], receptora dla $\text{INF}\gamma$ ($\text{INF}\gamma\text{-R}$, $\text{INF}\gamma\text{-receptor}$) oraz prezentację antygenów przez monocyty [43].

- IL-1 aktywuje przeciwnowotworową aktywność monocytów i wywołuje uwalnianie IL- 1β i $\text{TNF}\alpha$ przez aktywowane $\text{INF}\gamma$ monocyty [44, 45].

- IL-10 hamuje przeciwnowotworową aktywność monocytów poprzez blokowanie produkcji IL- 1β , $\text{TNF}\alpha$ [46] i IL-12 [47]. W nowotworach doświadczalnych IL-10 hamuje angiogenezę oraz wzrost i przerzutowanie komórek czerniaka [48].

- IL-12 wykazuje silne właściwości przeciwnowotworowe, poprzez indukuje produkcję $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$, GM-CSF i IL-8 przez limfocyty T i/lub komórki NK [49, 50] oraz hamuje neoangiogenezę [51].

- IL-18 jest pleiotropową cytokiną wykazującą synergizm z IL-12 i indukuje produkcję $\text{INF}\gamma$ przez limfocyty T. Przeciwnowotworowy efekt IL-18 może wynikać z indukcji apoptozy komórek nowotworowych [52].

- G-CSF wzmacnia ekspresję receptorów CR-1, -3 oraz $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ i $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ (CD16) na monocytach [53, 54]. W wielu typach nowotworów czynnik stymulujący powstawanie kolonii (CSF-1, colony stimulating factor-1) *in situ* powoduje migrację monocytów do guza i wspólnie z IL-6 hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych, zatem osłabia indukcję przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Natomiast CSF-1 związany z błoną komórek nowotworowych aktywuje makrofagi do cytotoksycznego uszkodzenia komórek nowotworowych, a przy obecności w mikrośrodowisku nowotworu IL-4, IL-12 i IL-13 oraz GM-CSF powoduje dojrzewanie komórek dendrytycznych, prezentację antygenów nowotworowych limfocytom T i w konsekwencji indukcję limfocytów cytotoksycznych niszczących komórki nowotworowe [17].

- reaktywne formy tlenu (ROI) produkowane przez monocyty uczestniczą w odpowiedzi przeciwnowotworowej, lecz ich rola nie jest jednoznacznie wyjaśniona u człowieka. Brak jest danych o miejscowej produkcji ROI w podścielisku guza, natomiast częstość występowania

nowotworów u osób wykazujących brak mieloperoksydazy koniecznej do produkcji ROI jest znacznie podwyższone [55]. Stymulacja *in vitro* monocytów komórkami nowotworowymi indukuje produkcję ROI. Hialuronian, główny ligand dla determinanty CD44, którego ekspresja w komórkach nowotworowych jest podwyższona – stymuluje produkcję ROI w monocytach poprzez przyłączenie się do CD44 i prawdopodobnie umożliwia monocytom „rozróżnianie” komórek nowotworowych od prawidłowych [56]. O_2^- , H_2O_2 są głównymi mediatorami spontanicznej cytotoksyczności monocytów wobec komórek nowotworowych [25].

- tlenek azotu (NO, nitric oxide) jest zaangażowany w cytotoksyczność mediowaną przez mysie makrofagi [57]. Cytotoksyczność NO jest związana głównie z produkcją peroksynitrytów ($ONOO^-$) lub nitrozotoli (RSNO) [58, 59, 60]. Ponadto NO hamuje selektywnie syntezę IL-12 przez aktywowane monocyty [61, 62]. Za produkcję NO przez makrofagi odpowiedzialna jest indukowalna syntaza tlenku azotu (iNOS, inducible nitric oxide syntase). IL-1 β , IFN γ , IL-2, TNF α i lipopolisacharyd (LPS, lipopolysaccharide) indukują produkcję iNOS-mRNA, lecz nie NO przez monocyty człowieka [27, 63, 64]. Jednakże niektóre komórki nowotworowe mogą indukować produkcję NO przez monocyty człowieka [27].

- Chemokiny ELR⁺ (zawierające motyw aminokwasowy Glu-Leu-Arg) wydzielane do mikrośrodowiska guza zarówno przez komórki nowotworowe jak i TIM stymulują angiogenezę, rozrost nowotworu i sprzyjają przerzutowaniu. Ekspresja genu kodującego MCP-1 w komórkach raka piersi koreluje z jego stopniem inwazyjności. [65]. W raku jajnika, poziom MCP-1 w surowicy krwi wzrasta wraz z zaawansowaniem choroby [66]. Jednakże produkcja MCP-1 przez komórki nowotworowe może również powodować chemotaksję monocytów do ogniska nowotworowego i zahamowania jego wzrostu [67].

1.3. Chemokiny.

1.3.1. Struktura i aktywność biologiczna.

Chemokiny (por. Tabela 1.) są grupą małych (~8-14kDa) w większości prostych, strukturalnie podobnych cytokin regulujących migrację różnych typów komórek [68]. Większość chemokin to białka wydzielnicze (67-127 aminokwasów). Tylko SCYB6 (CXCL16, small inducible cytokine) i fraktalkina (CX3CL1, fractalkine) są wbudowane w błonę komórkową [69]. *In vivo* chemokiny są unieruchomione na macierzy zewnątrzkomórkowej lub na powierzchni błony komórkowej przez przyłączenie do

glukozaaminoglikanów (GAG, glycosaminoglycans) [70]. Podczas gdy chemokiny połączone GAG z błony komórkowej wykazują zwiększoną aktywność, ich rozpuszczalne kompleksy są niezdolne do łączenia się z receptorami [71]. Chemokiny posiadają 2 miejsca interakcji z receptorami. [72], które składają się z 2 etapów – przyłączenia się i inicjacji sygnału („docking” i „triggering”) [73].

Większość chemokin posiada cztery charakterystyczne reszty cysteinowe. W zależności od ułożenia dwóch pierwszych cystein chemokiny zostały podzielone na klasy: CXC lub α , CC lub β , C lub γ i CX3C lub δ . Jedynym wyjątkiem od obecności 4 cystein jest limfotaktyna (XCL1, lymphotactine), która posiada tylko jedną cysteinę [74]. Dwa wiązania dwusiarczkowe są formowane pomiędzy pierwszą i trzecią oraz między drugą i czwartą cysteiną [75].

Rodzina chemokin CXC została podzielona na dwie grupy w zależności od obecności lub braku na ich końcu zasadowym (NH_2) motywu ELR poprzedzającego pierwszą cysteinę [75]. Chemokiny CXC ELR⁺: GRO α , ENA-78, NAP-2, IL-8 działają chemotaktycznie na neutrofile i proangiogenetycznie, natomiast chemokiny ELR⁻ PF-4 (CXCL4, platelet factor 4), MIG, IP-10 są chemotaktyczne dla limfocytów i antyangiogenetyczne [76, 77]. Chemokiny grupy CC działają na monocyty, eozynofile, bazofile, komórki dendrytyczne limfocyty i komórki NK z różną selektywnością, lecz nie działają na neutrofile [78, 79, 80]. Chemokiny grupy ELR⁺ łączą się głównie z receptorem CXCR2 a kilka z CXCR1, podczas gdy CXCR3, 4 i 5 są receptorami dla chemokin ELR⁻ (bez motywu amonokwasowego Glu-Leu-Arg). Pojedyncza chemokina może przyłączać się do kilku receptorów, a pojedynczy receptor chemokinowy może przenosić sygnał od więcej niż jednej chemokiny [68]. Klasyfikację chemokin i ich receptorów przedstawia Tabela 1.

Funkcjonalnie chemokiny dzieli się na homeostatyczne i prozapalne.

Chemokiny homeostatyczne: SDF-1 (CXCL12, stromal derived factor), BCA-1 (CXCL13, B cell attracting chemokine-1), MIP-3 β (CCL19, macrophage inflammatory protein-3 β), MIP-3 α (CCL20), 6Ckine (CCL21, chemokine with 6 cysteines) są produkowane konstytutywnie w tkankach i narządach limfoidalnych oraz uczestniczą w zagnieżdżaniu komórek układu odporności w miejscach ich dojrzewania [43, 81] „pilotując” komórki podczas hematopoezy w szpiku kostnym i dojrzewaniu grasicy, indukcji odpowiedzi immunologicznej w śledzionie, węzłach chłonnych i kępkach Peyera, oraz podczas migracji do tkanek.

Chemokiny prozapalne: MCP-1, IL-8, eotaksyna (CCL11, eotaxin) są produkowane w większości tkanek w warunkach patologicznych, kontrolują przemieszczanie się efektorowych leukocytów w zakażeniach, zapaleniach, uszkodzeniach tkanek i nowotworach [69]. Uczestniczą w rozwoju odporności oraz reakcjach zapalnych po stymulacji między innymi przez cytokiny i toksyny bakteryjne indukując chemotaksję komórek do miejsc zakażenia [56, 82]. MCP-1, MIP-1 α (CCL3) i RANTES (CCL5, regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted) indukują ekspresję CD11b, CD11c i CD18 na monocytach. Modulacja ekspresji integryn przez chemokiny może ułatwiać migrację monocytów do ogniska zapalnego [83].

Wiele chemokin prozapalnych posiada szerokie spektrum działania i wywiera efekt na komórki układu odpornościowego. Niektóre chemokiny nie mogą być zaliczone do żadnej z tych dwóch grup, dlatego nazywa się je chemokinami dwufunkcyjnymi. Wiele dwufunkcyjnych chemokin jest wysoce selektywnych dla limfocytów i odgrywa rolę w dojrzewaniu limfocytów T w grasicy jak również w migracji limfocytów T do ognisk zapalnych [69]. Chemokiny regulują migrację komórek odpornościowych w stanach fizjologicznych i patologicznych, w tym do nowotworów.

1.3.2. Chemokiny oddziaływujące z monocytami.

MCP-1,-4 łączą się z CCR2 monocytów powodując ich migrację [84]. MCP-2, -4 są ligandami dla CCR3 i CCR1 [85], a MCP-2 także dla CCR5. MCP zalicza się do chemokin prozapalnych, których ekspresja jest indukowana przez np.: cytokiny, LPS lub PDGF [84].

Największą aktywność w stosunku do monocytów przejawia MCP-1 indukując ich migrację, wybuch tlenowy, wzrost ekspresji CD11b, CD11c i CD18 [83], sekrecję IL-1 i IL-6 [6]. MCP-2, -4 wywołują chemotaksję monocytów, przejściowy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i uwalnianie enzymów (przez MCP-2). MCP-1 jest głównym chemoatraktantem dla monocytów w procesach zapalnych. Ekspresję MCP-1 obserwuje się w wielu stanach chorobowych, podczas gdy produkcja MCP-2 wzrasta podczas sepsy, MCP-3 w astmie a MCP-4 w miażdżycy i astmie. W warunkach fizjologicznych poziom MCP-1-4 w surowicy jest nieoznaczalny [84].

MIP-1 α / β regulują migrację i aktywację komórek biorących udział w reakcjach zapalnych. MIP-1 α i MIP-1 β łączą się z CCR5 [86] i CCR9 [87], a MIP-1 α również z CCR1 [88] i CCR4 [89] natomiast MIP-1 β z CCR8 [90]. Obie formy MIP wywierają podobne efekty

biologiczne na monocyty [91]. MIP-1 α indukuje ich chemotaksję [92], transendotelialną migrację z krwioobiegu [93], zwiększa ekspresję CD11b/CD18 [83], cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych [91] i indukcję produkcji cytokin [94]. MIP-1 α i β wspólnie z RANTES hamują zakażenie monocytów makrofagotropowym szczepem HIV-1 [95].

RANTES powoduje chemotaksję monocytów poprzez oddziaływanie z receptorem CCR5 [96], ale jest także ligandem dla receptorów CCR1, CCR3 i receptora wirusa cytomegalii. W odpowiedzi na mediatory prozapalne RANTES jest uwalniany przez wiele typów komórek np. limfocyty T, fibroblasty, makrofagi [97, 98, 99] oraz konstytutywnie przez komórki czerniaka [100].

HCC-1 (CCL14, chemofiltrate CC chemokine-1) łączy się z CCR1 monocytów i powoduje ich migrację [88].

Leukotaktyna 1 (CCL15, HCC2, chemofiltrate CC chemokine-2) stanowi silny chemoatraktant dla monocytów i neutrofilii, indukuje przejściowe podniesienie poziomu wapnia w tych komórkach [101] i jest produkowana przez monocyty, limfocyty T i B, komórki NK i komórki dendrytyczne [102].

HCC-4 (CCL16, chemofiltrate CC chemokine-4) wykazuje właściwości chemotaktyczne w stosunku do monocytów, a jej produkcja przez te komórki jest stymulowana przez IL-10 [103].

MPIF-1 (CCL23, macrophage procoagulant inducing factor-1) alternatywna forma chemokiny CK β -1, łączy się z CCR1 i indukuje przejściowy wzrost stężenia wapnia w komórkach oraz migrację monocytów, neutrofilii i limfocytów [104].

MGSA/GRO α , β , γ (CXCL 1, 2, 3, melanoma growth stimulating activity/growth-regulated oncogene) – należy do chemokin typu ELR⁺ [105] i odgrywa znaczącą rolę w migracji i aktywacji monocytów [106]. Wszystkie 3 izoformy (α , β , γ) posiadają te same właściwości biologiczne [107].

SDF-1 (CXCL12) – występuje w dwóch izoformach α i β niewykazujących funkcjonalnych różnic [108] i jest jedynym ligandem dla CXCR4 [109]. SDF-1 jest produkowany przez wiele typów komórek szczególnie komórki podścieliska szpiku kostnego [108]. SDF-1 jest silnym chemoatraktantem dla monocytów [110].

Fraktalkina (CX3CL1) – jest jedyną zidentyfikowaną chemokina z grupy CX3C. Posiada 3 aminokwasy między dwoma pierwszymi resztami cystein i jest zakotwiczona w błonie komórkowej [111]. Opisano również rozpuszczalną formę fraktalkiny [112]. Fraktalkina oddziałuje selektywnie z CX3CR1 [113] i indukuje chemotaksję monocytów [111]. Fraktalkinę produkują makrofagi, komórki śródbłonna naczyń, komórki dendrytyczne, mikrogleju, NK, limfocyty T [112]. Migracja monocytów do ogniska zapalnego/nowotworowego jest odpowiedzią na szerokie spektrum chemokin wydzielanych w miejscach dojrzewania komórek, zakażeń i rozwoju nowotworów.

1.3.3. Chemokiny produkowane przez monocyty.

Monocyty produkują chemokiny klasy CC i CXC. Produkcja chemokin przez monocyty zachodzi po ich stymulacji, jak i w procesach fizjologicznych (MIG, IP-10, TARC (CCL17, thymus and activation-regulated chemokine)) [69]. Produkcja chemokin przez monocyty może być wywoływana przez cytokiny (IFN α , β , γ , IL-13, IL-15) [114, 115], składniki ściany komórkowej bakterii [116], wirusy (HIV) [117] i nowotwory [118, 119]. Chemokiny wydzielane przez TIM mogą stymulować wzrost nowotworów [120].

Do najważniejszych chemokin klasy CC produkowanych przez monocyty należą: MIP-1 α , RANTES oraz MCP-1,-3. Inne chemokiny CC produkowane przez monocyty to eotaksyna, HCC-2 (CCL-15), -4, LARC (CCL20, liver and activation-regulated chemokine), 6Ckine, i309 (CCL1) i TARC. Najistotniejsze chemokiny CXC produkowane przez monocyty to IL-8 (CXCL8), GRO α , β , γ (CXCL1,2,3) i IP-10. Inne chemokiny CXC produkowane przez monocyty to ENA78, MIG i NAP-2 [69]. Chemokiny produkowane przez monocyty posiadają zarówno właściwości angiostatyczne (IP-10, MIG) jak i proangiogenne (IL-8, ENA-78, GRO α , β , γ , NAP-2) [7], co decyduje w znaczący sposób o modulacji wzrostu nowotworu [7, 121].

1.4. Receptory dla chemokin.

1.4.1. Budowa receptorów chemokinowych i przenoszenie sygnału po połączeniu z ligandem

Receptory dla chemokin (por. Tabela 1.) zidentyfikowane w ostatnich 10 latach, stanowią grupę małych białek (8-40kDa) przebijających 7-krotnie błonę cytoplazmatyczną, które po przyłączeniu ligandu wiążą się z białkami G [68]. Geny kodujące receptory

chemokinowe zajmują około 3-5% ludzkiego genomu [122]. Częsteczki te wykazują następujące strukturalne podobieństwa:

- składający się z 30-40 aminokwasów koniec N na zewnątrz komórki ze znaczną liczbą kwaśnych miejsc,
- konserwatywne miejsca w domenach transbłonowych. W szczególności w domenie 2 (TM2) i w domenie 7 (TM7),
- wysoce konserwatywną sekwencję w drugiej pętli wewnątrzkomórkowej, która jest zaangażowana w przyłączanie białek G,
- cztery cysteiny, każda w innej domenie zewnątrzkomórkowej tworzące dwa zewnątrzkomórkowe wiązania siarczkowe krytyczne dla konformacji całego białka receptora. [123].

Nomenklatura receptorów jest określona poprzez klasę chemokin, które przyłączają oraz końcową literę R i liczbę, która mówi o kolejności odkrycia danego receptora w stosunku do innych receptorów. Bazując na rodzaju chemokin, które przyłączają, receptory chemokinowe dzielą się na 4 grupy: XCR (przyłącza chemokiny C), CX3CR (łączy się z chemokina CX3C), CXCR (przyłącza chemokiny CXC) oraz CCR (przyłącza chemokiny CC) [75]. Pomimo, że większość receptorów chemokinowych wiąże więcej niż jedną chemokinę, receptory CCR wiążą tylko chemokiny typu CC, a CXCR odpowiednio chemokiny typu CXC.

Niektóre receptory chemokinowe występują głównie w jednym typie komórek, np. CXCR1 na neutrofilach, podczas gdy inne występują na wielu typach komórek, np. CCR2 na monocytach, limfocytach T, komórkach NK, komórkach dendrytycznych i bazofilach [69]. Do chwili obecnej nie znaleziono chemokiny działającej wybiórczo tylko na jeden rodzaj leukocytów [124].

Ekspresja poszczególnych receptorów chemokinowych może być konstytutywna bądź indukowalna w zależności od typu, stanu aktywacji lub stopnia zróżnicowania komórki. Pary receptor-ligand produkowane konstytutywnie zwykle odgrywają rolę w migracji i rozwoju limfocytów. Może być to spowodowane niskim poziomem ich produkcji w tkankach. Ekspresja CCR1 i CCR2 na monocytach jest konstytutywna, podczas gdy na limfocytach CCR2 pojawia się po stymulacji IL-2 [76].

Przyłączenie ligandu indukuje zmiany w konformacji receptora, co powoduje odsłonięcie i ekspozycję miejsc odpowiedzialnych za jego dimeryzację [125]. Podczas aktywacji receptora chemokinowego jego dimeryzacja lub oligomeryzacja jest krytycznym krokiem koniecznym do aktywacji receptorowej kinazy tyrozynowej i dalszego przenoszenia

sygnału. Oligomeryzacja receptora (-ów) zwiększa złożoność sygnałowania i ilość zaangażowanych kaskad sygnałowych [126]. Przy niskim stężeniu chemokin heterodimeryzacja receptorów jest preferowana, co daje większą możliwość adhezji do śródbłonna naczyń i sprzyja przechodzeniu krążących komórek do tkanek, gdzie istnieje przewaga jednego rodzaju chemokin, co z kolei powoduje powstawanie homodimerów [125]. Dimery receptorów chemokinowych aktywują preferencyjnie adhezję komórek do śródbłonna naczyń w przeciwieństwie do migracji komórek wywoływanej przez homodimery. Kompleks heterodimerów nie jest internalizowany po przyłączeniu chemokin i nie traci aktywności po powtórnej stymulacji [127, 128]. Homodimeryzacja jest mechanizmem wspólnym dla receptorów chemokinowych (zarówno dla grupy CCR jak i grupy CXCR) podczas aktywacji przez ich ligandy [129]. Dimeryzację zaobserwowano w przypadku receptorów CCR2b [130], CCR5 [131] i CXCR4 [132]. Obserwowano także tworzenie heterodimerów CCR2 i CCR5. Heterodimeryzacja CCR2b i CCR5 powoduje wzrost ich czułości na ligand oraz indukuje przejściowy wzrost stężenia jonów wapnia w komórce, odmienne od klasycznych sygnałowanie i przyłączenie białek G, co zwiększa właściwości adhezyjne komórek a obniża ich właściwości migracyjne [127, 128]. Sugeruje to aktywację dróg biochemicznych innych niż wywołane przez homodimery receptorów [125].

Podczas aktywacji receptora chemokina łączy się N-końcem z jego zewnątrzkomórkową częścią. Aktywacja receptorów chemokinowych indukuje ich internalizację, częściową w przypadku CCR3 [133] bądź pełną w przypadku CCR5 [134] recykulację poprzez endosomy lub degradację w lizosomach. Aktywacja białek G po przyłączeniu ligandu do receptora chemokinowego prowadzi również do dalszego przekazywania sygnału poprzez aktywację niektórych kinaz sygnałowych [135] a także angażuje wiele wtórnych przekaźników takich jak wapń, cykliczny AMP (cAMP, cyclic AMP) i sfingolipidów [136]. Sygnałownie wywołane przyłączeniem się chemokiny do receptora może zostać zahamowane przez toksynę krztuśca, co sugeruje, że receptory chemokinowe są związane z białkami klasy Gi [76, 137]. Fosforylacja receptora chemokinowego zachodzi w wielu miejscach na cytoplazmatycznym końcu COOH [138, 139] i może angażować więcej niż jedną kinazę. Przyłączenie ligandu do receptora przesuwają konformację receptora na stan aktywny z równoczesną wymianą GDP na GTP w białkach G przyłączonych do receptora. Po przyłączeniu GTP podjednostki $G\alpha$ i $G\beta\gamma$ dysocjują i inicjują kaskadę sygnałową. Podjednostka $G\alpha$ przyłącza się i aktywuje kinazy Src oraz Lck i Kyn. Jest to prawdopodobny mechanizm prowadzący do aktywacji kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK,

mitogen activated protein kinases) poprzez białka Ras-Raf zależne od podjednostek $G\beta\gamma$ wywierających swoje działanie poprzez fosfolipazę $C\beta$ ($PLC\beta$, phospholipase $C\beta$) i kinazę białkową C (PKC, protein kinase C). MAP stanowią rodzinę serynowo-treoninowych kinaz aktywowanych w odpowiedzi na czynniki wzrostu, cytokiny i stres komórkowy [140]. Wszystkie trzy kinazy MAPK (Erk1/2, JNK i p38) biorą udział w przenoszeniu sygnału z receptorów chemokinowych [135]. $PLC\beta_2$ i $PLC\beta_3$ są aktywowane przez bezpośredni kontakt z podjednostkami $\beta\gamma$ uwolnionymi z kompleksu $G\alpha\beta\gamma$ [141, 142]. Po dysocjacji podjednostka $G\beta\gamma$ aktywuje izoenzymy $PLC\beta_2$ i $PLC\beta_3$, co prowadzi do powstania inozytolo-1,4,5-trójfosforanu ($InsP_3$, inosytolo-1,4,5-triphosphorane) i przejściowego wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia [138]. Aktywacja $PLC\beta$ prowadzi również do produkcji diacylglicerolu (DAG, diacylglycerol) i aktywacji PKC. Aktywacja PKC jest niezbędna do wybuchu tlenowego i migracji komórek indukowanej przez chemokiny.

Inną cząsteczką efektorową działania podjednostki $G\beta\gamma$ jest typ I_b fosfatydyloinozytolo 3 kinazy γ ($PI3K\gamma$, type I_b phosphatidyloinosytolo 3 kinase γ), poprzez którą chemokiny stymulują powstawanie fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trójfosforanu ($PtdIns(3,4,5)P_3$, phosphatidyloinosytolo-3,4,5-triphosphorane) [138, 143] defosforylowanego następnie do fosfatydyloinozytolo-3,4-dwufosforanu ($PtdIns(3,4)P_2$, phosphatidyloinosytolo-3,4-diphosphorane). $PI3K\gamma$ stymuluje również kinazy podobne do Src inicjując kaskadę przenoszenia sygnału klasycznego czynnika wzrostu, w której uczestniczą Shc, Grb2, SOS, Ras i Raf [144]. $PI3K$ uczestniczy w procesie przekazywania sygnału podczas chemotaksji i polaryzacji komórki poprzez aktywację GTP-az Rho i Rac [145, 146] które koordynują dynamiczną organizację cytoszkieletu aktynowego i struktur związanych z cytoszkieletem integryn.

Proteiny Rho są zaangażowane w przemieszczanie komórek poprzez regulację procesów zależnych od aktyny takich jak układ błony komórkowej, formowanie pseudopodiów oraz kompleksów adhezji ogniskowej [147, 148]. Prowadzi to do wniosku, że wywołana chemokinami polaryzacja komórek może być regulowana przez $PI3K$ i jej cząsteczki efektorowe. Fosforylacja powoduje przyłączenie arestyny do receptora. Prowadzi to do areaktywności receptora, ponieważ przyłączenie arestyny blokuje aktywację podjednostki $G\alpha$, która powraca do stanu związanego a podjednostkami $G\beta\gamma$. Połączenie receptora z arestyną powoduje aktywację kinaz MAPK [149] i regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym kinaz białkowych (ERK, extracellular signal-regulated protein kinases) [150] oraz połączenie się receptora z kinazą Src [138]. Podjednostka $G\alpha$ jest również

celem dla białek regulujących sygnałowanie białek G (RGS, regulators of G protein signaling), których działanie polega na aktywowaniu GTP-azy dla podjednostki $G\alpha$, która następnie powraca do konformacji białka związanego z GDP z wysokim powinowactwem do podjednostek $G\beta\gamma$, które następnie rozdziela kończąc przekazywanie sygnału.

Indukowana ligandami aktywacja receptora chemokinowego powoduje również sygnałowanie poprzez kinazy Janus - przenośniki sygnału i aktywatory transkrypcji (JAK-STAT, Janus kinases - signal transducers and activators of transcription) prawdopodobnie przez mechanizm wymagający homo- lub heterodimeryzacji receptora [125, 127]. Różne pary chemokin z receptorami aktywują różne białka JAK-STAT: CXCL12 i CXCR4 aktywują JAK1 i 2 oraz STAT2, 3 i 5 [132]. CCL2 i CCR2 wywierają ten sam efekt na JAK2 i STAT2 [127]. Agregacja receptora wywołana chemokiną (-ami), prowadzi do katalitycznej aktywacji cytoplazmatycznych białkowych kinaz tyrozynowych (JAK/STAT) a następnie fosforylacji i aktywacji białek JAK/STAT. Związane z receptorem i ufosforylowane STAT dimeryzują i przedostają się do jądra komórkowego gdzie przyłączają specyficzne sekwencje promotorowe i regulują ekspresję genów [151]. Chociaż przenoszenie sygnału nie jest tu do końca wyjaśnione, wiadomo, że kaskada JAK/STAT jest równorzędna i niezależna od białek G [135]. Można więc stwierdzić, że receptory chemokinowe wykorzystują wiele różnych wewnątrzkomórkowych dróg przekazywania sygnału w większości angażujących białka G.

1.4.2. Receptory chemokinowe monocytów.

Monocyty i makrofagi wykazują ekspresję szerokiego spektrum receptorów chemokinowych, z których do najważniejszych należą: CCR1, 2, 5, CXCR1, 2, 4 i CX3CR1.

CCR1 oddziałuje z licznymi ligandami: CCL3, 5, 7, 8, 14, 15 i 23 [152], które wykazują wysokie powinowactwo zarówno do CCR1 jak też do innych receptorów chemokinowych (CCR3 i CCR5) co utrudnia określenie biologicznej aktywności oraz roli patofizjologicznej CCR1. Ekspresję CCR1 wykazano na monocytach i limfocytach $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$ [153]. Aktywacja receptorów toll podobnych (TLR, toll-like receptors) monocytów: TLR2 przez Pam3CysSerLys4 lub TLR4 przez oczyszczony LPS na monocytach powoduje obniżenie ekspresji CCR1 i CCR2 oraz zwiększoną produkcję MIP-1 α , co może prowadzić do obniżenia ekspresji CCR1 na drodze autokrynej [154]. Poziom ekspresji CCR1 w procesie dojrzewania monocytów do makrofagów nie został jednoznacznie ustalony. Wydaje się, że iż pozostaje ona na niezmiennym poziomie [155] albo wzrasta [156].

Obserwowane różnice w ekspresji genów kodujących receptor mogą być spowodowane warunkami hodowli *in vitro* lub metodami ich izolacji [124].

CCR2 występuje na monocytach, makrofagach a także limfocytach T i B, komórkach dendrytycznych, NK oraz nielimfoidalnych i jest zaangażowany w adhezję leukocytów do śródbłonna naczyniowego oraz migrację monocytów z naczyń krwionośnych do tkanek [157]. CCR2 występuje w dwóch formach CCR2a i CCR2b, które są efektem alternatywnego splicingu pojedynczego genu. CCR2b wykazuje silną a CCR2a słabą ekspresję na powierzchni komórek. Obie formy receptora po przyłączeniu ligandu używają tych samych dróg przenoszenia sygnału. Konstytutywna ekspresja CCR2 na monocytach i makrofagach zmienia się w procesie zróżnicowania komórek [158] - obserwowano zarówno jej zwiększenie [124] jak i spadek [159]. IL-2 powoduje zwiększenie ekspresji CCR2 na monocytach [160] natomiast stymulacja TLR2 i 4 przez LPS prowadzi do internalizacji i degradacji CCR2 [161]. $\text{TNF}\alpha$ i $\text{IFN}\gamma$ obniżają ekspresję CCR2 poprzez zmniejszenie stabilności mRNA [159].

CCR5 jest receptorem dla $\text{MIP-1}\alpha$ i β , RANTES, MCP-2 [162], wykazuje dużą (około 70%) homologię z CCR2. Może to wyjaśniać powstawanie heterodimerów CCR2-CCR5. Ekspresję CCR5 wykazują makrofagi, limfocyty T pamięci, komórki mikrogleju, dendrytyczne i śródbłonna [162]. CCR5 jest kofaktorem w procesie fuzji makrofagotropowych szczepów HIV-1 z monocytami [163]. Mutacja w CCR5 [CCR5 Δ 32] prowadzi do braku trzech transbłonowych segmentów w białku receptora, co powoduje, że receptor nie wbudowuje się do błony cytoplazmatycznej. Stąd osobnicy homozygotyczni w zakresie mutacji CCR5 Δ 32 są oporni na zakażenie HIV-1 [164]. $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-12 i $\text{IFN}\gamma$ powodują wzrost ekspresji CCR5 na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u ludzi [165], natomiast M-CSF i GM-CSF powodują wzrost ekspresji CCR5 na makrofagach [166, 167]. Ekspresja CCR5 wzrasta w trakcie dojrzewania monocytów do makrofagów [156].

CXCR1 i CXCR2 sklonowano jako pierwsze ze wszystkich receptorów chemokinowych. Ekspresja na powierzchni komórek jest regulowana endogennie poprzez internalizację receptorów. Wykazują silną homologię z receptorem dla C5a, przyłączając chemokiny grupy ELR. Występują m.in. na monocytach, neutrofilach, limfocytach CD8^+ i komórkach NK, wykazują aktywność proangiogenną [168, 169].

CXCR4 stanowi selektywny receptor dla tylko jednego ligandu – SDF; ulega szybkiej internalizacji po przyłączeniu ligandu lub aktywacji. Ekspresję CXCR4 wykazują wszystkie typy leukocytów, w tym monocyty [170]. CXCR4 występuje na powierzchni około 75% monocytów krwi obwodowej [171]. 24 godzinna hodowla *in vitro* prowadzi do zaniku ekspresji CXCR4 na powierzchni monocytów a następnie dochodzi do wzrostu w trakcie dojrzewania do makrofagów [172]. CXCR4 odgrywa zasadniczą rolę w mielo- i limfopoezie [170]. IL-4 i TGF α indukują a IFN γ hamuje ekspresję CXCR4 na monocytach [173]. CXCR4 jest także koreceptorem dla HIV-1 [174].

CX3CR1 jest wysoce specyficznym receptorem dla CX3CL1. Ekspresję mRNA i białka dla CX3CR1 wykazano w monocytach, komórkach NK, limfocytach CD8⁺ i CD4⁺ [113]. Wbudowany w błonę komórkową ligand dla CX3CR1 indukuje szybką, silną i niezależną od integryn adhezję leukocytów do śródbłonka naczyń [113, 175] i aktywacji białek G [176].

1.5. Chemokiny i receptory chemokinowe w chorobie nowotworowej.

Wobec ekspresji szerokiego spektrum receptorów chemokinowych monocyty posiadają możliwość odpowiedzi na różne chemokiny wydzielane przez komórki nowotworowe oraz komórki obecne w ogniskach zapalnych i w guzach nowotworowych

1.5.1. Chemokiny w chorobie nowotworowej.

W mikrośrodowisku guza nowotworowego makrofagi i limfocyty T przyciągnięte poprzez chemokiny wydzielane przez komórki nowotworowe, a także TIM, stanowią główne składniki nacieków komórek jednojądrzastych [78]. Chemokiny typu CC są głównymi czynnikami warunkującymi migrację limfocytów i makrofagów w czerniaku i rakach jajników, piersi, szyjki macicy, oraz w mięśniakach i glejakach [2, 177].

Chemokiny odgrywają również rolę autokrynną, parakrynną i hormonalną w regulacji procesu nowotworowego, rozroście, względnie hamowaniu wzrostu nowotworu oraz jego przerzutowaniu [178]. W nowotworach doświadczalnych wykazano, że wydzielanie chemokin przez komórki nowotworowe może wpływać na angiogenezę a tym samym sprzyjać wzrostowi nowotworu [179] np. w niedrobnokomórkowym raku płuc [180].

Do najważniejszych chemokin wydzielanych przez komórki nowotworowe należą:

SDF-1 produkowany konstytutywnie przez niektóre komórki nowotworowe jest autokrynnym czynnikiem wzrostu w czerniaku, glejaku, raku trzustki, okrężnicy, jajnika, neuroblastoma i międzybłoniaku złośliwym [181, 182]. Aktywowane makrofagi i limfocyty T wydzielają *in situ* SDF-1, który może przyczyniać się do progresji nowotworu przez interakcję z CXCR4 obecnym na komórkach nowotworowych [183]. U chorych z rakiem jajnika i trzustki wysokie stężenie SDF-1 wykazano w wysięku otrzewnowym [184].

IL-8 działa proangiogenicznie, stymuluje wzrost komórek nowotworowych [185], indukuje migrację komórek czerniaka, raka piersi i jajnika [186, 187, 188]. W komórkach raka żołądka poziom IL-8-mRNA koreluje ze stopniem unaczynienia nowotworu [189]. Ekspresja IL-8-mRNA jest podwyższona w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc i koreluje ze stadium choroby tego nowotworu [190]. Podwyższona ekspresja IL-8 została wykazana również w raku płaskokomórkowym głowy i szyi [191], jelita grubego [192], glejaku [193] i czerniaku [194]. IL-8 produkowana przez komórki raka trzustki [195] jest związana z podwyższoną zdolnością do przerzutowania [78].

MGSA/GRO α , β , γ - stanowią czynniki wzrostu dla komórek nowotworowych czerniaka i raka trzustki [196, 197]. Podwyższoną ekspresję GRO α , β i γ opisano w czerniaku [198]. Ciągła produkcja GRO α , β , γ przez melanocyty autokrynnie stymuluje ich proliferację i neoangiogenezę [199].

RANTES - wydzielany wraz z MCP-1 przez komórki raka piersi może przyczyniać się do progresji nowotworu poprzez indukcję chemotaksji monocytów do guza [200], które wpływają stymulująco na wzrost nowotworu, poprzez wydzielane do środowiska IL-1, -6 i TNF α [201, 202].

MCP-1 - jest głównym czynnikiem regulującym poziom TIM w różnych typach nowotworów [118]. Wysoki poziom MCP-1-mRNA wykazano w komórkach raka nerki [203], a obecność MCP-1 wykazano zarówno w TIM jak i w komórkach raka piersi [20].

Zatem chemokiny odgrywają istotną rolę w regulacji chemotaksji i proliferacji komórek nowotworu a także poziomu TIM w guzach nowotworowych.

1.5.2 Receptory chemokinowe komórek nowotworowych.

Ukierunkowana migracja komórek nowotworowych jest zdeterminowana przez obecne na ich powierzchni receptory chemokinowe i chemokiny produkowane w danym narządzie lub tkance [75]. Ekspresję receptorów dla chemokin wykazują zarówno komórki nowotworowe jak też i TIM. Transformacja nowotworowa może przywracać ekspresję receptorów, które występowały na komórkach podczas organogenezy. Krążące komórki nowotworowe prowadzące do powstawania mikroprzerzutów migrują do narządów wydzielających odpowiednie chemokiny [179]. Ekspresja CXCR4 na komórkach raka jajnika może umożliwiać ich migrację do otrzewnej – głównego miejsca przerzutowania tego nowotworu [204].

Komórki nowotworowe mogą wykazywać ekspresję kilku receptorów chemokinowych zarówno z grupy CC jak i CXC, np. komórki raka piersi zarówno w guzie pierwotnym jak i w przerzutach wykazują ekspresję CCR5 i 7, CXCR1, 2 i 4 [205, 206, 200]. Czerniak złośliwy przerzutujący podobnie jak rak piersi i ale także do skóry wykazuje obecność CCR7 i 10 oraz CXCR1, 2 i 4 [206, 207]. Istnieje związek między ekspresją receptorów chemokinowych na komórkach czerniaka złośliwego i ich zdolnością do przerzutowania do skóry i węzłów chłonnych [206, 208]. Podobne obserwacje dotyczą przerzutowania nerwiaka zarodkowego [209], raka prostaty [210] i rhabdomyosarcoma [211] w których przerzuty do szpiku kostnego są częściowo zależne od CXCR4. Ekspresja CCR7, CXCR1 i 2 na komórkach raka żołądka również jest związana z przerzutami do węzłów chłonnych [212]. Komórki nowotworowe wykazują ekspresję receptorów chemokinowych i wydzielają chemokiny, co prowadzi do autokrynnej stymulacji ich rozrostu. IL-8, dla której receptory posiadają komórki czerniaka może stymulować ich migrację i proliferację [199]. Glejak wielopostaciowy wykazuje ekspresję SDF-1 i jednocześnie CXCR4, co indukuje proliferację komórek tego nowotworu [193]. Ekspresja CXCR4 i wydzielanie SDF-1 wzrasta wraz ze stadium zaawansowania nowotworu i jest związana z nekrozą i angiogenezą [213].

Ekspresja CXCR4 została opisana na komórkach raka nerki [214], prostaty [210], i trzustki, który również wykazuje obecność CCL3 i CCR6 [215]. Ekspresja CXCR4 jest indukowana przez stan hipoksji w guzie [216], co wzmacnia migrację komórek nowotworowych z obszaru o niskim stężeniu tlenu [217].

Ekspresja receptorów chemokinowych na TIM jest silnie zahamowana, co może wynikać z:

- działania pro- i przeciwzapalnych sygnałów regulujących ich ekspresję [218],

- ekspozycji na cytokiny prozapalne obecne w mikrośrodowisku nowotworu [219],
- produkcji chemokin,
- złuszczenia elementów błony komórkowej (na przykład gangliozydów) przez komórki nowotworowe,

co prowadzi do spadku ekspresji receptorów chemokinowych na monocytach (por. 2. Cele i założenia. pracy).

1.6. Modulacja reaktywności immunologicznej przez gangliozydy komórek nowotworowych.

1.6.1 Budowa i funkcje biologiczne gangliozydów.

Gangliozydy są glikosfingolipidami, których charakterystyczną cechą jest obecność kwasu sjałowego, zlokalizowanego na zewnętrznej stronie błony komórkowej [220, 221]. Struktura przestrzenna gangliozydów ułatwia tworzenie kompleksów z nich złożonych, a także kompleksów z białkami. Gangliozydy należą do lipidów występujących powszechnie w tkankach i płynach ustrojowych [222].

Gangliozydy są zaangażowane regulację cyklu komórkowego [223], różnicowanie komórek [224], transformację nowotworową [225], proces adhezji oraz transdukcji sygnału poprzez kinazy tyrozynowe [226], wzajemne rozpoznawanie komórek między sobą i apoptozę [227] oraz wykazują strukturę specyficzną dla typu i cyklu podziałów komórkowych [228]. Zatem gangliozydy uczestniczą zarówno w procesach fizjologicznych jak i patologicznych.

1.6.2. Gangliozydy komórek nowotworowych w hamowaniu reaktywności przeciwnowotworowej.

Różne typy nowotworów, zwłaszcza neuroektodermalnego pochodzenia jak neuroblastoma [229], a także czerniaki [230], glejaki siatkówki, raki wątroby, chłoniaki [231] wykazują podwyższoną ekspresję i wydzielają do krwioobiegu oraz do mikrośrodowiska nowotworu gangliozydy poprzez złuszczenie ich z fragmentami błony komórkowej [132], które może zachodzić w szybkim tempie, około 0,5% błonowej zawartości gangliozydów na godzinę [133].

Wzrost poziomu gangliozydów GM3 i GD2 stwierdzono w surowicy pacjentów z retinoblastoma i hepatoma [234, 235], GM3 i GD3 u pacjentów z rakiem głowy i szyi [236]. Złośliwe czerniaki i neuroblastoma wykazują zwiększoną ekspresję GM2, GM3, GD2 i GD3,

[235, 237] a komórki raka nerki GM1, GM2 i GD1a [238]. Do głównych gangliozydów złuszcanych przez medulloblastoma należą: GM2, GM3 i GD1a, z których każdy jest złuszczany w postaci gangliozydu z krótkim łańcuchem acylowanego kwasu tłuszczowego [239]. Gangliozydy z krótkimi łańcuchami acylowanych kwasów tłuszczowych są selektywnie złuszcane również przez komórki neuroblastoma [233], białaczek i chłoniaków [240], czerniaka [232] i mięsaka [241]. Gangliozydy zawierające krótsze łańcuchy kwasów tłuszczowych wykazują wyższą aktywność immunosupresyjną [242] i silniej hamują odpowiedź limfoproliferacyjną *in vitro* na rozpuszczalne antygeny niż gangliozydy zawierające długie łańcuchy acylowanych kwasów tłuszczowych obecne w zdrowych tkankach [233, 236].

Mikrośrodowisko nowotworu może zawierać wysokie stężenia aktywnych gangliozydów, które łączą się bezpośrednio z komórkami docelowymi [243] i wbudowują się w błonę komórkową, co prowadzi do hamowania przeciwnowotworowej reaktywności immunologicznej [243] między innymi poprzez zahamowanie prezentacji antygeny przez TIM [244]. Gangliozydy hamują limfoproliferacyjną odpowiedź *in vitro* na mitogeny [231, 245], proliferację limfocytów Th [246] oraz cytotoksyczność komórek NK [247] i wzmagają apoptozę tymocytów [248].

Gangliozydy powodują obniżenie konstytutywnej i indukowalnej przez IFN γ ekspresji MHC klasy I i II na astrocytach [249]. W ludzkich monocytach stymulowanych przez LPS gangliozydy hamują produkcję TNF α [250] oraz IL-12 [251] i blokują interakcję IL-2 z jej receptorem, co prowadzi do zahamowania aktywacji limfocytów T [230].

Ekspresja gangliozydów na powierzchni komórek nowotworowych może prowadzić do ich wzmożonej migracji i adhezji do tkanek, co ułatwia proces przerzutowania [252, 253]. Gangliozydy pochodzenia nowotworowego posiadają również właściwości proangiogenne [226], odgrywają istotną rolę w rozwoju nowotworu oraz w hamowaniu reaktywności immunologicznej gospodarza na rozwijający się nowotwór [226, 254]. Rola gangliozydów w modulacji transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego i aktywacji niektórych kinaz tyrozynowych powiązanych z receptorami czynników wzrostowych może wskazywać pośrednio na ich potencjalną rolę w regulacji ekspresji niektórych receptorów chemokinowych [226, 255] (por. 2. Cele i założenia. pracy).

2. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY.

Niniejsza praca była oparta na założeniu, że w wyniku interakcji monocytów z komórkami nowotworowymi dochodzi do:

- zmian w ekspresji receptorów chemokinowych na powierzchni monocytów,
- uwalniania chemokin przez monocyty.

Przyjęto także, iż gangliozydy produkowane i uwalniane przez komórki nowotworowe a także chemokiny produkowane przez komórki nowotworowe lub/i monocyty reagujące z nimi:

- mogą być odpowiedzialne za modyfikację powierzchniowej ekspresji receptorów chemokinowych na monocytach, co w konsekwencji prowadzi do upośledzenia ich migracji,
- interferują ze szlakami wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału po przyłączeniu odpowiedniego ligandu do receptora chemokinowego, co może modulować ekspresję receptorów chemokinowych na poziomie mRNA, a także poziom wewnątrzkomórkowego białka receptorowego i jego transport na powierzchnię komórki.

2.1. Cel pracy.

Określenie zmian w ekspresji receptorów dla chemokin i/lub w produkcji cytokin oraz chemokin zachodzących w trakcie wzajemnych interakcji *in vitro* monocytów i komórek nowotworowych, oraz ustalenie roli gangliozydów uwalnianych przez komórki nowotworowe w modulacji tych oddziaływań i mechanizmów molekularnych zaobserwowanych zmian.

2.2. Cele szczegółowe.

Określenie:

- ekspresji receptorów chemokinowych (na poziomie mRNA, białek cytoplazmatycznych i/lub powierzchniowych) w/na monocytach izolowanych z kohodowli z komórkami nowotworowymi,
- roli gangliozydów lub/i chemokin w modyfikacji ekspresji receptorów chemokinowych monocytów,
- jak komórki nowotworowe lub ich produkty (gangliozydy) zmieniają zdolność monocytów do migracji w gradiencie chemokin,

- jak gangliozydy wpływają na produkcję mediatorów cytotoksycznych (TNF, ROI) przez monocyty po kontakcie z komórkami nowotworowymi,
- rodzaju i ilości chemokin produkowanych przez monocyty po kontakcie z komórkami nowotworowymi i wpływu gangliozydów na te procesy.

3. MATERIAŁY I METODY.

3.1. Izolacja monocytów.

Monocyty uzyskiwano z jednojądrzastych komórki krwi obwodowej (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) izolowanych z krwi zdrowych dawców w nieciągłym gradiencie gęstości z użyciem roztworów Ficoll/Isopaque (Pharmacia, Uppsala, Szwecja). Krew pobierano do 10% roztworu EDTA (etylenodiamotetraacetic acid), 0,2ml/10ml krwi. Monocyty izolowano z PBMC metodą elutracji przy użyciu systemu elutriacyjnego JE-5.0 z wykorzystaniem 5ml komory Sandersona (BeckmanCoulter, CA). Elutrację przeprowadzano w temperaturze 10⁰C przy stałych obrotach rotora 3400 obr./min. PBMC (100-200ml, 2x10⁶/ml) były podawane do komory elutriacyjnej przy przepływie 18,5ml/min., a następnie elutriowane przez stopniowe zwiększanie przepływu do 25ml/min. Zbierano 10 frakcji komórkowych po 50ml każda, z czego ostatnia była najbogatsza w monocyty (>95%) Czystość monocytów oceniano metodą cytometrii przepływowej w aparacie FACScan V (Becton Dickinson, BD, NJ), po barwieniu znakowanym fikoerytryną (PE) przeciwciałem monoklonalnym anti-CD14 (klon LEU-M3, BD). Monocyty były następnie zawieszane w stężeniu 1x10⁶ w podłożu RPMI 1640 (Sigma, MO) zawierającym 100µg/ml streptomycyny, 100U/ml penicyliny, 25µg/ml gentamycyny, glutaminę (2mM), (Invitrogen-Gibco, CA) i 0,5% dodatek ludzkiej albuminy (HSA, human serum albumin, Biomed, Warszawa) w celu wyeliminowania wpływu gangliozydów i chemokin obecnych w płodowej surowicy cielęcej (FCS, fetal calf serum, Biochrom, RFN) [250] i używane do dalszych eksperymentów.

3.2. Linie komórkowe.

Do eksperymentów użyto następujących ludzkich linii komórek nowotworowych: raka trzustki (HPC-4, human pancreatic cancer) uzyskaną w tutejszym laboratorium [256], nerwiaka współczulnego zarodkowego (CHP-100, neuroblastoma) [257] i prawidłowe komórki nabłonkowe ludzkich dróg oddechowych (HAE, human airway epithelium). Komórki hodowano w podłożu RPMI 1640 z dodatkiem 5% FCS, antybiotykami i glutaminą, w temp. 37⁰C, atmosferze 5% CO₂ i pasażowano dwa razy w tygodniu. Celem uzyskania komórek do badań hodowle trypsynowano (0,25% roztwór trypsyny z dodatkiem 0,02% EDTA) (Invitrogen-Gibco) przez 1-3 minut, w temp. 37⁰C i trzykrotnym płukaniu sporządzano zawiesiny o żądanym stężeniu komórek w podłożu RPMI z 0,5%

dotądkiem HSA. Komórki były testowane na obecność zakażenia *Mycoplasma sp.* przy użyciu metody Zieglera-Heitbrocka i Burgera [258].

W celu uzyskania komórek o zatrzymanej ekspresji gangliozydów, do hodowli komórek HPC-4 i CHP-100 dodawano inhibitora syntezy gangliozydów - PDMP (D,L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, Matreya, PA) w końcowym stężeniu 5µM/ml na 72h przez doświadczeniami [259, 233].

3.3. Hodowle monocytów z komórkami nowotworowymi.

Monocyty hodowano z komórkami nowotworowymi HPC-4, CHP-100 oraz HAE w podłożu RPMI-1640 z dodatkiem 0,5% HSA w proporcjach komórek 3:1 (monocyty:komórki nowotworowe) przez 4-48 godzin, w polipropylenowych probówkach okrągłodennych (BD Falcon, NJ), w temp. 37°C i atmosferze 5% CO₂.

3.4. Określenie ekspresji CXCR4 na monocytach po kontakcie z komórkami nowotworowymi.

Hodowle monocytów z komórkami nowotworowymi z zahamowaną bądź nie syntezą gangliozydów przeprowadzono jak w punkcie 3.2. Po odwirowaniu i płukaniu w PBS (zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna) z 0,1% dodatkiem FCS przeprowadzono podwójne znakowanie komórek mysimi przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD14-FITC (klon MY4, BeckmanCoulter) i anti-CXCR4-PE (klon 44717, R&D, MN) o końcowym stężeniu 10µg/ml. Kontrolę izotypową stanowiła mysia IgG2b-PE (klon 133303, R&D). Komórki inkubowano 40 minut w temp. 4°C, płukano trzykrotnie i zwieszano w PBS, po czym analizowano w cytometrze przepływowym FACSCalibur (BD). Oceniano odsetek komórek CD14⁺ wykazujących ekspresję CXCR4 oraz różnicę median intensywności fluorescencji pomiędzy kontrolą izotypową a przeciwciałem. Analiza obejmowała minimum 5000 komórek.

3.5. Ocena ekspresji CXCR4 na monocytach oddzielonych błoną mikroporową od komórek nowotworowych.

24 dołkową płytkę typu „low attachment” (Corning Costar Inc., MA) przygotowano 30 minut przed doświadczeniem, napełniając każdy dołek 0,4 ml podłoża RPMI-1640 z 0,5% dodatkiem HSA w celu aktywacji nisko adherentnego podłoża płytki. Monocyty (1x10⁶/ml) hodowano 6 godzin z komórkami CHP-100 (0,3x10⁶/ml) umieszczonymi we wkładkach

zamkniętych błoną mikroporową o średnicy porów 0,4µm [243]. Następnie monocyty zbierano, wirowano, płukano w PBS z 0,1% dodatkiem FCS i przeprowadzono znakowanie mysim przeciwciałem monoklonalnym anti-CXCR4-PE o końcowym stężeniu 10µg/ml. Kontrolę izotypową stanowiła mysia IgG2b-PE. Komórki inkubowano 40 minut w temp. 4°C, płukano trzykrotnie i zwieszano w PBS, a następnie analizowano w cytometrze przepływowym FACSCalibur.

3.6. Ocena ekspresji innych receptorów chemokinowych na monocytach.

3.6.1. Określenie efektu nadsączu z hodowli komórek nowotworowych.

Komórki CHP-100 hodowane na 24 dołkowej płytce hodowlanej (BD Falcon) doprowadzono do stanu konfluentności. Następnie 2 krotnie płukano podłożem RPMI 1640 i hodowano 24 godziny w RPMI 1640 z dodatkiem 0,5% dodatkiem HSA, po czym z hodowli zbierano nadsącz. Monocyty (1×10^6 /ml) hodowano 4 (dla określenia ekspresji CCR1 i CXCR4) lub 24 (dla oznaczenia ekspresji CCR5) godziny w medium hodowlanym z dodatkiem 0,5% dodatkiem HSA i 50% dodatkiem nadsączu z hodowli komórek CHP-100, w polipropylenowych probówkach okrągłodennych (BD Falcon), w temp. 37°C i atmosferze 5% CO₂. Następnie monocyty znakowano i analizowano jak w p.3.4. Użyto przeciwciał monoklonalnymi anti-CCR1 (klon 53504.111), CXCR4-PE (klon 44717) (R&D) i CCR5 (klon 2D7) (BD, PharMingen CA). Kontrolę izotypową stanowiły do CCR1 i CXCR4 - mysia IgG2b-PE; do CCR5 - mysia IgG2ak-PE (klon G155-178) (BD, PharMingen).

3.6.2. Określenie efektu gangliozydów.

Rozpuszczone wg instrukcji producenta: mieszanina gangliozydów zawierająca 18%GM₁, 55%GD_{1α}, 15%GD_{1b}, 10%GT_{1b}, 2% innych gangliozydów (Calbiochem, Nottingham, Wielka Brytania), pojedyncze gangliozydy: asialogangliosyd GD₂, monosialogangliosyd GM₂, asialogangliosyd GM₁ (Sigma), disialogangliosyd GD₃, trisialogangliosyd GT_{1b}, disialogangliosyd GD_{1α}, monosialogangliosyd GM₃, monosialogangliosyd GM₁, disialogangliosyd GD₂ (Calbiochem) lub gangliozydy GM₂ i GT_{1b} przygotowano do doświadczeń susząc 45 minut w wirówce próżniowej (Eppendorf Koncentrator, model 5501, Hamburg, RFN) w temp. pokojowej. Następnie gangliozydy zawieszano w RPMI 1640, poddawano działaniu ultradźwięków 2x20s [250] i używano bezpośrednio do hodowli.

Monocyty (1×10^6 /ml) hodowano z mieszaniną gangliozydów o końcowym stężeniu 10 i 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lub pojedynczymi gangliozydami o końcowym stężeniu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ w polipropylenowych probówkach okrągłodennych (BD Falcon), w temp. 37°C i atmosferze 5% CO_2 przez 4 (dla określenia ekspresji CCR1, CCR2 i CXCR4) lub 48 godzin (dla określenia ekspresji CCR5) po czym znakowano i analizowano jak w punkcie 3.5. Użyto przeciwciał monoklonalnych jak w punkcie 3.6.1. oraz przeciwciała monoklonalnego anty-CCR2 (klon 48607, R&D). Kontrolę izotypową do CCR2 stanowiła mysia IgG2b-PE.

3.7. Badanie ekspresji HLA klasy I i II na monocytach.

Monocyty (1×10^6 /ml) hodowano jak w punkcie 3.6.2. z mieszaniną gangliozydów o końcowym stężeniu 10 lub 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lub gangliozydami GT_{1b} i GM_2 o końcowym stężeniu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ przez 4 godziny po czym znakowano i analizowano jak w punkcie 3.5. Użyto przeciwciał monoklonalnych anty-HLA-DR-PE (klon G46-6, BD) i anty-HLA-kl.I-FITC (klon 64-2.6, BD) o końcowym stężeniu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kontrolę izotypową stanowiły: dla HLA-DR - IgG2ak (klon G155-178, BD); dla HLA-kl.I - IgG2-FITC (klon G3-245, BD).

3. 8. Chemotaksja monocytów.

Monocyty ($0,5 \times 10^6/100\mu\text{l}$) hodowano jak w punkcie 3.6.2. z mieszaniną gangliozydów o końcowym stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lub gangliozydami GT_{1b} i GM_2 o końcowym stężeniu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Po 4 godzinnej hodowli komórki (po 100 μl) nakładano na wkładki mikroporowe (Costar Corning Inc.) o szerokości porów 5 μm , i umieszczano w komorach chemotaktycznych na płytce hodowlanej zawierającej samo podłoże (kontrola) lub mieszaninę chemokin: SDF-1 (Upstate, NY) 200 ng/ml , MIP-1 α (izoforma 70aa, R&D) 100 ng/ml , MCP-2 (izoforma 76aa, R&D) 10 ng/ml (dla monocytów inkubowanych z mieszaniną gangliozydów), oraz podłoże lub pojedyncze chemokiny (dla monocytów inkubowanych z gangliozydami GT_{1b} i GM_2). Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temp. 37°C i atmosferze 5% CO_2 , po czym do hodowli dodawano EDTA w końcowym stężeniu 0,025M i inkubowano 10 minut w temp. 37°C i atmosferze 5% CO_2 . Następnie monocyty zbierano i analizowano w cytometrze przepływowym FACSCalibur oceniając ilość komórek migrujących do mieszaniny chemokin lub pojedynczych chemokin w porównaniu do podłoża (przyjmowano jako 100%) w ciągu 20s akwizycji.

3.9. Ekspresja mRNA receptorów chemokinowych w monocytach.

Monocyty (3×10^6 /ml) hodowano 4 godziny z gangliozydami GT_{1b} i GM_2 o końcowym stężeniu $10 \mu\text{g/ml}$ jak w punkcie 3.6.2. Całkowite mRNA izolowano monocytów modyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi [260] przy użyciu preparatu TRIZOL (Total RNA isolation reagent, Invitrogen-Gibco). Stężenie uzyskanego RNA określano poprzez spektrofotometryczny pomiar absorbancji przy długości fali 260nm (spektrofotometr CECIL 2020, Cecil instruments, Cambridge, Wielka Brytania). Czystość izolowanego RNA określano na podstawie ilorazu absorbancji w zakresie 260nm i 280nm . Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu aparatu MJ Research PTC 200 (Bio-Rad, MA). Używając odwrotnej transkryptazy M-MLV (moloney murine leukaemia virus, Sigma) i primera oligo dT (oligo(dT)₂₃ Primers, Sigma) zsyntezowano pierwszą nić cDNA. Próbki zawierające: oligo dT ($3,5 \mu\text{g}$), RNA ($2 \mu\text{g}$), H_2O o końcowej objętości $10 \mu\text{l}$ inkubowano przez 10 minut w temperaturze 70°C , a następnie szybko schładzano na lodzie. Do próbek dodawano mieszaninę: 5 x FSB (first strand bufor, $4 \mu\text{l}$), DTT (dithioiretinol, $2 \mu\text{l}$ o stężeniu $0,1\text{M}$), inhibitor rybonukleaz ($0,5 \mu\text{l}$ o stężeniu $40\text{U}/\mu\text{l}$), dNTP ($1 \mu\text{l}$ o stężeniu 10mM), M-MLV ($1 \mu\text{l}$ o stężeniu $200\text{U}/\mu\text{l}$). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w temperaturze 37°C przez 60 minut. Następnie próbki inkubowano przez 15 minut w temperaturze 95°C , a potem szybko schładzano do temperatury 4°C . Otrzymane cDNA użyto jako matryce do amplifikacji metodą Real Time PCR z wykorzystaniem zestawu DNA Master SYBR Green I i specyficznych primerów dla receptorów chemokinowych:

CCR1: 5'-GGA ACTAAGAAAGCCCTTAG

3'-TTTTTTTTTTGCTGACAAGT

CCR5: 5'-TCTCCCCGGGTGGAACA

3'-CGACAGCCAGGTACCTATCG

CXCR4: 5'-GGAGGGGATCAGTATATACAC

3'-CACTTGTGCACAGTGTTCTC

β -aktyna: 5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG

3'-CGT-GGT-GGT-ACA-TGG-GAC

Reakcję Real Time PCR przeprowadzono w kapilarach reakcyjnych zawierających: $0,6 \mu\text{l}$ każdego primera (stężenie wyjściowe $100 \mu\text{M}$), $12,6 \mu\text{l}$ H_2O , $1 \mu\text{l}$ cDNA, $3,2 \mu\text{l}$ MgCl_2 (stężenie wyjściowe 5mM Mg^{2+}), $2 \mu\text{l}$ SYBR Green I. Amplifikację cDNA metodą „Real Time PCR” przeprowadzono przy użyciu aparatu Light Cycler II (Roche, Mannheim, RFN) z komputerową obróbką wyników reakcji.

Cykle termiczne reakcji PCR były następujące:

CCR1: 1 cykl: 30s 95⁰C; 40 cykli: 0s 95⁰C, 8s 54⁰C, 16s 72⁰C; 1 cykl: 0s 95⁰C, 8s 61⁰C, 0s 95⁰C, następnie 30s 40⁰C.

CCR5: 1 cykl: 30s 95⁰C; 40 cykli: 0s 95⁰C, 8s 60⁰C, 17s 72⁰C; 1 cykl: 0s 95⁰C, 8s 67⁰C, 0s 95⁰C, następnie 30s 40⁰C.

CXCR4: 1 cykl: 30s 95⁰C; 40 cykli: 0s 95⁰C, 8s 60⁰C, 34s 72⁰C; 1 cykl: 0s 95⁰C, 8s 67⁰C, 0s 95⁰C, następnie 30s 40⁰C.

Analizę wyników przeprowadzono porównując numery cykli, w których następował wzrost fluorescencji produktu PCR.

3.10. Ekspresja cytoplazmatyczna CXCR4 w monocytach.

Monocyty (1x10⁶/ml) hodowano 4 godziny jak w punkcie 3.6.2. z gangliozydami GT_{1b} i GM₂ o końcowym stężeniu 10μg/ml w obecności/nieobecności brefeldyny o końcowym stężeniu (10μg/ml). Następnie komórki odwirowano, płukano w PBS z 0,1% FCS i utrwalano w preparacie Cytotfix/Cytoperm (200 μl/próbkę, BD) w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po odwirowaniu i dwukrotnym płukaniu w PBS z 0,1% FCS przeprowadzono permeabilizację zawieszając komórki w Perm/Wash (50μl/próbkę, BD) i znakowano równocześnie przeciwciałem monoklonalnym anti-CXCR4-PE o końcowej koncentracji 10μg/ml. Kontrolę izotypową stanowiła mysia IgG2b-PE. Komórki inkubowano 25 minut w temperaturze pokojowej, płukano i zwieszano w PBS, a następnie analizowano jak w punkcie 3.5.

3.11. Wydzielanie TNF α , IL-10 i IL-12p40 przez monocyty.

Monocyty hodowane w płaskodennych 96-dołkowych płytkach (Nunc, Roskilde, Dania), w ilości 1 x 10⁵/dołek w objętości 100μl podłoża hodowlanego prestymulowano 1 godzinę mieszaniną gangliozydów o końcowym stężeniu 10 lub 100μg/ml. Następnie do monocytów dodawano odpowiednio tylko podłoże lub komórki nowotworowe HPC-4, lub CHP-100 w stosunku 1:0,3 (końcowa objętość 200μl). Hodowle prowadzono 18 godzin w temp. 37⁰C, w atmosferze 5% CO₂. Nadsączy z hodowli zbierano, przechowywano w temperaturze -80⁰ i testowano na obecność TNF, IL-10 i IL-12p40 metodą ELISA. Użyto następujących przeciwciał: dla TNF klon Mab1(Capture) i Mab11 (Detection); dla IL-10 klon JES3-9D7 (Capture) i JES3-12G8 (Detection); dla IL-12p40 klon C8.3 (Capture) i C8.6 (Detection). Do każdego dołka płytki hodowlanej do ELISA (Nunc Maxisorb) dodawano po 50μl anti-cytokinowego przeciwciała wiążącego o stężeniu 2μg/ml w roztworze wiążącym (binding solution, BD). Po 18 godzinach inkubacji w temperaturze 4⁰C i

do dodaniu buforu blokującego (blocking buffer, BD) w ilości 200µl na dołek, płytki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie płukano 3-krotnie w PBS/Tween (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria). Po dodaniu badanych supernatantów oraz rekombinowanych TNF α , IL-10, IL-12p40 (BD) w stężeniach 0, 15, 50, 150, 500, 1500 pg/ml buforu blokującego, płytki inkubowano 12 godzin w temperaturze 4⁰C i płukano 4-krotnie w PBS/Tween. Następnie dodawano biotynylowanych anti-cytokinowych przeciwciał detekcyjnych o stężeniu 1µg/ml w ilości 100µl na dołek. Po 1 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej i 4-krotnym płukaniu w PBS/Tween, do każdego dołka dodawano po 100µl konjugatu peroksydazy chrzanowej ze streptawidyną (streptavidin-HRP, BD) w rozcieńczeniu 1:500 w buforze blokującym. Po 30-minutowej inkubacji i 5-krotnym płukaniu w PBS/Tween do każdego dołka dodawano po 100µl substratu o składzie: 5mg o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma), 10ml roztworu: 1tbl phosphate-citrate buffer with urea hydrogen peroxide (Sigma) w 10ml wody dejonizowanej. Po 5-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, do dołków dodawano po 100µl 1N roztworu H₂SO₄. Odczytu dokonywano na czytniku ELISA (Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, VT) przy długościach fali 492 vs 630 nm. Poziom detekcji wynosił: dla TNF i IL-12p40: 20 pg/ml, dla IL-10: 10 pg/ml.

3.12. Produkcja ROI przez monocyty.

Produkcję reaktywnych form tlenu oceniano metodą chemiluminescencji [25]. Monocyty (1 x 10⁵/dołek płytki 96 dołkowej) preinkubowano 1 godzinę bez lub z mieszaniną gangliozydów o końcowym stężeniu 100µg/ml w 96 dołkowych płytkach, po czym dodawano odpowiednio: podłoże, komórki HPC-4 lub CHP-100 (w stosunku 1:0,3 monocyty:komórki nowotworowe) oraz 300µl 2mM luminolu (Sigma) w buforze Krebsa-Ringera (z Mg²⁺ i Ca²⁺). Ciągły pomiar chemiluminescencji przeprowadzano w temperaturze 37⁰C, w czasie 300 minut z użyciem chemiluminometru Victor 1420 (Perkin Elmer Life Science, Wallac Oy, Finlandia). Wyniki wyrażono liczbą zliczeń (cc - cumulative counts).

Produkcję O₂⁻ przez monocyty oceniano przy pomocy wbudowywania hydroetydyny (HE, hydroethidine, Sigma) [261]. Monocyty (1x10⁶/ml) inkubowano z przeciwciałem anti- CD14-PE (klon MΦP9, BD) w końcowym stężeniu 10µg/ml przez 30 minut w temp. 4⁰C. Komórki płukano i inkubowano z mieszaniną gangliozydów o końcowym stężeniu 100µg/ml. przez 1 godzinę. Następnie dodawano HE (końcowe stężenie 10µM) i inkubowano 15 minut, a monocyty inkubowano przez 2 godziny w 37⁰C, w obecności komórek HCP-4 i CHP-100 Wyniki

przedstawiono jako procent komórek CD14⁺ wykazujących obecność HE w analizie cytometrycznej.

3.13. Wydzielanie chemokin przez monocyty

Monocyty kontrolne były hodowane w ilości 1×10^5 /dołek w końcowej objętości 100µl podłoża hodowlanego bez, lub w obecności komórek nowotworowych HPC-4, CHP-100 lub HAE w stosunku 1:0,3 w płaskodennych 96-dołkowych płytkach (Nunc). Hodowle prowadzono 18 godzin w temp. 37⁰C, w atmosferze 5% CO₂. Nadsączy z hodowli zbierano, przechowywano w temperaturze -80^o i testowano na obecność MCP-1 (CCL-2), MIP-1α (CCL-3), RANTES (CCL5) i GRO-α (CXCL1) metodą ELISA. Do każdego dołka płytki hodowlanej do ELISA, pokrytego przeciwciałem monoklonalnym dla badanej cytokiny (R&D) dodawano po 200µl odpowiedniego standardu/badanego nadsączy (GROα, MCP-1, MIP-1α), lub 100µl buforu RD1A i 100µl standardu/badanego nadsączy (RANTES). Płytki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie płukano 3-krotnie w buforze płuczającym. Do każdego dołka płytek dodano 200µl skoniugowanych z peroksydazą chrzanową przeciwciał poliklonalnych specyficznych dla każdej chemokiny. Płytki inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej (GROα w 4⁰C), po czym 3-krotnie płukano buforem płuczającym. Następnie do każdego dołka dodawano 200µl mieszaniny chromogenu (tetramethylbenzidine) z H₂O₂ (zmieszanych w stosunku 1:1 na 15 minut przez reakcją) i inkubowano 15-20 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Po inkubacji do każdego dołka dodawano po 50µl 2N roztworu H₂SO₄. Odczytu dokonywano na czytniku ELISA przy długości fali 450 z korekcją 540 lub 570 nm. Czułość testów wynosiła: dla GROα i MIP-1α: 10pg/ml, dla RANTES: 8pg/ml, dla MCP-1: 5pg/ml.

3.14. Analiza statystyczna.

Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych +/- odchylenie standardowe (SD). Do oceny znamienności statystycznej zastosowano alternatywny, obustronny test t (Welsch'a). Za granicę istotności przyjęto wartość $p < 0,05$.

4. WYNIKI.

4.1. Ekspresja CXCR4 na monocytach po kontakcie z komórkami nowotworowymi.

Początkowe badania miały na celu ustalenie, czy komórki nowotworowe mogą modyfikować ekspresję receptorów chemokinowych monocytów. W tym celu przeprowadzono 4 godzinne kohodowle monocytów z komórkami nowotworowymi HPC-4 (rak trzustki) i CHP-100 (neuroblastoma). Następnie przeprowadzono podwójne znakowanie przeciwciałami monoklonalnymi anty-CD14-FITC i anty-CXCR4-PE lub odpowiednio dobraną kontrolą izotypową znakowaną PE. Monocyty identyfikowano jako populację komórek CD14⁺ i określano proporcję komórek CXCR4⁺ oraz ekspresję tego receptora mierzoną średnią median intensywności fluorescencji pomiędzy receptorem a kontrolą izotypową.

Po kohodowli z komórkami HPC-4 proporcje monocytów wykazujących obecność CXCR4 jak i ekspresja tego receptora były istotnie obniżone (**Fig. 1A, C, D**) w porównaniu do monocytów kontrolnych. Obniżenie ekspresji CXCR4 na monocytach hodowanych z komórkami CHP-100 było jeszcze silniejsze (**Fig. 1B, C, D**). Sugerowało to, że krótki kontakt monocytów z komórkami nowotworowymi prowadzi do modyfikacji ekspresji CXCR4.

4.2. Ekspresja CXCR4 na monocytach hodowanych z komórkami nowotworowymi poddanymi uprzednio działaniu inhibitora syntezy gangliozydów.

W celu określenia czy spadek powierzchniowej ekspresji CXCR4 na monocytach podczas kontaktu z komórkami nowotworowymi może być spowodowany złuszczeniem gangliozydów, blokowano ten proces poprzez hodowlę komórek HPC-4 i CHP-100 przez 72 godziny w obecności inhibitora syntezy gangliozydów PDMP. Następnie monocyty kohodowano przez 4 godziny z komórkami nowotworowymi poddanymi i nie poddanymi działaniu PDMP i analizowano stopień ekspresji CXCR4 na komórkach CD14⁺.

Po 4 godzinach kohodowli z komórkami CHP-100 i HPC-4 obserwowano istotny spadek liczby monocytów wykazujących ekspresję CXCR4 (**Fig. 2B, D; Fig. 3B, D**) w porównaniu do hodowli w samym podłożu. Natomiast monocyty kohodowane z komórkami CHP-100 poddanymi uprzednio działaniu PDMP, wykazywały znacznie mniejszy spadek ekspresji (**Fig. 2C, D**). PDMP nie wywierał podobnego efektu w przypadku linii HPC-4 (**Fig. 3B, D, E**).

Dane te wskazują, że kontakt monocytów z komórkami nowotworowymi prowadzi do istotnego spadku ekspresji CXCR4, co może być spowodowane uwalnianiem gangliozydów lub/i chemokin przez komórki nowotworowe. Proces ten jest znacznie ograniczony przy użyciu komórek

CHP-100 poddanych ekspozycji na PDMP, a więc z zahamowanym procesem złuszczenia gangliozydów. Sugeruje to pośrednio rolę gangliozydów uwalnianych przez komórki CHP-100 w procesie hamowania ekspresji CXCR4, choć nie wyklucza się również roli chemokin. W przypadku linii HPC-4 obserwowano brak wpływu PDMP, co sugeruje, że spadek ekspresji CXCR4 był powodowany działaniem chemokin lub innych czynników obecnych na lub wydzielanych przez komórki HPC-4.

4.3. Ekspresja CXCR4 na monocytach hodowanych z komórkami nowotworowymi oddzielonymi błoną mikroporową.

Celem potwierdzenia powyższych obserwacji badano wpływ komórek CHP-100 hodowanych w komorach typu „transwell”, w których komórki były oddzielone błoną mikroporową od monocytów na ekspresję receptora CXCR4. Zakładano, że jeśli gangliozydy odgrywają rolę w tym procesie to bezpośredni kontakt monocytów z komórkami nowotworowymi nie jest konieczny.

Monocyty hodowano przez 6 godzin w 24 dołkowej płytce typu „low attachment” z komórkami linii CHP-100 umieszczonymi we wkładkach zamkniętych błoną mikroporową o średnicy porów 0,4µm (**Fig. 4A**). Następnie zbierano monocyty i analizowano ekspresję CXCR4. Monocyty po hodowli z komórkami linii CHP-100 wykazywały znaczący statystycznie spadek ekspresji CXCR4 w porównaniu do monocytów kontrolnych (**Fig. 4B, C, D**), co wskazuje, iż nie sam kontakt z komórkami nowotworowymi, ale uwalniane przez nie czynniki prowadzą do spadku ekspresji CXCR4 na ich powierzchni.

4.4. Ekspresja CCR1, CCR5 i CXCR4 na monocytach poddanych działaniu nadsączy z hodowli komórek nowotworowych.

Wyniki poprzednich eksperymentów wskazywały na rolę pozakomórkowych czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe i regulujących ekspresję CXCR4 na monocytach. W celu ustalenia wpływu tych czynników na ekspresję innych receptorów chemokinowych CCR1, CCR2, CCR5 i CXCR4 monocyty hodowano 4 godziny w podłożu lub w nadsączy z hodowli komórek linii CHP-100. Wobec gwałtownego spadku ekspresji CCR2 na monocytach po 4 godzinach hodowli (por. **Fig. 8D**) odstąpiono od badania jego modulacji. Hodowla w nadsączach prowadziła do znamienego obniżenia ekspresji CCR1, CCR5 i CXCR4 na monocytach (**Fig. 5,6,7A, B, C**). Sugeruje to, że komórki CHP-100 uwalniają do środowiska hodowlanego substancje obniżające ekspresję CCR1, CCR5 i CXCR4 na monocytach (**Fig. 5,6,7A, B, C**). W połączeniu z danymi z poprzednich eksperymentów sugeruje to rolę gangliozydów w modyfikowaniu ekspresji

receptorów chemokinowych przez komórki nowotworowe, choć nie wyklucza się udziału innych czynników, w tym chemokin.

4.5. Wpływ gangliozydów na ekspresję CCR1, CCR2, CCR5 i CXCR4 na monocytach.

W celu sprawdzenia, czy chemicznie zdefiniowane gangliozydy wpływają na ekspresję receptorów chemokinowych monocytę hodowano w obecności różnych stężeń mieszaniny gangliozydów: GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} oraz z poszczególnymi gangliozydami: asialo GM₁, asialo GM₂, GM₁, GM₂, GM₃, GD_{1a}, GD₂, GD₃ i GT_{1b}. Wybór tych gangliozydów podyktowany był danymi wskazującymi iż są one głównie uwalniane przez komórki neuroblastoma [262]. Monocyty hodowano w obecności mieszaniny gangliozydów w stężeniach 10 i 100µg/ml oraz z poszczególnymi gangliozydami w dawce 10µg/ml każdy.

Receptor CCR1 wykazywał wysoki stopień ekspresji na powierzchni świeżo izolowanych monocytach, który utrzymywał się na porównywalnym poziomie do 24-ej godziny hodowli *in vitro*, a po 48 godzinach obniżał około 10-krotnie. W obecności gangliozydów dochodziło do znamienego, zależnego od dawki, spadku ekspresji CCR1 po 4 i 24 godzinach hodowli. Gangliozydy nie wpływały znacząco na niski poziom ekspresji CCR1 po 48 godzinach hodowli (**Fig. 8A**).

Ekspresja CCR2 na świeżo izolowanych monocytach ulegała gwałtownemu obniżeniu po 4 godzinach hodowli i obserwowano brak obecności tego receptora w przeciągu 48 godzin hodowli. Wobec powyższego brak było możliwości zbadania wpływu gangliozydów i w dalszych eksperymentach zrezygnowano z oznaczania zmian w ekspresji powierzchniowej tego receptora na monocytach (**Fig. 8B**).

Na powierzchni świeżo izolowanych monocytów obserwowano bardzo niską ekspresję receptora CCR5, która wzrastała znamienne po 24 godzinach hodowli i utrzymywała się na podobnym poziomie do 48 godziny hodowli. Gangliozydy w dawce 100µg/ml znamienne hamowały ekspresję CCR5 po 24 i 48 godzinach hodowli (**Fig. 8C**).

Niska ekspresja CXCR4 na świeżo izolowanych monocytach wzrastała po 4 godzinach hodowli. Następnie obserwowano jej spadek po 24 godzinach hodowli utrzymujący się do 48 godzin. Dodatek mieszaniny gangliozydów w dawkach 10 i 100µg/ml powodował znamieny spadek ekspresji CXCR4 po 4 godzinach (**Fig. 8D**).

Przeprowadzone doświadczenia wskazują, iż w obecności mieszaniny gangliozydów dochodzi do istotnego spadku ekspresji CCR1, CCR5 i CXCR4 na monocytach. Wobec

całkowitego braku ekspresji CCR2 nawet w hodowlach 4 godzinnych w dalszych eksperymentach nie badano tego receptora.

4.6. Wpływ różnych gangliozydów na ekspresję CCR1, CCR5 i CXCR4.

W kolejnym etapie badań sprawdzano wpływ pojedynczych gangliozydów: asialo GM₁, asialo GM₂, GM₁, GM₂, GM₃, GD_{1a}, GD₂, GD₃ i GT_{1b} na ekspresję receptorów chemokinowych na monocytach. Stopień ekspresji CCR1 i CXCR4 badano po 4 godzinach a CCR5 po 24 godzinach hodowli w obecności różnych gangliozydów w stężeniu 10µg/ml (**Fig. 9A, B, C**). Jedynie gangliozydy GM₂ i GT_{1b} istotnie hamowały ekspresję badanych receptorów chemokinowych na monocytach.

4.7. Ekspresja HLA klasy I (ABC), HLA klasy II (DR) na monocytach hodowanych w obecności gangliozydów.

W kolejnych badaniach a postanowiono sprawdzić czy działanie hamujące gangliozydów ma charakter selektywny, tj. dotyczy samych receptorów chemokinowych czy nieselektywny tj. dotyczy innych determinant powierzchniowych. Badano ekspresję HLA klasy I (ABC) lub HLA klasy II (DR) na monocytach hodowanych przez 4 godziny w obecności mieszaniny (GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}) w stężeniu 10 i 100µg/ml lub GT_{1b} i GM₂ w stężeniu po 10µg/ml każdy. Ekspresja HLA-klasy I (ABC) i HLA-klasy II (DR) nie zmieniała się pod wpływem gangliozydów, nawet przy użyciu najwyższych stężeń (**Fig. 10**). Wskazuje to, iż gangliozydy selektywnie modulują ekspresję receptorów chemokinowych, a nie innych determinant powierzchniowych monocytów.

4.8. Wpływ gangliozydów na migrację monocytów do mieszaniny chemokin.

W celu sprawdzenia czy zmiany ekspresji receptorów chemokinowych na monocytach spowodowane działaniem gangliozydów są biologicznie istotne badano ich wpływ na migrację monocytów pod wpływem chemokin. Monocyty preinkubowano 4 godziny z mieszaniną gangliozydów GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} i umieszczano następnie w komorach chemotaktycznych. Monocyty we wkładkach umieszczano w płytce hodowlanej zawierającej samo podłoże (kontrola) lub mieszaninę chemokin (SDF-1, MIP-1α, MCP-2) i przeprowadzano 1 godziną inkubację. Wybór tych chemokin wynikał z faktu, iż CCR1, CCR2, CCR5 i CXCR4 są ligandami dla tych chemokin [80]. Następnie monocyty zbierano z płytek razem z podłożem i określano procent migrujących komórek za pomocą cytometru przepływowego.

Monocyty preinkubowane w samym podłożu wykazywały znaczącą migrację do mieszaniny chemokin. Chemotaksja monocytów preinkubowanych z mieszaniną gangliozydów była istotnie zahamowana w porównaniu do monocytów kontrolnych (**Fig. 11**). Sugeruje to, że modyfikacja receptorów chemokinowych przez gangliozydy wpływa na ich oddziaływania z chemokinami.

4.9. Wpływ gangliozydów GM₂ i GT_{1b} na migrację monocytów do poszczególnych chemokin.

W celu sprawdzenia, czy gangliozydy najsilniej obniżające ekspresję receptorów chemokinowych wpływają na chemotaksję monocytów preinkubowano je z mieszaniną GM₂ i GT_{1b} i badano chemotaksję do MCP-2, MIP-1 α i SDF-1 w sposób opisany powyżej (**Fig. 12**). Najsilniejszą migrację monocytów i zarazem najsilniejsze zahamowanie migracji przez gangliozydy obserwowano w przypadku MIP-1 α . Gangliozydy GM₂ i GT_{1b} hamowały także migrację monocytów do SDF-1 (**Fig. 12**). Nie obserwowano chemotaksji monocytów do MCP-2, co prawdopodobnie było związane z szybką utratą CCR2 w trakcie hodowli monocytów (por. **Fig. 8B**).

4.10. Ekspresja mRNA dla receptorów CCR1, CCR5 i CXCR4 w monocytach niestymulowanych oraz poddanych działaniu gangliozydów GM₂ i GT_{1b}.

W celu sprawdzenia czy zahamowanie ekspresji receptorów chemokinowych pod wpływem gangliozydów jest związane z modyfikacją mRNA w monocytach, przeprowadzono izolację całkowitego RNA. Następnie przeprowadzono reakcję RT-PCR posługując się primerem oligo(dT)12-24 i odwrotną transkryptazą M-MLV. Otrzymane cDNA użyto do reakcji PCR oraz Real Time PCR z wykorzystaniem polimearzy Taq i odpowiednich par primerów dla CCR1, CCR5 i CXCR4. Jako wewnętrzną kontrolę sprawdzano poziom mRNA dla β -aktyny.

W świeżo izolowanych monocytach obserwowano wysoką ekspresję mRNA dla wszystkich badanych receptorów chemokinowych. Tylko ekspresja CCR1-mRNA wykazywała znamieny spadek po 4 godzinach hodowli monocytów w obecności gangliozydów. Obniżenie ekspresji CCR5-mRNA i CXCR4-mRNA było nieznaczące (**Fig. 13D, F**). Otrzymane wyniki wskazują, że gangliozydy GM₂ i GT_{1b} nie wpływają istotnie na ekspresję mRNA dla receptorów CCR5 i CXCR4 w monocytach, choć obniżają ekspresję CCR1-mRNA.

4.11. Wpływ gangliozydów GM₂ i GT_{1b} na ekspresję cytoplazmatyczną CXCR4 na monocytach.

Wobec braku istotnej modulacji ekspresji mRNA dla większości badanych receptorów chemokinowych zbadano ekspresję cytoplazmatyczną białek receptorowych celem określenia czy zahamowanie powierzchniowej ekspresji receptorów chemokinowych wywołane przez gangliozydy mogło być spowodowane zmianami transportu cytoplazmatycznego receptorów do powierzchni. W tym celu monocyty hodowano przez 4 godziny w obecności mieszaniny gangliozydów GM₂ i GT_{1b}, bez lub w obecności brefeldyny (związku hamującego egzocytozę) a następnie oceniano cytoplazmatyczną ekspresję CXCR4 (**Fig. 14A, B**).

Cytoplazmatyczna ekspresja CXCR4 w monocytach jak również procent monocytów wykazujących ekspresję CXCR4 nie zmieniały się znamienne po 4 godzinach hodowli *in vitro* w obecności brefeldyny. Inkubacja z gangliozydami GM₂ i GT_{1b} prowadziła do znamiennego wzrostu cytoplazmatycznej ekspresji CXCR4 w monocytach (**Fig. 14A, B**). W obecności brefeldyny efekt gangliozydów był słabszy, ale poziom ekspresji w monocytach poddanych działaniu gangliozydów był wyższy w porównaniu do monocytów hodowanych w podłożu. Może to sugerować, że gangliozydy powodują zwiększenie ekspresji cytoplazmatycznej receptora i/lub jego internalizację.

4.12. Wpływ gangliozydów na wydzielanie cytokin: TNF α , IL-10 i IL-12 przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Poprzednie badania wykazały, że komórki nowotworowe indukują produkcję *de novo* TNF α , IL-10 i IL-12p40 przez monocyty [263]. W celu określenia czy i jak gangliozydy wpływają na produkcję cytokin przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi monocyty preinkubowano 1h w podłożu bez lub w obecności mieszaniny gangliozydów (GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}) w stężeniach 10 i 100 μ g/ml. Następnie do monocytów dodawano komórki nowotworowe HPC-4 lub CHP-100 i hodowano 18 godzin. W nadsączach oceniano poziom TNF α , IL-10 i IL-12p40 metodą ELISA (**Fig. 15**). Ekspozycja monocytów na same gangliozydy nie indukowała produkcji cytokin. Inkubacja monocytów z gangliozydami znacząco hamowała wydzielanie wszystkich cytokin przez monocyty stymulowane zarówno komórkami HPC-4 jak i CHP-100 (**Fig. 15 A, B, C**), przy czym stopień zahamowania narastał wraz ze zwiększaniem dawki gangliozydów. Komórki CHP-100 i HPC-4 nie uwalniały spontanicznie żadnej z badanych cytokin.

Powyższe dane wskazują, że gangliozydy hamują interakcje monocytów z komórkami nowotworowymi prowadzącymi do uwalniania TNF α , IL-10 i IL-12, ale same nie indukują produkcji cytokin.

4.13. Wpływ gangliozydów na produkcję reaktywnych form tlenu (ROI) przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Zdolność gangliozydów i komórek nowotworowych, samych gangliozydów i samych komórek nowotworowych do indukcji produkcji ROI przez monocyty badano metodą chemiluminescencji. Umieszczone na 96 dołkowej płytce monocyty preinkubowano 1h w medium bez lub z mieszaniną gangliozydów GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}, w stężeniu 100 μ g/ml, po czym dodawano odpowiednio: podłoża, komórki HPC-4 lub CHP-100. Następnie do każdego dołka dodano luminol w buforze Krebsa-Ringera i przeprowadzono ciągły pomiar chemiluminescencji w ciągu 300 minut z użyciem chemiluminometru Victor 1420.

Monocyty stymulowane komórkami HPC-4 lub CHP-100 wykazywały znamienne wyższą chemiluminescencję (**Fig. 16**) jednakże gangliozydy nie powodowały zmian w uwalnianiu ROI przez monocyty zarówno niestymulowane jak i stymulowane komórkami nowotworowymi. Nie stwierdzono zatem wpływu gangliozydów na produkcję ROI przez monocyty.

4.14. Wpływ gangliozydów na produkcję anionorodnika ponadtlennego (O₂⁻) przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Wpływ gangliozydów na produkcję O₂⁻ przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi badano metodą utleniania hydroetydyny. Znakowane przeciwciałem anti-CD14-PE monocyty preinkubowano godzinę w podłożu bez lub w obecności mieszaniny gangliozydów GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} w stężeniach 100 μ g/ml, a następnie inkubowano z hydroetydyną przez 15 minut. Następnie do monocytów dodawano odpowiednio: podłoża, komórki linii HPC-4 lub CHP-100 i inkubowano 2 godziny, po czym poddawano analizie cytofluorymetrycznej.

Gangliozydy nie podnosiły znacząco produkcji O₂⁻ przez monocyty. Komórki HPC-4 silnie stymulowały produkcję O₂⁻ jednakże gangliozydy nie wpływały istotnie na jej poziom (**Fig. 17**). Komórki CHP-100 nie indukowały produkcji O₂⁻ (**Fig. 17**). Sugeruje to, że gangliozydy nie wpływają na produkcję O₂⁻ indukowaną przez komórki nowotworowe, co pozostaje w zgodzie z danymi uzyskanymi przy użyciu chemiluminescencji (por. p. 4.13). Pośrednio wskazuje to również, iż receptory chemokinowe nie odgrywają istotnej roli w przekazywaniu sygnału do indukcji produkcji ROI.

4.15. Indukcja sekrecji chemokin przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

W celu sprawdzenia czy i jakie chemokiny są uwalniane przez monocyty podczas ich hodowli z komórkami nowotworowymi monocyty hodowano z komórkami CHP-100 i HPC-4 przez 18 godzin. W nadsączach oceniano poziom MCP-1, RANTES, MIP-1 α i GRO- α metodą ELISA. Obserwowano znamienne wzrost produkcji MCP-1 przez monocyty po kontakcie z komórkami HPC-4 i CHP-100 (**Fig. 18A**). Komórki nabłonkowe HAE również stymulowały, choć w znacznie mniejszym stopniu uwalnianie MCP-1. Komórki CHP-100 nie wykazywały spontanicznego uwalniania żadnej z badanych chemokin, podczas gdy komórki HPC-4 uwalniały niewielkie ilości MCP-1 i dość znaczne RANTES. Sekrecja MIP-1 α , RANTES i GRO- α przez monocyty była stymulowana przez komórki HPC-4, ale nie przez CHP-100 (**Fig. 18B, C, D**).

Uzyskane dane wskazują, że komórki nowotworowe w różnym stopniu stymulują uwalnianie szeregu chemokin przez monocyty. Sugeruje to, że chemokiny wydzielane przez monocyty po kontakcie z komórkami nowotworowymi mogą modulować ekspresję receptorów chemokinowych na powierzchni monocytów.

4.16. Wpływ gangliozydów na wydzielanie MIP-1 α przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Następnym etapem badań było określenie czy i jak gangliozydy wpływają na produkcję chemokiny MIP-1 α przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi. Badano sekrecję MIP-1 α , bo jedynie uwalnianie tej chemokiny stymulowały oba typy komórek nowotworowych. W tym celu monocyty preinkubowano 1h w podłożu bez lub w obecności mieszaniny gangliozydów (GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}) o stężeniach 10 i 100 μ g/ml. Następnie do monocytów dodano komórki nowotworowe HPC-4 lub CHP-100 i hodowano 18 godzin. W nadsączach oceniano poziom MIP-1 α metodą ELISA. Ekspozycja monocytów na same gangliozydy nie indukowała produkcji tej chemokiny natomiast komórki obu linii stymulowały produkcję MIP-1 α przez monocyty (**Fig. 19**). Preinkubacja monocytów z gangliozydami nie powodowała znaczącego hamowania uwalniania MIP-1 α przez monocyty stymulowane zarówno komórkami CHP-100 jak i HPC-4 (**Fig. 19**), niezależnie od dawki gangliozydów. Tylko w przypadku komórek CHP-100 gangliozydy w dawce 100 μ g/ml hamowały znamienne uwalnianie MIP-1 α w porównaniu monocytów hodowanych w obecności samych komórek CHP-100. Same komórki nowotworowe nie uwalniały MIP-1 α .

Powyższe obserwacje wskazują, że indukowane komórkami nowotworowymi wydzielanie MIP-1 α przez monocyty nie jest istotnie hamowane przez gangliozydy w przypadku komórek HPC-4, ale mogą one odgrywać rolę hamującą w interakcjach monocytów z komórkami CHP-100.

5. DYSKUSJA

Monocyty/makrofagi odgrywają istotną rolę w reaktywności przeciwnowotworowej człowieka i mogą zarówno hamować jak i sprzyjać wzrostowi różnych nowotworów [26, 264]. W wyniku bezpośredniego kontaktu monocytów/makrofagów z komórkami nowotworowymi dochodzi do indukcji produkcji cytokin ($\text{TNF}\alpha$, IL-10, IL-6, IL-12), NO i ROI [27,28, 25, 29, 263] jednakże krótka ekspozycja monocytów na komórki nowotworowe może prowadzić do ich selektywnej areaktywności na komórki nowotworowe [263]. Wskazuje to, iż w hodowli *in vitro* można odtworzyć złożone interakcje TIM - komórki nowotworowe. Komórki nowotworowe spontanicznie uwalniają gangliozydy w procesie złuszczenia [264], a monocyty krążące w krwioobiegu lub TIM w mikrośrodowisku nowotworu mogą podlegać ich działaniu. Niniejsze badania podjęto w celu weryfikacji tej hipotezy.

Celem badań było określenie modulacji ekspresji receptorów chemokinowych monocytów zachodzące w wyniku kontaktu z komórkami nowotworowymi i ustalenie roli mediatorów produkowanych przez te komórki (gangliozydów lub/i chemokin), a także określenie molekularnych mechanizmów obserwowanych zmian. Hipoteza robocza zakładała, iż komórki nowotworowe mogą zmieniać ekspresję receptorów chemokinowych na monocytach, co z kolei może istotnie zmniejszać ich zdolność do chemotaksji a w konsekwencji tworzenia nacieków TIM. W niniejszej pracy udowodniono, że ekspozycja monocytów na komórki nowotworowe lub ich produkty powoduje obniżenie ekspresji receptorów chemokinowych na powierzchni monocytów, a także zmiany ich aktywności przeciwnowotworowej ocenianej produkcją różnych mediatorów (cytokiny, chemokiny, ROI).

Badania przeprowadzono stosując kohodowlę monocytów i komórek nowotworowych człowieka jako modelu *in vitro* oddziaływań TIM – komórki nowotworowe *in situ*. Określano ekspresję receptorów chemokinowych oraz aktywność monocytów po kontakcie z komórkami nowotworowymi lub ich rozpuszczalnymi produktami (gangliozydy, chemokiny).

W tym celu badano:

- ekspresję powierzchniową, cytoplazmatyczną i mRNA dla CCR1, CCR2, CCR5 i CXCR4,

- uwalnianie cytokin (TNF α , IL-10 i IL-12) i chemokin (MIP-1 α , MCP-2, GRO- α , RANTES),
- produkcję reaktywnych form tlenu (ROI),
- chemotaksję monocytów do chemokin MIP-1 α , MCP-2, SDF-1.

W niniejszej pracy wykazano, że krótki (4-24h) kontakt monocytów z komórkami nowotworowymi *in vitro* prowadzi do spadku ekspresji receptora CXCR4 na powierzchni monocytów, przy czym większe obniżenie jego ekspresji obserwowano podczas hodowli monocytów z komórkami linii neuroblastoma CHP-100 niż z komórkami linii raka trzustki HPC-4 (**Fig. 1**). Wcześniejsze badania wykazały, że komórki linii neuroblastoma wydzielają do otoczenia SDF-1 α [209] oraz różne rodzaje gangliozydów [233]. Oba te czynniki mogły mieć wpływ na modulację ekspresji CXCR4. Z innych badań wynika, że komórki linii raka trzustki również uwalniają do środowiska chemokiny, np.: MCP-1 i GRO α [197, 265]. Jak dotąd nie wykazano produkcji i uwalniania SDF-1 α przez komórki raka trzustki, z którego wyprowadzono linię komórkową używaną w niniejszej pracy.

Komórki różnych nowotworów np.: raka nerki, siatkówki, glejaków oraz neuroblastoma uwalniają do mikrośrodowiska guza [233, 266] oraz krwioobiegu [264] znaczne ilości różnych rodzajów gangliozydów [267], które wywierają hamujący wpływ na układ immunologiczny [254]. Gangliozydy uwalniane przez komórki nowotworowe powodują między innymi zahamowanie różnicowania monocytów do komórek dendrytycznych [268], blokują prezentację antygenów przez monocyty [244], proliferację [269] i odpowiedź cytotoksyczną limfocytów [270].

W niniejszej pracy wykazano, że kohodowla z komórkami neuroblastoma prowadzi do istotnego obniżenia ekspresji CXCR4 na monocytach (**Fig. 1D, 2D**). Jednakże przy użyciu do hodowli monocytów komórek CHP-100 poddanych uprzednio działaniu inhibitora syntezy gangliozydów (PDMP), obserwowano znacznie mniejsze zahamowanie spadku ekspresji CXCR4 (**Fig. 2**). Wskazuje to pośrednio, że gangliozydy uwalniane przez komórki CHP-100 mogą być odpowiedzialne za modulację ekspresji CXCR4, a ponieważ efekt PDMP był tylko częściowy nie można wykluczyć także roli chemokin. Natomiast PDMP nie zmieniał efektu hamującego ekspresję CXCR4 przez komórki nowotworowe HPC-4 (**Fig. 3**), co wskazuje raczej na wpływ innych czynników produkowanych przez te komórki, np. chemokin. Z innych badań wynika, że zahamowanie syntezy gangliozydów w komórkach

nowotworowych, (neuroblastoma, czerniak, hepatoma) przez specyficzne inhibitory (PDMP, PPPP) prowadzi do zahamowania rozwoju nowotworu [259], niezaburzonego rozwoju komórek dendrytycznych z monocytów [267] oraz zahamowania apoptozy limfocytów T [271]. Pozostawałoby to w zgodności z niniejszymi obserwacjami dotyczącymi hamowania aktywności przeciwnowotworowej monocytów przez gangliozydy (por. niżej).

W niniejszej pracy wykazano, że monocyty niepozostające w bezpośrednim kontakcie z komórkami CHP-100 (hodowanymi w płytkach „Transwell”) oraz poddane działaniu nadsączy tych komórek wykazywały znamiennej statystycznie spadek ekspresji CXCR4 (**Fig. 4**). Wskazuje to, iż nie sam kontakt z komórkami nowotworowymi, lecz również uwalniane przez nie czynniki (gangliozydy, chemokiny) prowadzą do spadku ekspresji CXCR4 na powierzchni monocytów. Do chwili obecnej brak danych na temat oddziaływania gangliozydów wydzielanych przez komórki nowotworowe na ekspresję receptorów chemokinowych na monocytach krwi obwodowej. Natomiast istnieją obserwacje wskazujące na wpływ mikrośrodowiska nowotworu na ekspresję receptorów chemokinowych TIM [204, 219]. TIM izolowane z raka jajnika wykazywały wysoką ekspresję CCR1 i 5 oraz niezmienną CCR2 w porównaniu do monocytów krwi obwodowej [272]. W niniejszej pracy udowodniono spadek ekspresji CCR1, CCR5 i CXCR4 na monocytach poddanych działaniu supernatantu z hodowli komórek neuroblastoma (**Fig. 5, 6, 7**) oraz brak modyfikacji CCR2 wobec jego niskiej konstytutywnej ekspresji.

Na podstawie przedstawionych powyżej pośrednich dowodów na rolę gangliozydów pochodzących z komórek neuroblastoma (CHP-100) w modyfikacji ekspresji receptorów chemokinowych na monocytach podjęto badania nad zmianami ekspresji tych receptorów przez chemicznie zdefiniowane gangliozydy. Do badań wykorzystano gangliozydy GM₁, GD_{1a}, GD_{1b} i GT_{1b}, które są głównie wydzielane przez komórki neuroblastoma. Gangliozydy powodowały znamiennej, zależny od dawki, spadek ekspresji CCR1, CCR5 i CXCR4 (**Fig. 8**). W związku z różnym zachowaniem się ekspresji tych receptorów w trakcie hodowli efekt hamujący obserwowano dla CCR1 po 4 i 24 godzinach, dla CCR5 po 24 i 48 godzinach i dla CXCR4 po 4 godzinach. Nie zmienia to zasadniczo wniosków, iż gangliozydy istotnie modyfikują ekspresję receptorów chemokinowych na monocytach.

Wobec spontanicznego i szybkiego spadku ekspresji CCR2 nie było możliwe zbadanie czy gangliozydy wpływają na jego ekspresję (**Fig. 8B**). Ekspresja CCR5 na świeżo izolowanych monocytach była bardzo niska i wzrastała znamiennej po 24 godzinach hodowli

(**Fig. 8C**), co pozostaje w zgodności z innymi obserwacjami [156, 273]. Gangliozydy w dawce 100µg/ml hamowały ekspresję CCR5 po 24 i 48 godzinach hodowli. Niska ekspresja CXCR4 bezpośrednio po izolacji wzrastała po 4 godzinach hodowli monocytów. Gangliozydy hamowały istotnie ekspresję tego receptora (Ryc. 8D). Analiza wpływu poszczególnych gangliozydów (asialoGM₁, asialo GM₂, GM₁, GM₂, GM₃, GD_{1a}, GD₂, GD₃, GT_{1b}) na ekspresję CCR1, CCR5 i CXCR4 na monocytach doprowadziła do wniosku, że za spadek ekspresji receptorów chemokinowych są odpowiedzialne głównie gangliozydy GM₂ i GT_{1b} (**Fig. 9**). Wykazano również, że gangliozydy selektywnie hamują ekspresję receptorów chemokinowych albowiem nie powodowały zmian w ekspresji antygenów HLA klasy I (ABC) i II (DR) (**Fig. 10**). Pozostaje to w zgodzie z obserwacjami, że monocyty preinkubowane z GD₁ nie wykazują zmian w ekspresji HLA-DR [251]. Jednakże inne dane wskazują, że gangliozydy hamują proces prezentacji antygeny [244], a także obniżają ekspresję HLA klasy I i II na astrocytach mysich [249]. TIM połączone z przetworzonym antygenem nowotworowym nie są w stanie stymulować odpowiedzi cytotoksycznych limfocytów T z powodu interferencji przez gangliozydy nowotworowe wbudowane do ich błony komórkowej [274].

Ekspresja receptorów chemokinowych na monocytach warunkuje ich migrację do miejsc dojrzewania, ognisk zapalnych i nowotworów [69, 136]. TIM izolowane z raka jajnika, a także monocyty krwi obwodowej chorych z tym nowotworem, wykazują zmniejszoną ekspresję mRNA i białka powierzchniowego CCR2 przy braku zmian w ekspresji CCR1 i 5. Obniżenie ekspresji CCR2 jest zależne od miejscowej produkcji TNF α [219]. Upośledzoną chemotaksję monocytów obserwuje się u pacjentów z rakiem głowy i szyi [275], płuc [276], żołądka [277], piersi [278], nowotworów układu moczowo-płciowego [279] i czerniakami [280], co pośrednio świadczy o uwalnianiu przez komórki nowotworowe czynników hamujących ekspresję receptorów chemokinowych [281], które warunkują migrację do ognisk nowotworowych. Komórki neuroblastoma uwalniają do mikrośrodowiska guza i krwioobiegu biologicznie aktywne gangliozydy [254] jednakże brak danych o roli gangliozydów w modyfikacji migracji monocytów do gradientu chemokin w nowotworze. W niniejszej pracy stwierdzono, że preinkubacja monocytów z gangliozydami (GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}) znacząco hamuje migrację monocytów do mieszaniny chemokin: SDF-1 β , MIP-1 α i MCP-2 (**Fig. 11**). Wykazano również, że gangliozydy GM₂ i GT_{1b} najsilniej działające na receptory chemokinowe znacząco obniżają chemotaksję monocytów do SDF-1 i MIP-1 α (**Fig. 12**). Wskazuje to, że obniżenie ekspresji receptorów chemokinowych na monocytach jest

biologicznie istotne. Pośrednio potwierdza to także obserwacja, iż supernatanty z hodowli komórek nowotworowych CHP-100 (zawierające gangliozydy) powodują spadek ekspresji receptorów chemokinowych na monocytach krwi obwodowej (**Fig. 5, 6, 7**).

Ekspresja mRNA dla receptorów chemokinowych jest zależna od wpływu mikrośrodowiska nowotworu, lecz aktualnie brak danych o wpływie gangliozydów na nie w monocytach i innych komórkach układu odpornościowego. W raku jajnika ekspresja CCR2-mRNA w TIM ulega obniżeniu, co jest spowodowane obecnością $TNF\alpha$ w środowisku [219], natomiast ekspresja CCR1 i CCR5-mRNA jest zwiększona [182, 272]. W niniejszej pracy analizowano wpływ gangliozydów na ekspresję mRNA dla receptorów chemokinowych w monocytach i nie stwierdzono ich efektu hamującego z wyjątkiem obniżenia ekspresji CCR1-mRNA (**Fig. 13 B**). Sugeruje to, iż efekt hamujący gangliozydów na ekspresję receptorów chemokinowych nie jest głównie związany z blokowaniem ekspresji genów kodujących receptory chemokinowe.

W tej sytuacji postanowiono sprawdzić czy modulacja ekspresji receptorów chemokinowych przez gangliozydy nie zachodzi na etapie regulacji poziomu białka wewnątrzkomórkowego i jego transportu na powierzchnię. Stwierdzono, że około 80% monocytów po 4 godzinnej hodowli *in vitro* wykazywało cytoplazmatyczną ekspresję CXCR4 (Rys. 14A), która nie ulegała istotnym zmianom w obecności brefeldyny. Pod wpływem gangliozydów obserwowano znamienny wzrost ekspresji cytoplazmatycznej CXCR4, tak w obecności jak i bez brefeldyny (**Fig. 14**). Może to wskazywać na zwiększenie retencji CXCR4 w cytoplazmie i zahamowanie transportu białka CXCR4 (a zapewne i innych receptorów chemokinowych) na powierzchnię pod wpływem gangliozydów, co może, przynajmniej częściowo tłumaczyć spadek ekspresji CXCR4 na powierzchni monocytów. Natomiast spadek ekspresji CXCR4 indukowany przez cytokiny jest spowodowany endocytozą białka receptora, ale nie jego degradacją [282]. Mechanizm ten jest mało prawdopodobny w przypadku gangliozydów, ponieważ nie posiadają one zdolności do łączenia się z receptorami dla chemokin ani nie indukują produkcji cytokin (por. niżej).

Monocyty/makrofagi produkują ogromny wachlarz cytokin, np. $TNF\alpha$, IL-6, -10, -11, -12, -18, chemokin, np. MGS/GRO, IL-8, MIP-1 α , - β , ROI i RNI, które mogą brać udział w regulacji wzrostu nowotworu. Komórki nowotworowe indukują produkcję mRNA i białka $TNF\alpha$ [28], oraz ROI [25] i RNI [27] przez ludzkie monocyty. Jednakże restymulacja

monocytów komórkami nowotworowymi po uprzedniej ekspozycji na nie prowadzi do selektywnej areaktywności monocytów objawiającej się zmniejszoną produkcją prozapalnych cytokin (TNF α , IL-12) i zwiększoną produkcją immunosupresyjnej IL-10 [263].

Przeciwnowotworowa aktywność TIM jest obniżona w porównaniu do monocytów krwi obwodowej [14], co sugeruje wpływ hamujący mikrośrodowiska nowotworu. W niniejszej pracy badano czy i jak gangliozydy obecne w środowisku wpływają na produkcję cytokin przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi. Wykazano, że preinkubacja monocytów z gangliozydami prowadzi do zahamowania wydzielania TNF α , IL-10 i IL-12 i przez monocyty stymulowane komórkami HPC-4 i CHP-100 (**Fig. 15**). Same gangliozydy nie indukowały produkcji cytokin przez monocyty. Wcześniejsze obserwacje wykazały, że ekspozycja monocytów na komórki nowotworowe prowadzi do ich selektywnej areaktywności na stymulację komórkami nowotworowymi [263]. Podobnie u chorych z rakiem żołądka produkcja TNF α i IL-12 przez komórki jednojądrzaste stymulowane komórkami nowotworowymi jest upośledzona [283]. Niniejsze badania pozostają w zgodności z tymi danymi i mogą wskazywać, że kontakt monocytów *in vitro* lub *in vivo* z gangliozydami pochodzącymi z komórek nowotworowych może być jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za areaktywność monocytów.

Niniejsze badania są zgodne z innymi danymi, że ekspresja genu TNF α w monocytach indukowana przez LPS i *S.aureus* jest blokowana przez różne gangliozydy na wczesnym etapie transdukcji sygnału i hamowania ekspresji NF κ B [250]. Jednakże usunięcie kwasu sjałowego lub kwasów tłuszczowych z cząsteczek gangliozydów powoduje obniżenie ich właściwości supresyjnych. Gangliozydy interferują z drogami przekazywania sygnału inicjowanymi przez związane z receptorami kinazy tyrozynowe lub przekazywane przez PKC, MAPK i inne kinazy [284]. PKC najsilniej hamują gangliozydy GT_{1b} i GD_{1b}, natomiast asialogangliozydy pozbawione reszt kwasu sjałowego nie wykazują zahamowania PKC. Hamujący efekt gangliozydów na zależną od jonów Ca²⁺ kinazę jest specyficzny dla PKC [285]. Wydaje się, że hamowanie produkcji TNF α przez gangliozydy obserwowane w tej pracy może mieć podobny mechanizm.

Niniejsza praca dostarcza danych, że gangliozydy komórek nowotworowych hamują indukcję syntezy innych cytokin zależnych od NF κ B np. IL-12 [286, 287] (**Fig. 15C**). Jest to zgodne z wcześniejszymi pracami, w których wykazano, że promotor podjednostki p40 IL-12

zawiera 2 miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne podobne do NFκB [288, 289]. Monocyty stymulowane LPS poddane uprzednio działaniu GD_{1a} wykazywały zahamowaną ekspresję IL-12 oraz translokację NFκB do jądra komórkowego [251], co podobnie jak w przypadku TNFα może być związane z działaniem ganglizydów na NFκB oraz kinazy p38 MAP i PKC.

Udowodniono również, że GT_{1b} hamuje produkcję IL-10 w monocytach krwi obwodowej [290], lecz ekspresja IL-10 przez monocyty nie jest zależna od aktywacji NFκB [291], natomiast zależy od wewnątrzkomórkowego poziomu TNFα i IL-1 oraz przekazywania sygnału przez p38 MAP kinazy [292]. Ponieważ gangliozydy hamują produkcję wewnątrzkomórkowego TNFα na poziomie NFκB oraz blokują kinazy MAP odpowiedzialne za syntezę może to tłumaczyć zahamowanie jej produkcji przez gangliozydy (**Fig. 15B**). Komórki jednojądrzaste pochodzące z krwi obwodowej chorych z rakiem piersi wykazują podwyższoną produkcję IL-10 [293] a raku jajnika TIM wykazują wysoki poziom IL-10 mRNA [201]. Jednakże własne obserwacje u chorych z rakiem żołądka nie wskazują na obniżoną produkcję IL-10 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej chorych z rakiem żołądka [283]. W tej sytuacji nie jest jasne, czy gangliozydy odgrywają rolę w regulacji produkcji IL-10 w chorobie nowotworowej.

Stymulacja monocytów komórkami nowotworowymi *in vitro* indukuje produkcję ROI, w tym: O₂⁻ i H₂O₂ [25]. Brak danych czy ROI i O₂⁻ są indukowane przez gangliozydy lub o modyfikacji produkcji ROI przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi. W niniejszej pracy nie stwierdzono indukcji ROI przez gangliozydy, ani modyfikacji przez nie produkcji O₂⁻ w monocytach stymulowanych komórkami nowotworowymi (**Fig. 16, 17**). Pozostaje to w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami, że sekrecja O₂⁻ indukowana w linii MonoMac6 przez PMA nie jest hamowana przez gangliozydy [250]. Ponadto, fakt hamowania przez gangliozydy ekspresji receptorów chemokinowych, przy braku blokowania sekrecji O₂⁻, wskazuje pośrednio, że nie odgrywają one roli w przekazywaniu sygnału do produkcji ROI i O₂⁻ przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi. Nie znaleziono także korelacji pomiędzy aktywacją fosfolipazy A2 (PLA2, phospholipase A2) w monocytach i syntezą O₂⁻ [294]. Wskazuje to pośrednio, że PKC nie jest zaangażowana w syntezę ROI przez monocyty (specyficznie hamowana przez gangliozydy).

Komórki nowotworowe wydzielają do mikrośrodowiska guza i krwioobiegu różne czynniki chemotaktyczne, np.: MIP-1α i β [295], RANTES [200] i MCP-1, -2, -3 [296, 297] działające głównie na monocyty, co powoduje ich migrację do guza nowotworowego. Inne

chemokiny np.: ENA78 [298], SDF-1 [209], GRO α [299], IL-8 [189], MIP-3 α [215] mogą również oddziaływać na komórki układu immunologicznego. Chemokiny łączą się z kilkoma receptorami powodując ich internalizację i w konsekwencji zahamowanie późniejszej odpowiedzi komórek na stymulację i migrację w odpowiedzi na czynnik chemotaktyczny.

Niniejsze badania po raz pierwszy udowodniły, że komórki nowotworowe (CHP-100 i HPC-4) indukują produkcję MCP-1 (**Fig. 18A**). Komórki CHP-100 nie produkowały żadnej z badanych chemokin (**Fig. 18**), podczas gdy komórki HPC-4 uwalniały niewielkie ilości MCP-1 i dość znaczne RANTES (**Fig. 18A, C**). Sekrecja MIP-1 α , RANTES i GRO- α przez monocyty była stymulowana wyłącznie przez komórki HPC-4 a nie przez komórki CHP-100 (**Fig. 18A**). Uzyskane wyniki wskazują, że komórki nowotworowe w różnym stopniu stymulują uwalnianie różnych chemokin przez monocyty. Znamiennym jest fakt, iż komórki HPC-4, a nie komórki CHP-100, indukują sekrecję chemokin reagujących z szeregiem receptorów chemokinowych, co może być związane ze spadkiem ekspresji receptorów chemokinowych monocyty w trakcie ich inkubacji z komórkami nowotworowymi. Mogłoby to tłumaczyć, iż za spadek ekspresji receptorów chemokinowych monocyty w kohodowli z komórkami HPC-4 odpowiadają raczej chemokiny niż gangliozydy, o czym świadczy także fakt słabego efektu PDMP na te komórki nowotworowe (por. wyżej).

Wcześniejsze prace wykazały, że IL-4, -10, -13 hamują indukowaną LPS ekspresję MIP-1 α przez monocyty [300, 301, 302]. Ponadto wykazano hamowanie wywołanej działaniem LPS ekspresji MIP-1 α w monocytach krwi obwodowej przez kortykosteroidy (deksametazon) [303] i adrenalinę [304]. Natomiast czynniki pochodzenia bakteryjnego takie jak komponenty ściany komórkowej bakterii (APMP), BCG, kwas lipoteichoowy *S.aureus* i *Streptococcus pyogenes* silnie indukują ekspresję MIP-1 α przez monocyty krwi obwodowej [116, 305, 306]. Brak danych o wpływie gangliozydów na produkcję MIP-1 α w monocytach stymulowanych komórkami nowotworowymi. W niniejszej pracy wykazano, że same gangliozydy nie indukowały ekspresji MIP-1 α w monocytach i nie wpływały też na ekspresję MIP-1 α przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi (**Fig. 19**). Może to być związane z innymi drogami przekazywania sygnału do syntezy MIP-1 α , na które nie oddziałują gangliozydy. Analiza regionów promotorowych i miejsc przyłączenia białek regulujących transkrypcję w regionach regulatorowych MIP-1 α w komórkach monocytarnych sugeruje zaangażowanie czynnika transkrypcyjnego C/EBP β i wyklucza udział innych dróg sygnałowania przez NF κ B i NF-AT w produkcji tej chemokiny. Doświadczenia z aktywacją

czynników transkrypcyjnych NFκB, AP-1, C/EBPβ wykazały, że C/EBPβ jest odpowiedzialny za aktywację ekspresji MIP-1α w monocytach oraz że NFκB bierze udział w tym procesie w zależności od typu komórek oraz użytego do stymulacji związku [307]. W ekspresję MIP-1α w monocytach zaangażowane są również białka NMP, szczególnie NMP1 [308, 309]. Odmienne drogi sygnalowania do produkcji cytokin i chemokin mogą tłumaczyć brak wpływu gangliozydów na sekrecję tych ostatnich.

6. WNIOSKI

- ❖ Monocyty po kontakcie z komórkami nowotworowymi wykazują obniżenie ekspresji CXCR4.
- ❖ Zahamowanie syntezy gangliozydów w komórkach neuroblastoma (CHP-100) przez swoisty inhibitor PDMP prowadzi do mniejszego spadku ekspresji CXCR4 na monocytach, co wskazuje na rolę gangliozydów w modyfikacji ekspresji tego receptora. Natomiast brak efektu PDMP w przypadku komórek nowotworowych HPC-4 sugeruje rolę modulacyjną chemokin.
- ❖ Nadsącze z hodowli komórek CHP-100, a także ich hodowla z monocytami bez kontaktu komórek, silnie hamują ekspresję receptorów CCR1, CCR5 i CXCR4 na powierzchni monocytów, co dodatkowo potwierdza rolę gangliozydów w hamowaniu ekspresji receptorów chemokinowych na monocytach.
- ❖ Gangliozydy (głównie GM₂ i GT_{1b}) powodują selektywne obniżenie ekspresji powierzchniowej CCR1, CCR5 i CXCR4, ale nie HLA klasy I i II na monocytach, oraz zahamowanie migracji monocytów do chemokin MIP-1 α i SDF-1.
- ❖ Ekspresja mRNA dla receptorów CCR1, CCR5 i CXCR4 monocytów nie ulega istotnej zmianie po ekspozycji na gangliozydy.
- ❖ Spadkowi ekspresji powierzchniowej receptorów chemokinowych na monocytach spowodowanym gangliozydami towarzyszy podwyższenie ekspresji cytoplazmatycznej białek receptorowych.
- ❖ Gangliozydy powodują zahamowanie wydzielania TNF α , IL-10 i IL-12, ale nie ROI, przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.
- ❖ Komórki nowotworowe CHP-100 nie wydzielają do środowiska żadnej z badanych chemokin (RANTES, MCP-1, GRO α i MIP-1 α), natomiast komórki HPC-4 uwalniają RANTES, MCP-1 i GRO α . Komórki HPC-4 indukują w monocytach sekrecję RANTES, MCP-1, GRO α i MIP-1 α .
- ❖ Gangliozydy nie powodują obniżenia wydzielania MIP-1 α przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Przedstawione wyniki wskazują, że zarówno bezpośredni kontakt monocytów z komórkami nowotworowymi, jak i czynniki wydzielane przez te ostatnie, hamują ekspresję receptorów chemokinowych na monocytach. Badania wskazują, że do rozpuszczalnych mediatorów komórek nowotworowych odpowiedzialnych za ten efekt należą zarówno

gangliozydy jak i chemokiny. Gangliozydy modyfikują ekspresję receptorów chemokinowych poprzez zahamowanie ich transportu na powierzchnię, a nie poprzez zahamowanie ekspresji genów je kodujących. Gangliozydy blokują uwalnianie cytokin, ale nie blokują produkcji ROI i chemokin przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi. Tak więc chemokiny jak i gangliozydy istotnie modulują interakcje monocytów z komórkami nowotworowymi, co może wskazywać na ich rolę z modyfikacji dwukierunkowych oddziaływań TIM z nowotworami.

7. STRESZCZENIE.

Monocyty/makrofagi odgrywają istotną rolę w odpowiedzi gospodarza na rozwijający się nowotwór. Monocyty stanowiące prekursorzy TIM (naciekających nowotwór makrofagów), mogą być ekspozowane na produkty komórek nowotworowych (np.: gangliozydy, chemokiny), zarówno w krwioobiegu jak i mikrośrodowisku nowotworu. W efekcie może to prowadzić do zmian w ekspresji receptorów chemokinowych monocytów.

Celem pracy było określenie ekspresji receptorów dla niektórych chemokin na monocytach w trakcie ich interakcji z komórkami nowotworowymi *in vitro*. Badano ekspresję receptorów chemokinowych CCR1, CCR2, CCR5 i CXCR4 na monocytach po kontakcie z komórkami nowotworowymi raka trzustki (linia HPC-4) i neuroblastoma (linia CHP-100), z supernatantami po ich hodowli, a także gangliozydami, które są złuszczone i uwalniane przez komórki nowotworowe. Ekspresję receptorów chemokinowych na/w monocytach badano na poziomie białka powierzchniowego, cytoplazmatycznego i transkrypcji. Ponadto badano wpływ gangliozydów na migrację monocytów do chemokin MIP-1 α , MCP-2 i SDF-1, na produkcję cytokin (TNF, IL-10, IL-12), chemokin oraz ROI przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Z przeprowadzonych badań wynika, że za wybiórczy spadek ekspresji dla receptorów chemokinowych CCR1, CCR5 i CXCR4 na monocytach po kontakcie z komórkami nowotworowymi odpowiedzialne są ich produkty - gangliozydy w przypadku komórek CHP-100 lub/i chemokiny w przypadku komórek HPC-4. Stwierdzono także, że komórki CHP-100 nie wydzielają chemokin. Gangliozydy, głównie GT_{1b} i GM₂, hamowały selektywnie ekspresję CCR1, CCR5 i CXCR4 na monocytach i ich migrację do MIP-1 α i SDF-1. Gangliozydy nie zmieniały ekspresji mRNA dla receptorów chemokinowych, ale powodowały podwyższenie ekspresji cytoplazmatycznej CXCR4 w monocytach, co sugeruje ich hamujący wpływ na transport białek receptorowych na powierzchnię monocytów. Gangliozydy wywierały hamujący wpływ na sekrecję cytokin (TNF α , IL-10 i IL-12) lecz nie hamowały produkcji ROI i wydzielania MIP-1 α , przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Niniejsze badania wykazały, że zarówno gangliozydy jak i chemokiny uwalniane w trakcie dwukierunkowych interakcji monocytów z komórkami nowotworowymi modyfikują istotnie funkcje biologiczne tych komórek, a zatem i reaktywność przeciwnowotworową gospodarza.

SUMMARY

Monocytes/macrophages play an important role in the host antitumour response. Monocytes are precursors of TIM (tumour infiltrating macrophages) and may be affected by tumour cell products (e.g.: gangliosides, chemokines) both in the blood and in the tumour microenvironment. This can lead to modulation of chemokine receptor expression on monocytes.

The aim of the study was to evaluate the expression of receptors for some chemokines on monocytes during their interactions with tumour cells *in vitro*. The expression of chemokine receptors: CCR1, CCR2, CCR5 and CXCR4 on monocytes was determined after their contact with pancreatic cancer cells (HPC-4 line) and neuroblastoma cells (CHP-100 line), exposure to supernatants from their culture, and gangliosides which are shed and released from tumour cells. The expression of chemokine receptors was evaluated at the surface, intracellular protein, and transcription levels. Furthermore, the effect of gangliosides on the migration of monocytes to chemokines such as MIP-1 α , MCP-2 and SDF-1, the production of cytokines (TNF α , IL-10, IL-12), chemokines and ROI by monocytes stimulated with tumour cells were evaluated.

The data suggest that the selective decrease of chemokine receptors (CCR1, CCR5 and CXCR4) on monocytes after their contact with tumour cells is induced by tumour cells products - gangliosides in case of CHP-100 cells and/or chemokines in case of HPC-4 cells. Chemokines were not secreted by CHP-100 cells. Gangliosides, mainly GT_{1b} and GM₂, selectively inhibited CCR1, CCR5 and CXCR4 expression on monocytes and their migration to MIP-1 α and SDF-1. The mRNA for chemokine receptors was not altered by gangliosides, but the CXCR4 cytoplasmic expression was increased. It may suggest that gangliosides inhibit transport of receptor proteins to the monocyte surface. Gangliosides exerted an inhibitory effect on cytokine secretion (TNF α , IL-10, IL-12), but did not inhibit the production of ROI as well as MIP-1 α secretion, by monocytes stimulated with tumour cells.

The present studies show that both gangliosides and chemokines released during bidirectional interactions of monocytes with tumour cells significantly modify their biological activity and hence antitumour response of the host.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Mantovani A.: Tumor- associated macrophages. *Current Opinion in Immunology*. 1990, 2: 689-692.
2. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L.: The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today*. 1992, 13: 265-270.
3. Stephens TC, Currie GA, Peacock JH.: Repopulation of gamma-irradiated Lewis lung carcinoma by malignant cells and host macrophage progenitors. *British Journal of Cancer*. 1978, 38: 573-82.
4. McBride WH.: Phenotype and functions of intratumoral macrophages. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1986, 865: 27-41.
5. Graves DT, Jiang YL, Williamson MJ, Valente AJ.: Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science*. 1989, 245: 1490-3.
6. Jiang J, Beller D, Frenzl G, Graves D.: Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *Journal of Immunology*. 1992, 148: 2423-2428.
7. van Ravenswaay Claasen HH, Kluin PM, Fleuren GJ.: Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. *Laboratory Investigation*. 1992, 67: 166-74.
8. Lewis CE, Leek R, Harris A, McGee JO.: Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 1995 57: 747-51.
9. Toomey D, Harmeij J, Condron C, Kay E, Bouchier-Hayes D.: Phenotyping of immune cell infiltrates in breast and colorectal tumours. *Immunology Investigation*. 1999, 28: 29-41.
10. Gottlinger HG, Rieber P, Gokel JM, Lohe KJ, Riethmuller G.: Infiltrating mononuclear cells in human breast carcinoma: predominance of T4+ monocytic cells in the tumor stroma. *International Journal of Cancer*. 1985, 35: 199-205.
11. Brocker EB, Zwadlo G, Holzmann B, Macher E, Sorg C.: Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. *International Journal of Cancer*. 1988, 41: 562-7.
12. Loercher AE, Nash MA, Kavanagh JJ, Platsoucas CD, Freedman RS.: Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells. *Journal of Immunology*. 1999, 163: 6251-60.
13. Zavadova E, Loercher A, Verstovsek S, Verschraegen CF, Micksche M, Freedman RS.: The role of macrophages in antitumor defense of patients with ovarian cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*. 1999, 13: 135-44.

14. Mantovani A, Polentarutti N, Peri G, Shavit ZB, Vecchi A, Bolis G, Mangioni C.: Cytotoxicity on tumor cells of peripheral blood monocytes and tumor-associated macrophages in patients with ascites ovarian tumors. *Journal of National Cancer Institute*. 1980, 64: 1307
15. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL.: Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Research*. 1996, 56: 4625-9.
16. Swallow CJ, Murray MP, Guillem JG.: Metastatic colorectal cancer cells induce matrix metalloproteinase release by human monocytes. *Clinical and Experimental Metastasis*. 1996, 14: 3-11.
17. Pollard JW.: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews of Cancer*. 2004, 4: 71-8.
18. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan S-Y, Rocznik S, Shanafelt AB.: The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270: 27348-57.
19. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ.: Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 2000, 96: 34-40.
20. Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K.: Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2000, 6: 3282-9.
21. Kurland JI, Bockman RS, Broxmeyer HE, Moore MA.: Limitation of excessive myelopoiesis by the intrinsic modulation of macrophage-derived prostaglandin E. *Science*. 1978, 199: 552-5.
22. Menetrier-Caux C, Bain C, Favrot MC, Duc A, Blay JY.: Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E2 production by monocytes. *British Journal of Cancer*. 1999, 79: 119-30.
23. Nara K, Odagiri H, Fujii M, Yamanaka Y, Yokoyama M, Morita T, Sasaki M, Kon M, Abo T.: Increased production of tumor necrosis factor and prostaglandin E2 by monocytes in cancer patients and its unique modulation by their plasma. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 1987, 25: 126-32.
24. Davies B, Edwards SW.: Interactions between human monocytes and tumour cells. Monocytes can either enhance or inhibit the growth and survival of K562 cells. *British Journal of Cancer*. 1992, 66: 463-9.

25. Mytar B, Siedlar M, Woloszyn M, Ruggiero I, Pryjma J, Zembala M.: Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. *British Journal of Cancer*. 1999, 79: 737-43.
26. Mantovani A.: Cytotoxic killing of tumour cells by monocytes. In: *Human monocytes*. Ed. Zembala M, Asherson G.: Academic Press, Londyn, 1898, 303.
27. Zembala M, Siedlar M, Marcinkiewicz J, Pryjma J.: Human monocytes are stimulated for nitric oxide release in vitro by some tumor cells but not by cytokines and lipopolysaccharide. *European Journal of Immunology*. 1994, 24: 435-9.
28. Zembala M, Siedlar M, Ruggiero I, Wieckiewicz J, Mytar B, Mattei M, Colizzi V.: The MHC class-II and CD44 molecules are involved in the induction of tumour necrosis factor (TNF) gene expression by human monocytes stimulated with tumour cells. *International Journal of Cancer*. 1994, 56: 269-74.
29. Siedlar M, Marcinkiewicz J, Zembala M.: MHC class I and class II determinants and some adhesion molecules are engaged in the regulation of nitric oxide production in vitro by human monocytes stimulated with colon carcinoma cells. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1995, 77: 380-4.
30. Siedlar M, Mytar B, Krzeszowiak A, Baran J, Hyszko M, Ruggiero I, Wieckiewicz J, Stachura J, Zembala M.: Demonstration of iNOS-mRNA and iNOS in human monocytes stimulated with cancer cells in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*. 1999, 65: 597-604.
31. Fanger MW, Graziano RF, Shen L, Guyre PM.: Fc gamma R in cytotoxicity exerted by mononuclear cells. *Chemical Immunology*. 1989, 47: 214-53.
32. Moutsatsos IK, Davis JM, Wang JL.: Endogenous lectins from cultured cells: subcellular localization of carbohydrate-binding protein 35 in 3T3 fibroblasts. *Journal of Cell Biology*. 1986, 102: 477-83.
33. Salminen E, Kankuri M, Nuutila J, Lilius EM, Pellimiemi TT.: Modulation of IgG and complement receptor expression of phagocytes in kidney cancer patients during treatment with interferon-alpha. *Anticancer Research*. 2001, 21: 2049-55.
34. Uracz W, Pituch-Noworolska A, Zembala M, Popiela T, Czupryna A.: Activated" monocytes in gastric cancer patients. I. Increased Fc receptor expression, antibody-dependent cellular cytotoxicity and NBT reduction. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1982, 104: 181-90.
35. Murali PS, Somasundaram R, Chiplunkar SV, Fakhri AR, Rao RS, Gangal SG.: Monocyte/macrophage functions in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Journal of Oral Pathology Medicine*. 1989, 18: 539-43.
36. Gebhard B, Gnant M, Schutz G, Roka S, Weigel G, Kandioler D, Taucher S, Grunberger T, Roth E, Jakesz R, Spittler A.: Different transendothelial migration behaviour pattern of blood monocytes derived from patients with benign and malignant diseases of the breast. *Anticancer Research*. 2000, 20: 4599-604.

37. Mytar B, Baran J, Gawlicka M, Ruggiero I, Zembala M.: Immunophenotypic changes and induction of apoptosis of monocytes and tumour cells during their interactions in vitro. *Anticancer Research*. 2002, 22: 2789-96.
38. Beller DI, Springer TA, Schreiber RD.: Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *Journal of Experimental Medicine*. 1982, 156: 1000-9.
39. Zhang L, Yoshimura T, Graves DT.: Antibody to Mac-1 or monocyte chemoattractant protein-1 inhibits monocyte recruitment and promotes tumor growth. *Journal of Immunology*. 1997, 158: 4855-61.
40. Jiang Y, Zhu JF, Luscinskas FW, Graves DT.: MCP-1-stimulated monocyte attachment to laminin is mediated by beta 2-integrins. *American Journal of Physiology*. 1994, 267: C1112-8.
41. Grace H, Wong W, Goeddel D.: Tumour necrosis factor. In: *Human monocytes*. Ed. Zembala M, Asherson G.: Academic Press, London 1989
42. Zembala M, Kowalczyk D, Pryjma J, Ruggiero I, Mytar B, Klysik J, Stec WJ.: The role of tumor necrosis factor in the regulation of antigen presentation by human monocytes. *International Immunology*. 1990, 2: 337-42.
43. Krakauer T, Oppenheim JJ.: IL-1 and tumor necrosis factor-alpha each up-regulate both the expression of IFN-gamma receptors and enhance IFN-gamma-induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *Journal of Immunology*. 1993, 150: 1205-11.
44. Sodhi A, Singh RK, Singh SM.: Effect of interferon-gamma priming on the activation of murine peritoneal macrophages to tumoricidal state by cisplatin, IL-1, and tumour necrosis factor (TNF): production of IL-1 and TNF. *Clinical and Experimental Immunology*. 1992, 88: 350-5.
45. Roberts AI, O'Connell SM, Ebert EC.: Intestinal intraepithelial lymphocytes bind to colon cancer cells by HML-1 and CD11a. *Cancer Research*. 1993, 53: 1608-11.
46. Yano S, Sone S, Nishioka Y, Mukaida N, Matsushima K, Ogura T.: Differential effects of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10 and IL-13) on tumoricidal and chemotactic properties of human monocytes induced by monocyte chemotactic and activating factor. *Journal of Leukocyte Biology*. 1995, 57: 303-9.
47. Baj-Krzyworzeka M, Baran J, Szatanek R, Stankiewicz D, Siedlar M, Zembala M.: Prevention and reversal of tumor cell-induced monocyte deactivation by cytokines, purified protein derivative (PPD), and anti-IL-10 antibody. *Cancer Immunology*. 2004, 4: 8.
48. Huang S, Xie K, Bucana CD, Ullrich SE, Bar-Eli M.: Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clinical Cancer Research*. 1996, 2: 1969-79.

49. Germann T, Rude E.: Interleukin 12. *International Archive of Allergy and Immunology*. 1995, 108: 103-112.
50. Esche C, Shurin M, Lotze M.: IL-12. In. *Cytokine Reference*. 2001, 1: 187-203
51. Trinchieri G, Scott P.: The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunology Today*. 1994, 15: 460-3.
52. Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Nagata S, Lotze MT, Tahara H.: Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *Journal of Immunology*. 1999, 163: 583-9.
53. Wiltshcke C, Krainer M, Wagner A, Linkesch W, Zielinski CC.: Influence of in vivo administration of GM-CSF and G-CSF on monocyte cytotoxicity. *Experimental Hematology*. 1995, 23: 402-6.
54. Ohsaka A, Saionji K, Kuwaki T, Takeshima T, Igari J.: Granulocyte colony-stimulating factor administration modulates the surface expression of effector cell molecules on human monocytes. *British Journal of Haematology*. 1995, 89: 465-72.
55. Lanza F, Fietta A, Spisani S, Castoldi GL, Traniello S.: Does a relationship exist between neutrophil myeloperoxidase deficiency and the occurrence of neoplasms? *Journal of Clinical Laboratory Immunology*. 1987, 22: 175-80.
56. Mytar B, Siedlar M, Woloszyn M, Colizzi V, Zembala M.: Cross-talk between human monocytes and cancer cells during reactive oxygen intermediates generation: the essential role of hyaluronan. *International Journal of Cancer*. 2001, 94: 727-32.
57. Stuehr DJ, Nathan CF.: Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1989, 169: 1543-55.
58. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM.: Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1999, 1411: 385-400.
59. Brown GC.: Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochemical and Biophysical Acta*. 2001, 1504: 46-57.
60. Brown GC, Borutaite V.: Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life*. 2001, 52: 189-95.
61. Kurzawa H, Wysocka M, Aruga E, Chang AE, Trinchieri G, Lee WM.: Recombinant interleukin 12 enhances cellular immune responses to vaccination only after a period of suppression. *Cancer Research*. 1998, 58: 491-9.
62. Koblisch HK, Hunter CA, Wysocka M, Trinchieri G, Lee WM.: Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon gamma induction of nitric oxide

- synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect. *Journal of Experimental Medicine*. 1998, 188: 1603-10.
63. Denis M.: Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *Journal of Leukocyte Biology*. 1994, 55: 682-4
 64. Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A.: Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *Journal of Infection Disease*. 1993, 167: 1358-63.
 65. Valkovic T, Lucin K, Krstulja M, Dobi-Babic R, Jonjic N.: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human invasive ductal breast cancer. *Pathology in Research Practice*. 1998, 194: 335-40.
 66. Hefler L, Tempfer C, Heinze G, Mayerhofer K, Breitenecker G, Leodolter S, Reinthaller A, Kainz C.: Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in ovarian cancer patients. *British Journal of Cancer*. 1999, 81: 855-9.
 67. Zhang L, Khayat A, Cheng H, Graves DT.: The pattern of monocyte recruitment in tumors is modulated by MCP-1 expression and influences the rate of tumor growth. *Laboratory Investigation*. 1997, 76: 579-90.
 68. Zlotnik A, Yoshie O.: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000, 12: 121-7.
 69. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P.: Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in Immunology*. 2004, 25: 75-84.
 70. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH.: Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 2003, 100: 1885-90
 71. Clore GM, Appella E, Yamada M, Matsushima K, Gronenborn AM.: Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry*. 1990, 29: 1689-96.
 72. Crump MP, Rajarathnam K, Kim KS, Clark-Lewis I, Sykes BD.: Solution structure of eotaxin, a chemokine that selectively recruits eosinophils in allergic inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273: 22471-9.
 73. Loetscher P, Clark-Lewis I.: Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001, 69: 881-4.
 74. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al.: Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*. 1994, 266: 1395-9.
 75. Rossi D, Zlotnik A.: The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology*. 2000, 18:217-42.

76. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B.: Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1996, 184: 963-9.
77. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM.: CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000, 68: 1-8.
78. Balkwill F, Mantovani A.: Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001, 357: 539-45.
79. Luster AD, Rothenberg ME.: Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997 62: 620-33.
80. Luster AD.: Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine*. 1998, 338: 436-45.
81. Lindhout E, Vissers JLM, Figdor CG, Adema GJ.: Chemokines and lymphocyte migration. 1999, 7: 147-52.
82. Mackay CR.: Chemokines: immunology's high impact factors. *Nature Immunology*. 2001, 2: 95-101.
83. Vaddi K, Newton RC.: Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *Journal of Immunology*. 1994, 153: 4721-32.
84. Rollins BJ. w Cytokine Reference. 2001, 1: 1146-60.
85. Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, Ponath PD, Mackay CR.: Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *Journal of Clinical Investigation*. 1997, 99: 178-84.
86. Wu L, LaRosa G, Kassam N, Gordon CJ, Heath H, Ruffing N, Chen H, Humblas J, Samson M, Parmentier M, Moore JP, Mackay CR.: Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *Journal of Experimental Medicine*. 1997, 186: 1373-81.
87. Nibbs RJ, Wylie SM, Pragnell IB, Graham GJ.: Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272: 12495-504.
88. Tsou CL, Gladue RP, Carroll LA, Paradis T, Boyd JG, Nelson RT, Neote K, Charo IF.: Identification of C-C chemokine receptor 1 (CCR1) as the monocyte hemofiltrate C-C chemokine (HCC)-1 receptor. *Journal of Experimental Medicine*. 1998, 188: 603-8.

89. Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, Yoshie O, Gray PW.: Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273: 1764-8.
90. Bernardini G, Hedrick J, Sozzani S, Luini W, Spinetti G, Weiss M, Menon S, Zlotnik A, Mantovani A, Santoni A, Napolitano M.: Identification of the CC chemokines TARC and macrophage inflammatory protein-1 beta as novel functional ligands for the CCR8 receptor. *European Journal of Immunology*. 1998, 28: 582-8.
91. Sherry B, Franchin G. w *Cytokine Reference*. 2001, 1: 1171-213.
92. Adams DH, Lloyd AR.: Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *The Lancet*. 1997, 349: 490-5.
93. Chuluyan HE, Schall TJ, Yoshimura T, Issekutz AC.: IL-1 activation of endothelium supports VLA-4 (CD49d/CD29)-mediated monocyte transendothelial migration to C5a, MIP-1 alpha, RANTES, and PAF but inhibits migration to MCP-1: a regulatory role for endothelium-derived MCP-1. *Journal of Leukocyte Biology*. 1995, 58: 71-9.
94. Fahey TJ 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, Cerami A, Sherry B.: Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *Journal of Immunology*. 1992, 148: 2764-9.
95. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P.: Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995, 270: 1811-5.
96. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR.: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996, 381: 661-6.
97. Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, Krensky AM.: A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *Journal of Immunology*. 1988, 141: 1018-25.
98. Meguro M, Nishimura F, Ohyama H, Takashiba S, Murayama Y, Matsushita S.: Ligation of IFN-gamma-induced HLA-DR molecules on fibroblasts induces RANTES expression via c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cytokine*. 2003, 22: 107-15.
99. Greaves DR, Gordon S.: Macrophage-specific gene expression: current paradigms and future challenges. *International Journal of Hematology*. 2002, 76: 6-15.
100. Payne AS, Cornelius LA.: The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2002, 118: 915-22.
101. Youn BS, Kwon BS. w *Cytokine Reference*. 2001, 1: 1251-8.

102. Wang W, Bacon KB, Oldham ER, Schall TJ.: Molecular cloning and functional characterization of human MIP-1 delta, a new C-C chemokine related to mouse CCF-18 and C10. *Journal of Clinical Immunology*. 1998, 18: 214-22.
103. Hedrick JA, Helms A, Vicari A, Zlotnik A.: Characterization of a novel CC chemokine, HCC-4, whose expression is increased by interleukin-10. *Blood*. 1998, 91: 4242-7.
104. Youn BS, Kwon BS. w *Cytokine Reference*. 2001, 1: 1259-8.
105. Clark-Lewis I, Dewald B, Loetscher M, Moser B, Baggiolini M.: Structural requirements for interleukin-8 function identified by design of analogs and CXC chemokine hybrids. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, 269: 16075-81.
106. Wang D, Richmond A. w *Cytokine Reference*. 2001, 1: 1023-48
107. Geiser T, Dewald B, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M.: The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268: 15419-24.
108. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T.: Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*. 1995, 28: 495-500.
109. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B.: The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 1996, 382: 833-5. Errata w: *Nature* 1996, 384: 288.
110. Chan JR, Hyduk SJ, Cybulsky MI.: Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *Journal of Experimental Medicine*. 2001, 193: 1149-58.
111. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ.: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997, 385: 640-4.
112. Greaves DR, Schall TJ. w *Cytokine Reference*. 2001, 1: 1293-6
113. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O.: Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*. 1997, 91: 521-30.
114. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B.: Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 1993, 362: 248-50.

115. Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T.: Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemoattractant protein 1 production in human monocytes. *Blood*. 1997, 90: 2804-9.
116. Moller AS, Ovstebo R, Westvik AB, Joo GB, Haug KB, Kierulf P.: Effects of bacterial cell wall components (PAMPs) on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and the chemokine receptor CCR2 by purified human blood monocytes. *Journal of Endotoxin Research*. 2003, 9: 349-60.
117. Fantuzzi L, Belardelli F, Gessani S.: Monocyte/macrophage-derived CC chemokines and their modulation by HIV-1 and cytokines: a complex network of interactions influencing viral replication and AIDS pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003, 74: 719-25.
118. Negus RP, Stamp GW, Relf MG, Burke F, Malik ST, Bernasconi S, Allavena P, Sozzani S, Mantovani A, Balkwill FR.: The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 1995, 95: 2391-6.
119. Vicari AP, Caux C.: Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Review*. 2002, 13: 143-54.
120. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE.: The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *Journal of Pathology*. 2002, 196: 254-65.
121. Balkwill F.: Chemokine biology in cancer. *Seminars in Immunology*. 2003, 15: 49-55.
122. Patel J.: The biology of chemokine and their receptors. *Immunology News, Focus*. 2001, 4: 15-6.
123. Murphy PM.: The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annual Review of Immunology*. 1994, 12: 593-633.
124. Patel L, Charlton SJ, Chambers JK, Macphee CH.: Expression and functional analysis of chemokine receptors in human peripheral blood leukocyte populations. *Cytokine*. 2001, 14: 27-36
125. Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Martinez-A C.: Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends in Immunology*. 2001, 22: 612-7.
126. Wong MM, Fish EN.: Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Seminars in Immunology*. 2003, 15: 5-14
127. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, Toran JL, Martinez-A C.: Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO Journal*. 2001, 20: 2497-507.

128. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Manes S, Martinez-A C.: Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annual Review of Immunology*. 2001, 19: 397-421.
129. Mellado M, Vila-Coro AJ, Martinez C, Rodriguez-Frade JM.: Receptor dimerization: a key step in chemokine signaling. *Cellular and Molecular Biology*. (Noisy-le-grand). 2001, 47: 575-82.
130. Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Albar JP, Martinez-A C, Mellado M.: The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proceedings of National Academy of Science USA*. 1999, 96: 3628-33.
131. Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Martin A, Nieto M, Sanchez-Madrid F, Proudfoot AE, Wells TN, Martinez-A C, Mellado M.: Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *Journal of Cell Biology*. 1999, 144: 755-65.
132. Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez-A C, Mellado M.: The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB Journal*. 1999, 13: 1699-710.
133. Zimmermann N, Conkright JJ, Rothenberg ME.: CC chemokine receptor-3 undergoes prolonged ligand-induced internalization. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274: 12611-8.
134. Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, Signoret N, Marsh M, Stangassinger M, Borlat F, Wells TN, Schlondorff D, Proudfoot AE.: Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *Journal of Experimental Medicine*. 1998, 187: 1215-24.
135. Locati M, Riboldi E, Otero K, Martinez FO, Riva F, Perrier P, Baviera S, Signorelli P, Bonocchi R, Allavena P, Sozzani S, Mantovani A.: Regulation of the chemokine system at the level of chemokine receptor expression and signaling activity. *Immunobiology*. 2001, 204: 536-42.
136. Proudfoot AE.: Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature Review in Immunology*. 2002, 2: 106-15. Errata w: *Nature Review of Immunology*. 2002, 2: 215.
137. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD.: Structure-activity relationships of chemokines. *Journal of Leukocyte Biology*. 1995, 57: 703-11.
138. Thelen. M.: Dancing with the tune of chemokine. *Nature Immunology*. 2001, 2: 129-34.
139. Richardson RM, DuBose RA, Ali H, Tomhave ED, Haribabu B, Snyderman R.: Regulation of human interleukin-8 receptor A: identification of a phosphorylation site involved in modulating receptor functions. *Biochemistry*. 1995, 34: 14193-201.

140. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH.: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrinology Review*. 2001, 22: 153-83.
141. Sankaran B, Osterhout J, Wu D, Smrcka AV.: Identification of a structural element in phospholipase C beta2 that interacts with G protein betagamma subunits. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273: 7148-54.
142. Barr AJ, Ali H, Haribabu B, Snyderman R, Smrcka AV.: Identification of a region at the N-terminus of phospholipase C-beta 3 that interacts with G protein beta gamma subunits. *Biochemistry*. 2000, 39: 1800-6.
143. Ward SG, Bacon K, Westwick J.: Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity*. 1998, 9: 1-11.
144. Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R.: Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*. 1997, 275: 394-7.
145. Ma AD, Metjian A, Bagrodia S, Taylor S, Abrams CS.: Cytoskeletal reorganization by G protein-coupled receptors is dependent on phosphoinositide 3-kinase gamma, a Rac guanosine exchange factor, and Rac. *Molecular Cell Biology*. 1998, 18: 4744-51.
146. Zeng L, Sachdev P, Yan L, Chan JL, Trenkle T, McClelland M, Welsh J, Wang LH.: Vav3 mediates receptor protein tyrosine kinase signaling, regulates GTPase activity, modulates cell morphology, and induces cell transformation. *Molecular Cell Biology*. 2000, 20: 9212-24.
147. Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC.: Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science*. 1996, 271: 981-3.
148. Roth I, Hebert C. w *Cytokine Reference*. 2001, 2: 1982-2002.
149. Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ.: Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Current Opinion in Cell Biology*. 1999, 11: 177-83.
150. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ.: Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*. 1999, 283: 655-61.
151. Gadina M, Hilton D, Johnston JA, Morinobu A, Lighvani A, Zhou YJ, Visconti R, O'Shea JJ.: Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Current Opinion in Immunology*. 2001, 13: 363-73.
152. Horuk R. w *Cytokine Reference*. 2001, 2: 2027-39.
153. Su SB, Mukaida N, Wang J, Nomura H, Matsushima K.: Preparation of specific polyclonal antibodies to a C-C chemokine receptor, CCR1, and determination of CCR1

- expression on various types of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996, 60: 658-66.
154. Parker LC, Whyte MK, Vogel SN, Dower SK, Sabroe I.: Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists regulate CCR expression in human monocytic cells. *Journal of Immunology*. 2004, 172: 4977-86.
 155. Fantuzzi L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F, Gessani S.: Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood*. 1999, 94: 875-83.
 156. Kaufmann A, Salentin R, Gemsa D, Sprenger H.: Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 alpha during differentiation of human monocytes to macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001, 69: 248-52.
 157. Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Martinez AC. w Cytokine Reference. 2001, 2: 2041-53.
 158. Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR.: Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proceedings of National Academy of Science USA*. 1994, 91: 2752-6.
 159. Weber C, Draude G, Weber KS, Wubert J, Lorenz RL, Weber PC.: Downregulation by tumor necrosis factor-alpha of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 1999, 145: 115-23.
 160. Sozzani S, Introna M, Bernasconi S, Polentarutti N, Cinque P, Poli G, Sica A, Mantovani A.: MCP-1 and CCR2 in HIV infection: regulation of agonist and receptor expression. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997, 62: 30-3.
 161. Xu L, Khandaker MH, Barlic J, Ran L, Borja ML, Madrenas J, Rahimpour R, Chen K, Mitchell G, Tan CM, DeVries M, Feldman RD, Kelvin DJ.: Identification of a novel mechanism for endotoxin-mediated down-modulation of CC chemokine receptor expression. *European Journal of Immunology*. 2000, 30: 227-35.
 162. Banpain C, Parmentier M. w Cytokine Reference. 2001, 2: 2067-80.
 163. Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, Craig FE, O'Connell P, Tryon V, Clark RA, Dolan MJ, Ahuja SK.: Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nature Medicine*. 1998, 4: 786-93.
 164. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ.: Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Hemophilia Growth and*

- Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996, 273: 1856-62. Errata w: *Science* 1996, 274: 1069.
165. Patterson BK, Czerniewski M, Andersson J, Sullivan Y, Su F, Jiyamapa D, Burki Z, Landay A.: Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes. *Clinical Immunology*. 1999, 91: 254-62.
 166. Tuttle DL, Harrison JK, Anders C, Sleasman JW, Goodenow MM.: Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*. 1998, 72: 4962-9.
 167. Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA.: Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *Journal of Virology*. 1998, 72: 7642-7.
 168. Chuntharapai A, Lee J, Hebert CA, Kim KJ.: Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *Journal of Immunology*. 1994, 153: 5682-8.
 169. Qin S, LaRosa G, Campbell JJ, Smith-Heath H, Kassam N, Shi X, Zeng L, Butcher EC, Mackay CR.: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential. *European Journal of Immunology*. 1996, 26: 640-7.
 170. Moser B. w *Cytokine Reference*. 2001, 2: 2009-18.
 171. Förster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, Bernhardt G, Lipp M.: Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *Journal of Immunology*. 1998, 160: 1522-31.
 172. Gupta SK, Pillarisetti K, Lysko PG.: Modulation of CXCR4 expression and SDF-1alpha functional activity during differentiation of human monocytes and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 1999, 66: 135-43.
 173. Penton-Rol G, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Mancinelli R, Sica A, Sozzani S, Mantovani A.: Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma. *Journal of Immunology*. 1998, 160: 3869-73.
 174. Wegner SA, Ehrenberg PK, Chang G, Dayhoff DE, Sleeker AL, Michael NL.: Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273: 4754-60.
 175. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD.: Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm

- adhesion, and activation under physiologic flow. *Journal of Experimental Medicine*. 1998, 188: 1413-9.
176. Haskell CA, Cleary MD, Charo IF.: Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274: 10053-8.
 177. Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, Chaitchik S, Keydar I, Ben-Baruch A.: Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Research*. 1999, 59: 4681-7.
 178. Strieter RM.: Chemokines: not just leukocyte chemoattractants in the promotion of cancer. *Nature Immunology*. 2001, 2: 285-6.
 179. Gerard C, Rollins BJ.: Chemokines and disease. *Nature Immunology*. 2001, 2: 108-15.
 180. Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, Orringer MB, Whyte RI, Burdick MD, Wilke CA, Strieter RM.: Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *Journal of Experimental Medicine*. 1994, 179: 1409-15.
 181. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G.: Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *Journal of Neurochemistry*. 2002, 82: 1311-29.
 182. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR.: Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Research*. 2002, 62: 5930-8.
 183. Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, Zona GL, Spaziante R, Florio T, Schettini G.: Stromal cell-derived factor 1 alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Research*. 2003, 63: 1969-74.
 184. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M.: Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clinical Cancer Research*. 2000, 6: 3530-5.
 185. Miyamoto M, Shimizu Y, Okada K, Kashii Y, Higuchi K, Watanabe A.: Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 1998, 47: 47-57.
 186. Wang JM, Taraboletti G, Matsushima K, Van Damme J, Mantovani A.: Induction of haptotactic migration of melanoma cells by neutrophil activating protein/interleukin-8. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 1990, 169: 165-70.

187. Youngs SJ, Ali SA, Taub DD, Rees RC.: Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer*. 1997, 71: 257-66.
188. Venkatakrisnan G, Salgia R, Groopman JE.: Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275: 6868-75.
189. Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, Yasui W, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E.: Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *American Journal of Pathology*. 1998, 152: 93-100.
190. Yuan A, Yang PC, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT.: Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000 Nov;162(5):1957-63.
191. Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL.: Role of angiogenic factors: coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. *Laryngoscope*. 1999, 109: 687-93.
192. Ueda T, Shimada E, Urakawa T.: Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *Journal of Gastroenterology*. 1994, 29: 423-9.
193. Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG.: Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *Journal of Experimental Medicine*. 1997, 186: 1201-12.
194. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M.: Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *American Journal of Pathology*. 1997, 151: 1105-13.
195. Bar-Eli M.: Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology*. 1999, 67: 12-8.
196. Richmond A, Thomas HG.: Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution. *Journal of Cell Biochemistry*. 1988, 36: 185-98.
197. Takamori H, Oades ZG, Hoch OC, Burger M, Schraufstatter IU.: Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1. *Pancreas*. 2000, 21: 52-6.
198. Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burdick M, Nirodi C, Beauchamp D, Johnson KN, Richmond A.: Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997, 62: 588-97.

199. Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB, Cardwell N, Luan J, Shattuck-Brandt R, Richmond A.: The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000, 67: 53-62.
200. Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, Wigler N, Keydar I, Ben-Baruch A.: The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Research*. 2002, 62: 1093-102.
201. Mantovani A.: Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Labolatory Investigation*. 1994, 71: 5-16.
202. Opdenakker G, Van Damme J.: Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells. *Immunology Today*. 1992, 13: 463-4.
203. Hemmerlein B, Johanns U, Kugler A, Reffelmann M, Radzun HJ.: Quantification and in situ localization of MCP-1 mRNA and its relation to the immune response of renal cell carcinoma. *Cytokine*. 2001, 13: 227-33.
204. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR.: Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Research*. 2001, 61: 4961-5.
205. Miller LJ, Kurtzman SH, Wang Y, Anderson KH, Lindquist RR, Kreutzer DL.: Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue. *Anticancer Research*. 1998, 18: 77-81.
206. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A.: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001, 410: 50-6.
207. Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM.: IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *Journal of Immunology*. 1993, 151: 2667-75. Errata w: *Journal of Immunology*. 1994, 153: 3360.
208. Mohle R, Schittenhelm M, Failenschmid C, Bautz F, Kratz-Albers K, Serve H, Brugger W, Kanz L.: Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2000, 110: 563-72.
209. Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, Ben-Baruch A.: A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *Journal of Immunology*. 2001, 167: 4747-57.
210. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK.: Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Research*. 2002, 62: 1832-7.

211. Libura J, Drukala J, Majka M, Tomescu O, Navenot JM, Kucia M, Marquez L, Peiper SC, Barr FG, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ.: CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood*. 2002, 100: 2597-606.
212. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M.: Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Research*. 2002, 62: 2937-41.
213. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutierrez JA.: Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2000, 6: 102-11.
214. Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KE, Machtens S, Mengel M, Probst-Kepper M, Franzke A, Wollensak T, Gatzlaff P, Atzpodien J, Buer J, Lauber J.: CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *British Journal of Cancer*. 2002, 86: 1250-6.
215. Kleeff J, Kusama T, Rossi DL, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Buchler MW, Zlotnik A, Korc M.: Detection and localization of Mip-3alpha/LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*. 1999, 81: 650-7.
216. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W.: Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*. 2003, 425: 307-11.
217. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E.: The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Research*. 2003, 63: 3833-9.
218. Sozzani S, Bonecchi R, D'Amico G, Luini W, Bernasconi S, Allavena P, Mantovani A.: Old and new chemokines. Pharmacological regulation of chemokine production and receptor expression: mini-review. *Journal of Hemotherapy*. 1998, 10: 142-5.
219. Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Bernasconi S, Allavena P, Gaetano B, Fei F, LaRosa G, Scotton C, Balkwill F, Mantovani A.: Defective expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma. *Journal of Immunology*. 2000, 164: 733-8.
220. Hakomori S.: Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Research*. 1996, 56: 5309-18.
221. Young WW Jr, Borgman CA, Wolock DM.: Modes of shedding of glycosphingolipids from mouse lymphoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1986, 261: 2279-83.
222. Szafran H, Knapik-Czajka M.: Podstawy biochemiczne gospodarki lipidowej organizmu człowieka. 1994, 43-62

223. Usuki S, Lyu SC, Sweeley CC.: Sialidase activities of cultured human fibroblasts and the metabolism of GM3 ganglioside. *Journal of Biological Chemistry*. 1988, 263: 6847-53.
224. Bremer EG, Hakomori S, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R.: Ganglioside-mediated modulation of cell growth, growth factor binding, and receptor phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 1984, 259: 6818-25.
225. Hakomori S.: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annual Review of Biochemistry*. 1981, 50: 733-64.
226. Birkle S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J.: Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*. 2003, 85: 455-63.
227. Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A, Handa K, Hakomori S.: GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273: 9130-8.
228. Kiguchi K, Henning-Chubb CB, Huberman E.: Glycosphingolipid patterns of peripheral blood lymphocytes, monocytes, and granulocytes are cell specific. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. 1990, 107: 8-14.
229. Floutsis G, Ulsh L, Ladisch S.: Immunosuppressive activity of human neuroblastoma tumor gangliosides. *International Journal of Cancer*. 1989, 43: 6-9.
230. Hoon DS, Irie RF, Cochran AJ.: Gangliosides from human melanoma immunomodulate response of T cells to interleukin-2. *Cellular Immunology*. 1988, 111: 410-9.
231. Ladisch S, Gillard B, Wong C, Ulsh L.: Shedding and immunoregulatory activity of YAC-1 lymphoma cell gangliosides. *Cancer Research*. 1983, 43: 3808-13.
232. Bernhard H, Meyer zum Buschenfelde KH, Dippold WG.: Ganglioside GD3 shedding by human malignant melanoma cells. *International Journal of Cancer*. 1989, 44: 155-60.
233. Li RX, Ladisch S.: Shedding of human neuroblastoma gangliosides. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1991, 1083: 57-64.
234. Portoukalian J, David MJ, Gain P, Richard M.: Shedding of GD2 ganglioside in patients with retinoblastoma. *International Journal of Cancer*. 1993, 53: 948-51.
235. Cheresch DA, Honsik CJ, Staffileno LK, Jung G, Reisfeld RA.: Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytotoxicity. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 1985, 82: 5155-9.
236. Portoukalian J, David MJ, Shen X, Richard M, Dubreuil C.: Tumor size-dependent elevations of serum gangliosides in patients with head and neck carcinomas. *Biochemistry International*. 1989, 18: 759-65.

237. Sietsma H, Nijhof W, Dontje B, Vellenga E, Kamps WA, Kok JW.: Inhibition of hemopoiesis in vitro by neuroblastoma-derived gangliosides. *Cancer Research*. 1998, 58: 4840-4.
238. Ritter G, Livingston PO.: Ganglioside antigens expressed by human cancer cells. *Seminars in Cancer Biology*. 1991, 2: 401-9.
239. Chang F, Li R, Ladisch S.: Shedding of gangliosides by human medulloblastoma cells. *Experimental Cell Research*. 1997, 234: 341-6.
240. Merritt WD, Der-Minassian V, Reaman GH.: Increased GD3 ganglioside in plasma of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1994, 8: 816-22.
241. Novikov AM, Kozlov AM, Bassalyk LS.: Selective shedding of gangliosides by cells of mouse ascitic sarcoma-37. *Biulletin Eksperimentalnoi Biologii Meditsiny*. 1986, 102: 229-31.
242. Ladisch S, Li R, Olson E.: Ceramide structure predicts tumor ganglioside immunosuppressive activity. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 1994, 91: 1974-8.
243. Olshefski R, Ladisch S.: Synthesis, shedding, and intercellular transfer of human medulloblastoma gangliosides: abrogation by a new inhibitor of glucosylceramide synthase. *Journal of Neurochemistry*. 1998, 70: 467-72.
244. Heitger A, Ladisch S.: Gangliosides block antigen presentation by human monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996, 1303: 161-8.
245. Gonwa TA, Westrick MA, Macher BA.: Inhibition of mitogen- and antigen-induced lymphocyte activation by human leukemia cell gangliosides. *Cancer Research*. 1984, 44: 3467-70.
246. Chu JW, Sharom FJ.: Gangliosides interact with interleukin-4 and inhibit interleukin-4-stimulated helper T-cell proliferation. *Immunology*. 1995, 84: 396-403.
247. Bergelson LD, Dyatlovitskaya EV, Klyuchareva TE, Kryukova EV, Lemenovskaya AF, Matveeva VA, Sinitsyna EV.: The role of glycosphingolipids in natural immunity. Gangliosides modulate the cytotoxicity of natural killer cells. *European Journal of Immunology*. 1989, 19: 1979-83.
248. Zhou J, Shao H, Cox NR, Baker HJ, Ewald SJ.: Gangliosides enhance apoptosis of thymocytes. *Cellular Immunology*. 1998, 183: 90-8.
249. Massa PT.: Specific suppression of major histocompatibility complex class I and class II genes in astrocytes by brain-enriched gangliosides. *Journal of Experimental Medicine*. 1993, 178: 1357-63.
250. Ziegler-Heitbrock HW, Kafferlein E, Haas JG, Meyer N, Strobel M, Weber C, Flieger D.: Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes. *Journal of Immunology*. 1992, 148: 1753-8.

251. Caldwell S, Heitger A, Shen W, Liu Y, Taylor B, Ladisch S.: Mechanisms of ganglioside inhibition of APC function. *Journal of Immunology*. 2003, 171: 1676-83.
252. Satoh M, Handa K, Saito S, Tokuyama S, Ito A, Miyao N, Orikasa S, Hakomori S.: Disialosyl galactosylgloboside as an adhesion molecule expressed on renal cell carcinoma and its relationship to metastatic potential. *Cancer Research*. 1996, 56: 1932-8.
253. Taki T, Ishikawa D, Ogura M, Nakajima M, Handa S.: Ganglioside GD1alpha functions in the adhesion of metastatic tumor cells to endothelial cells of the target tissue. *Cancer Research*. 1997, 57: 1882-8.
254. McKallip R, Li R, Ladisch S.: Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *Journal of Immunology*. 1999, 163: 3718-26.
255. Yates AJ, Rampersaud A.: Sphingolipids as receptor modulators. An overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998, 845: 57-71.
256. Siedlar M, Stachura J, Szczepanik A, Popiela T, Mattei M, Vendetti S, Colizzi V, Zembala M.: Characterization of human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential in SCID mice. *Invasion and Metastasis*. 1995, 15: 60-9.
257. Schlesinger HR, Gerson JM, Moorhead PS, Maguire H, Hummeler K.: Establishment and characterization of human neuroblastoma cell lines. *Cancer Research*. 1976, 36: 3094-100.
258. Ziegler-Heitbrock HW, Burger R.: Rapid removal of mycoplasma from cell lines mediated by a direct effect of complement. *Experimental Cell Research*. 1987, 173: 388-94.
259. Deng W, Li R, Ladisch S.: Influence of cellular ganglioside depletion on tumor formation. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000, 92: 912-7.
260. Chomczynski P, Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987, 162: 156-9.
261. Rothe G, Valet G.: Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*. 1990, 47: 440-8.
262. Kaucic K, Etue N, LaFleur B, Woods W, Ladisch S.: Neuroblastomas of infancy exhibit a characteristic ganglioside pattern. *Cancer*. 2001, 91: 785-93.
263. Mytar B, Woloszyn M, Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Ruggiero I, Wieckiewicz J, Zembala M.: Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003, 74: 1094-101.
264. Valentino L, Moss T, Olson E, Wang HJ, Elashoff R, Ladisch S.: Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. *Blood*. 1990, 75: 1564-7.

265. Monti P, Leone BE, Marchesi F, Balzano G, Zerbi A, Scaltrini F, Pasquali C, Calori G, Pessi F, Sperti C, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L.: The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. *Cancer Research*. 2003, 63: 7451-61.
266. Shaposhnikova GI, Prokazova NV, Buznikov GA, Zvezdina ND, Teplitz NA, Bergelson LD.: Shedding of gangliosides from tumor cells depends on cell density. *European Journal of Biochemistry*. 1984, 140: 567-70.
267. Shurin GV, Shurin MR, Bykovskaia S, Shogan J, Lotze MT, Barksdale EM Jr.: Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Research*. 2001, 61: 363-9.
268. Wolfl M, Batten WY, Posovszky C, Bernhard H, Berthold F.: Gangliosides inhibit the development from monocytes to dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2002, 130: 441-8.
269. Ladisch S, Ulsh L, Gillard B, Wong C.: Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. *Journal of Clinical Investigation*. 1984, 74: 2074-81.
270. Grayson G, Ladisch S.: Immunosuppression by human gangliosides. II. Carbohydrate structure and inhibition of human NK activity. *Cell Immunology*. 1992, 139: 18-29.
271. Kudo D, Rayman P, Horton C, Cathcart MK, Bukowski RM, Thornton M, Tannenbaum C, Finke JH.: Gangliosides expressed by the renal cell carcinoma cell line SK-RC-45 are involved in tumor-induced apoptosis of T cells. *Cancer Research*. 2003, 63: 1676-83.
272. Milliken D, Scotton C, Raju S, Balkwill F, Wilson J.: Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites. *Clinical Cancer Research*. 2002, 8: 1108-14.
273. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW.: Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000, 67: 699-704.
274. Zou JP, Shimizu J, Ikegame K, Yamamoto N, Ono S, Fujiwara H, Hamaoka T.: Tumor-bearing mice exhibit a progressive increase in tumor antigen-presenting cell function and a reciprocal decrease in tumor antigen-responsive CD4+ T cell activity. *Journal of Immunology*. 1992, 148: 648-55.
275. Tan IB, Drexhage HA, Scheper RJ, von Blomberg-van der Flier BM, de Haan-Meulman M, Snow GB, Balm AJ.: Defective monocyte chemotaxis in patients with head and neck cancer. Restoration after treatment. *Archives of Otolaryngology Head Neck Surgery*. 1986, 112: 541-4.

276. Nielsen H, Bennedsen J, Larsen SO, Rhodes JM, Viskum K.: Defective monocyte chemotaxis in pulmonary tuberculosis. *European Journal of Respiratory Diseases*. 1982, 63: 122-9.
277. Akiyoshi T, Koba F, Kawaguchi M, Miyazaki S, Tsuji H.: Indirect macrophage migration inhibition response to 3-M KCl extract of gastric carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1982, 69: 345-7.
278. Snyderman R, Meadows L, Holder W, Wells S Jr.: Abnormal monocyte chemotaxis in patients with breast cancer: evidence for a tumor-mediated effect. *Journal of the National Cancer Institute*. 1978, 60: 737-40.
279. Hausman MS, Brosman S, Snyderman R, Mickey MR, Fahey J.: Defective monocyte function in patients with genitourinary carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1975, 55: 1047-54.
280. Snyderman R, Seigler HF, Meadows L.: Abnormalities of monocyte chemotaxis in patients with melanoma: effects of immunotherapy and tumor removal. *Journal of the National Cancer Institute*. 1977, 58: 37-41.
281. Zeidler R, Csanady M, Gires O, Lang S, Schmitt B, Wollenberg B.: Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1. *FASEB Journal*. 2000, 14: 661-8.
282. Bruhl H, Cohen CD, Linder S, Kretzler M, Schlondorff D, Mack M.: Post-translational and cell type-specific regulation of CXCR4 expression by cytokines. *European Journal of Immunology*. 2003, 33: 3028-37.
283. Siedlar M, Szaflarska A, Szczepanik A, Ruggiero I, Frankenberger M, Szatanek R, Czupryna A, Popiela T, Zembala M.: Depressed tumor necrosis factor alpha and interleukin-12p40 production by peripheral blood mononuclear cells of gastric cancer patients: association with IL-1R-associated kinase-1 protein expression and disease stage. *International Journal of Cancer*. 2005, 114: 144-52.
284. Hakomori S, Igarashi Y.: Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *Journal of Biochemistry*. 1995, 118: 1091-103.
285. Kim JY, Goldenring JR, DeLorenzo RJ, Yu RK.: Gangliosides inhibit phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent kinase phosphorylation of rat myelin basic proteins. *Journal of Neuroscience Research*. 1986, 15: 159-66.
286. Cavaillon JM, Fitting C.: Inhibition of lipopolysaccharide-induced monocyte interleukin 1 secretion by gangliosides. *European Journal of Immunology*. 1986, 16: 1009-12.
287. Lenardo MJ, Baltimore D.: NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*. 1989, 58: 227-9.
288. Murphy TL, Cleveland MG, Kulesza P, Magram J, Murphy KM.: Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Molecular Cell Biology*. 1995, 15: 5258-67.

289. Ma X, Aste-Amezaga M, Gri G, Gerosa F, Trinchieri G.: Immunomodulatory functions and molecular regulation of IL-12. *Chemical Immunology*. 1997, 68: 1-22.
290. Kanda N, Tamaki K.: Ganglioside GT1b suppresses immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*. 1999, 96: 628-33.
291. Bondeson J, Browne KA, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M.: Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IkappaBalpha into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-kappaB independent. *Journal of Immunology*. 1999, 162: 2939-45.
292. Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM.: Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Immunology*. 1998, 160: 920-8.
293. Merendino RA, Gangemi S, Misefari A, Arena A, Capozza AB, Chillemi S, D'Ambrosio FP.: Interleukin-12 and interleukin-10 production by mononuclear phagocytic cells from breast cancer patients. *Immunology Letters*. 1999, 68: 355-8.
294. Hoffman T, Brando C, Lizzio EF, Lee C, Hanson M, Ting K, Kim YJ, Abrahamsen T, Puri J, Bonvini E.: Functional consequences of phospholipase A2 activation in human monocytes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1990, 279: 125-36.
295. Yoong KF, Afford SC, Jones R, Aujla P, Qin S, Price K, Hubscher SG, Adams DH.: Expression and function of CXC and CC chemokines in human malignant liver tumors: a role for human monokine induced by gamma-interferon in lymphocyte recruitment to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1999, 30: 100-11.
296. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ.: Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *Journal of Experimental Medicine*. 1989, 169: 1449-59.
297. Van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G.: Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *Journal of Experimental Medicine*. 1992, 176: 59-65.
298. Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, Kunkel SL, Morris SB, Xue YY, Burdick MD, Glass MC, Iannettoni MD, Strieter RM.: Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *Journal of Clinical Investigation*., 1998, 102: 465-72.
299. Dhawan P, Richmond A.: Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002, 72: 9-18.
300. Standiford TJ, Kunkel SL, Lukacs NW, Greenberger MJ, Danforth JM, Kunkel RG, Strieter RM.: Macrophage inflammatory protein-1 alpha mediates lung leukocyte

- recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. *Journal of Immunology*. 1995, 155: 1515-24.
301. Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF.: Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *Journal of Immunology*. 1995, 155: 4412-8.
 302. Berkman N, John M, Roesems G, Jose P, Barnes PJ, Chung KF.: Interleukin 13 inhibits macrophage inflammatory protein-1 alpha production from human alveolar macrophages and monocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1996, 15: 382-9.
 303. Berkman N, Jose PJ, Williams TJ, Schall TJ, Barnes PJ, Chung KF.: Corticosteroid inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes and alveolar macrophages. *American Journal of Physiology*. 1995, 269: L443-52.
 304. Li CY, Chou TC, Lee CH, Tsai CS, Loh SH, Wong CS.: Adrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes: the role of beta-adrenergic receptors. *Anesthesia and Analgesia*. 2003, 96: 518-23.
 305. Mendez-Samperio P, Vazquez A, Ayala H.: Infection of human monocytes with *Mycobacterium bovis* BCG induces production of CC-chemokines. *The Journal of Infection*. 2003, 47: 139-47.
 306. Danforth JM, Strieter RM, Kunkel SL, Arenberg DA, VanOtteren GM, Standiford TJ.: Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in vivo and in vitro: the role of lipoteichoic acid. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1995, 74: 77-83.
 307. Fernandez N, Renedo M, Garcia-Rodriguez C, Sanchez Crespo M.: Activation of monocytic cells through Fc gamma receptors induces the expression of macrophage-inflammatory protein (MIP)-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES. *Journal of Immunology*. 2002, 169: 3321-8.
 308. Sharma V, Xu M, Ritter LM.: Biochemical characterization of MIP-1 alpha nuclear protein. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 1998, 248: 716-21.
 309. Ritter LM, Bryans M, Abdo O, Sharma V, Wilkie NM.: MIP1 alpha nuclear protein (MNP), a novel transcription factor expressed in hematopoietic cells that is crucial for transcription of the human MIP-1 alpha gene. *Molecular Cell Biology*. 1995, 15: 3110-8.

9. TABELE I FIGURY

Tabela 1. Klasyfikacja chemokin i ich receptorów.

Nazwa systematyczna	Nazwa funkcjonalna	Receptor [-y]
Chemokiny CXC		
CXCL1	GRO- α /MGSA- α	CXCR1, CXCR2
CXCL2	GRO- β /MGSA- β	CXCR2
CXCL3	GRO- γ /MGSA- γ	CXCR2
CXCL4	PF-4	nieznany
CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG	CXCR3
CXCL10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	CXCR3
CXCL12	SDF- α/β	CXCR4
CXCL13	BCA-1	CXCR5
CXCL14	BRAK/Bolekine	nieznany
CXCL15	[lungkine] – mysia	nieznany
CXCL16	small inducible cytokine B6	CXCR
Chemokiny C		
XCL1	Lymphotactin	XCR1
XCL2	SCM-1b	XCR1
Chemokiny CX3C		
CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1

Chemokiny CC		
CCL1	I-309	CCR8
CCL2	MCP-1/MCAF	CCR2
CCL3	MIP-1 α /LD78 α	CCR1, CCR 5
CCL3L1	LD78 β duplikacja genu	
CCL4	MIP-1 β	CCR5
CCL4L1	LAG-1 duplikacja genu	CCR1, CCR 3, CCR 5
CCL5	RANTES	CCR1, CCR 2, CCR 3
CCL6	[C-10/MRP-2] mysia	CCR1, CCR 2, CCR 3
CCL7	MCP-3	CCR2, CCR 3, CCR 5
CCL8	MCP-2 [MARC]	CCR1
CCL9/10	[MIP-1 γ /MRP-2] mysia	CCR3
CCL11	Eotaxin	CCR2
CCL12	[MCP-5] mysia	CCR1, CCR 2, CCR 3
CCL13	MCP-4	CCR1
CCL14	HCC-1	CCR1, CCR 3
CCL15	HCC-2/Lkn-1/MIP-1delta/MIP-5	CCR1
CCL16	HCC-4/LEC	CCR4
CCL17	TARC	CCR
CCL18	MIP-4/DC-CK1/PARC/AMAC-1	nieznany
CCL19	MIP-3 β /ELC/Exodus-3	CCR7
CCL20	MIP-3 α /LARC/Exodus-1	CCR6
CCL21	6Ckine/SLC/Exodus-2	CCR7

CCL22	MDC/STCP-1	CCR4
CCL23	MPIF-1/MIP-3/CK β -8	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxin-2	CCR3
CCL25	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	CCR3
CCL27	CTACK/ILC	CCR3, CCR 2, CCR 10
CCL28	MEC	CCR10

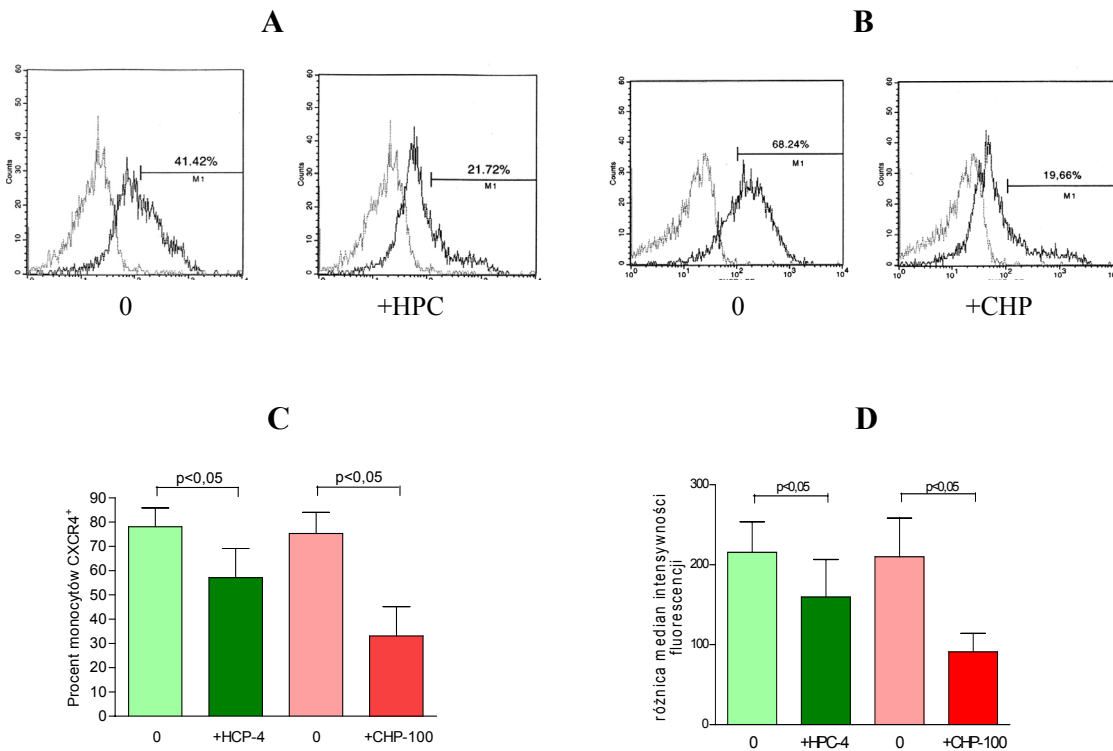


Fig.1. Ekspresja CXCR4 na monocytach po kohodowli z komórkami nowotworowymi.

Monocyty hodowano przez 4 godziny bez (0) lub w obecności komórek nowotworowych HPC-4 lub CHP-100. Analizę cytofluorymetryczną przeprowadzono w oparciu o barwienie powierzchniowe przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD14-FITC i anti-CXCR4-PE. Monocyty odróżniano od komórek nowotworowych na podstawie obecności CD14 i oceniano ekspresję CXCR4 na komórkach CD14⁺.

A i B przedstawia przykładowe dane z pojedynczego eksperymentu.

A - procent monocytów CXCR4⁺ po hodowli bez (0) lub w obecności (+HPC-4) komórek linii HPC-4

B - procent monocytów CXCR4⁺ po hodowli bez (0) lub w obecności (+CHP-100) komórek linii CHP-100

C – procent monocytów wykazujących ekspresję CXCR4. Porównanie średnich (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

D - porównanie średnich różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) dla CXCR4 z trzech reprezentatywnych niezależnych eksperymentów.

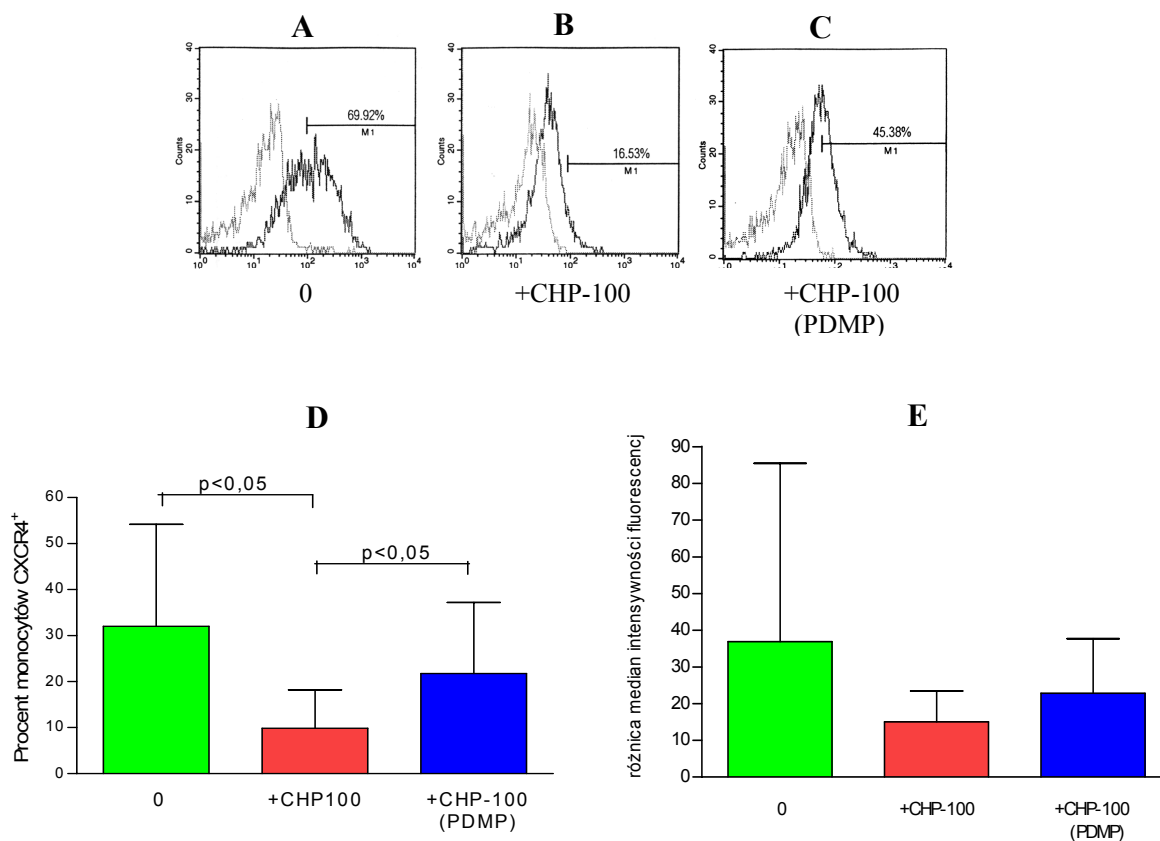


Fig.2. Ekspresja CXCR4 na monocytach po kontakcie z komórkami nowotworowymi z zahamowaną syntezą gangliozydów.

Monocyty inkubowano przez 4 godziny w podłożu (kontrola) lub w obecności komórek nowotworowych CHP-100 hodowanych uprzednio bez lub z PDMP przez 72 godziny. Komórki znakowano przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD14-FITC i anti-CXCR4-PE. Na komórkach CD14⁺ (monocytach) oceniano ekspresję CXCR4. Wyniki przedstawiono jako średnie procenty komórek CXCR4⁺ i różnice median intensywności fluorescencji (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

A, B i C przedstawia przykładową analizę cytometryczną z pojedynczego eksperymentu.

A - monocyty hodowane w podłożu (0)

B - monocyty kohodowane z komórkami linii CHP-100

C - monocyty kohodowane z komórkami linii CHP-100 podanymi uprzednio działaniu PDMP

D - procent komórek wykazujących ekspresję CXCR4. Porównanie średnich (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

E - porównanie średnich różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) CXCR4 z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

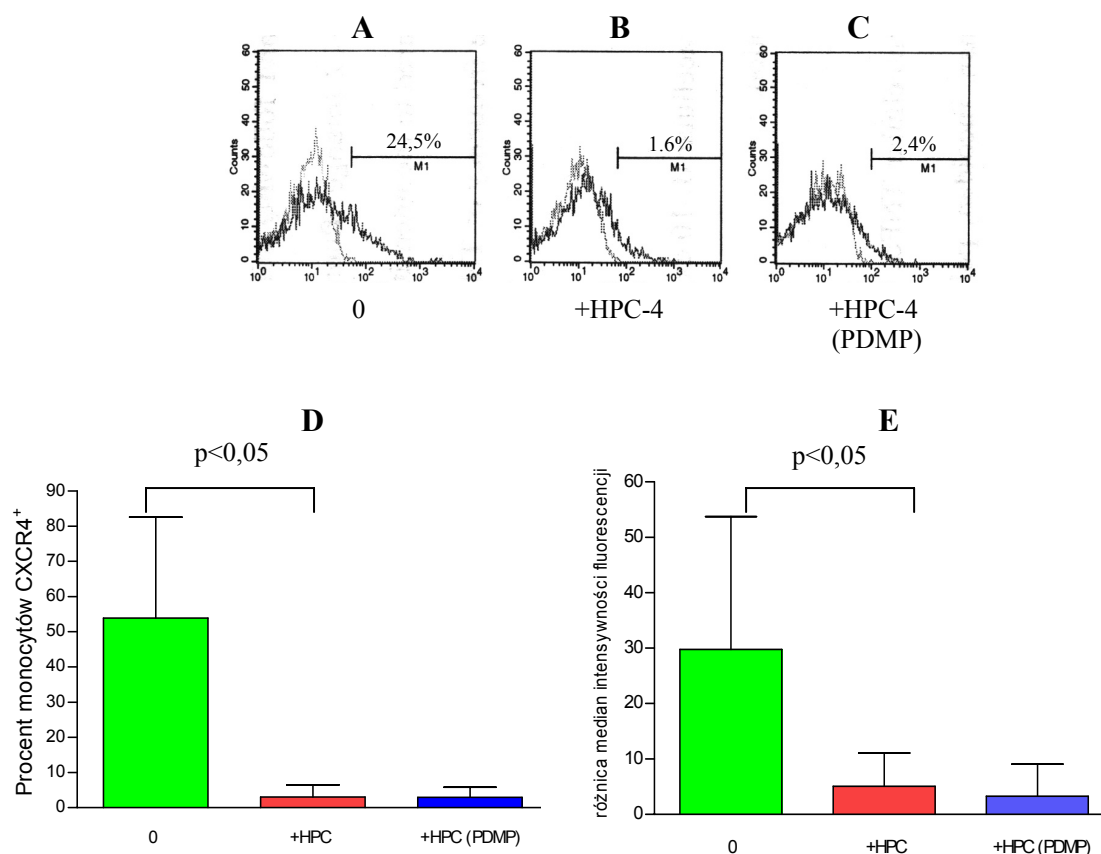


Fig.3. Ekspresja CXCR4 na monocytach po kontakcie z komórkami nowotworowymi z zahamowaną syntezą gangliozydów.

Monocyty inkubowano przez 4 godziny w podłożu (kontrola) lub w obecności komórek nowotworowych HPC-4 hodowanych uprzednio bez lub z PDMP przez 72 godziny. Komórki znakowano przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD14-FITC i anti-CXCR4-PE. Na komórkach CD14⁺ (monocytach) oceniano ekspresję CXCR4. Wyniki przedstawiono jako średnie procenty komórek CXCR4⁺ i średnie różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

A, B i C przedstawia przykładową analizę cytometryczną z pojedynczego eksperymentu.

A - monocyty hodowane w podłożu (0)

B - monocyty kohodowane z komórkami linii HPC-4

C - monocyty kohodowane z komórkami linii HPC-4 podanymi uprzednio działaniu PDMP

D - procent komórek wykazujących ekspresję CXCR4. Porównanie średnich (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

E - porównanie średnich różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) CXCR4 z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

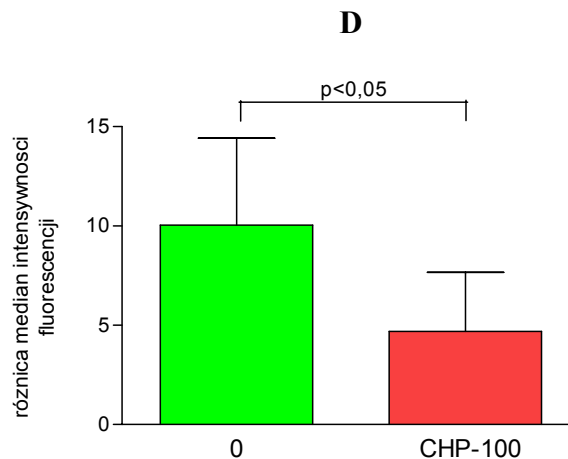
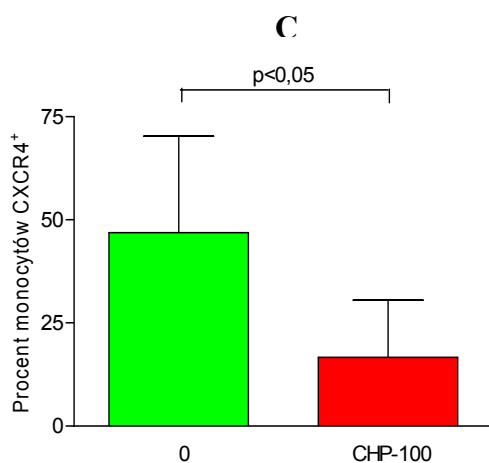
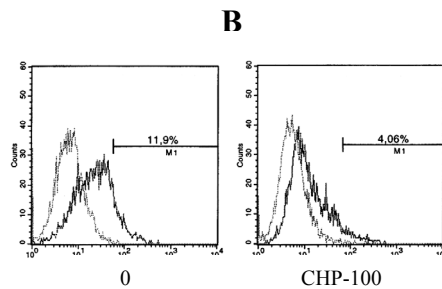
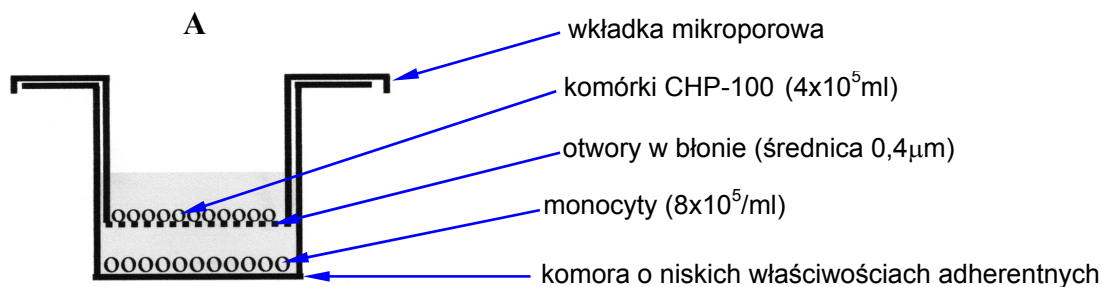


Fig.4. Wpływ komórek nowotworowych CHP-100 hodowanych w komorach typu „transwell” na ekspresję CXCR4 na monocytach

Monocyty hodowano 4 godziny w obecności komórek linii CHP-100 umieszczonych w wkładce mikroporowej nad monocytami. Po hodowli analizowano ekspresję CXCR4 na monocytach.

A - schemat hodowli monocytów i komórek CHP-100 rozdzielonych błoną mikroporową.

B - przykładowe dane z pojedynczego eksperymentu (procent komórek CXCR4 dodatnich).

C - procent monocytów wykazujących ekspresję CXCR4. Porównanie średnich (\pm SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

D - porównanie średnich różnic median intensywności fluorescencji (\pm SD) CXCR4 z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

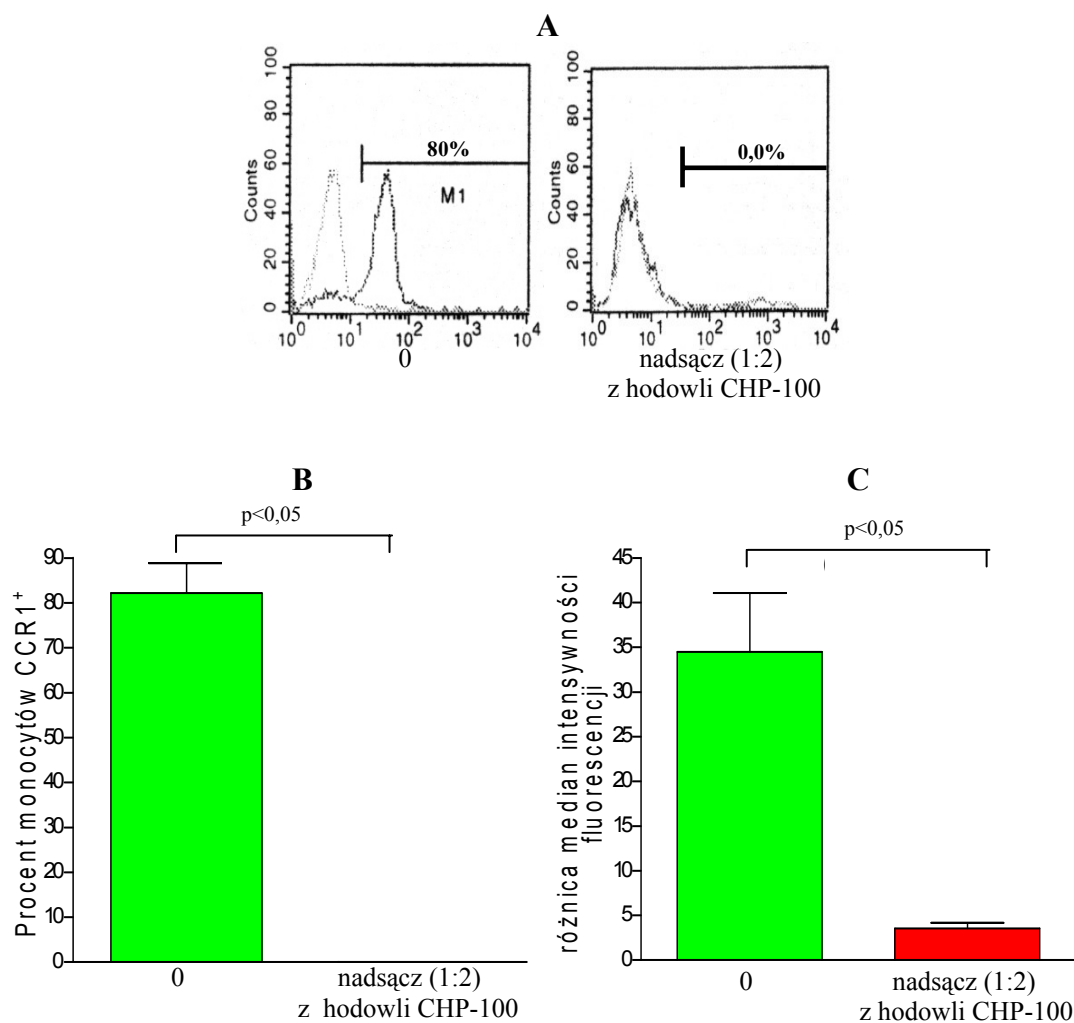


Fig.5. Ekspresja receptora CCR1 na monocytach po 4 godzinnej hodowli w nadsączach z linii komórkowej CHP-100

Monocyty hodowano 4 godziny w podłożu z 50% dodatkiem supernatantu z hodowli komórek CHP-100. Po hodowli analizowano ekspresję CCR1.

A - przykładowe dane z pojedynczego eksperymentu (procent monocytów CCR1 dodatnich).
 B - procent monocytów wykazujących ekspresję CCR1. Porównanie średnich (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.
 C - porównanie średnich różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) CCR1 z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

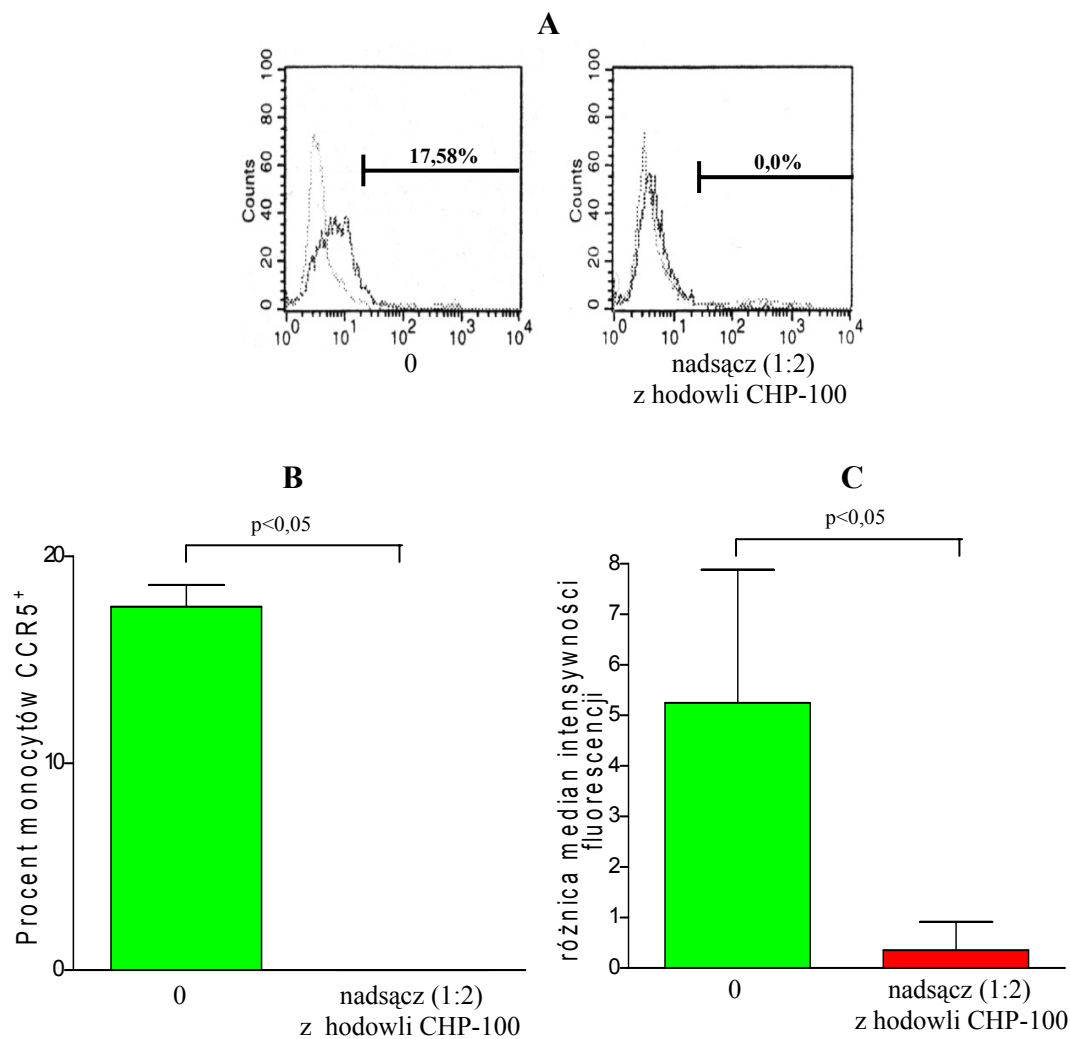


Fig.6. Ekspresja receptora CCR5 na monocytach po 24 godzinnej hodowli w nadsączach z linii komórkowej CHP-100

Monocyty hodowano 24 godziny w podłożu z 50% dodatkiem supernatantu z hodowli komórek CHP-100. Po hodowli analizowano ekspresję CCR5.

A - przykładowe dane z pojedynczego eksperymentu (procent monocytów CCR5 dodatnich).
 B - procent monocytów wykazujących ekspresję CCR5. Porównanie średnich (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

C - porównanie średnich różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) CCR5 z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

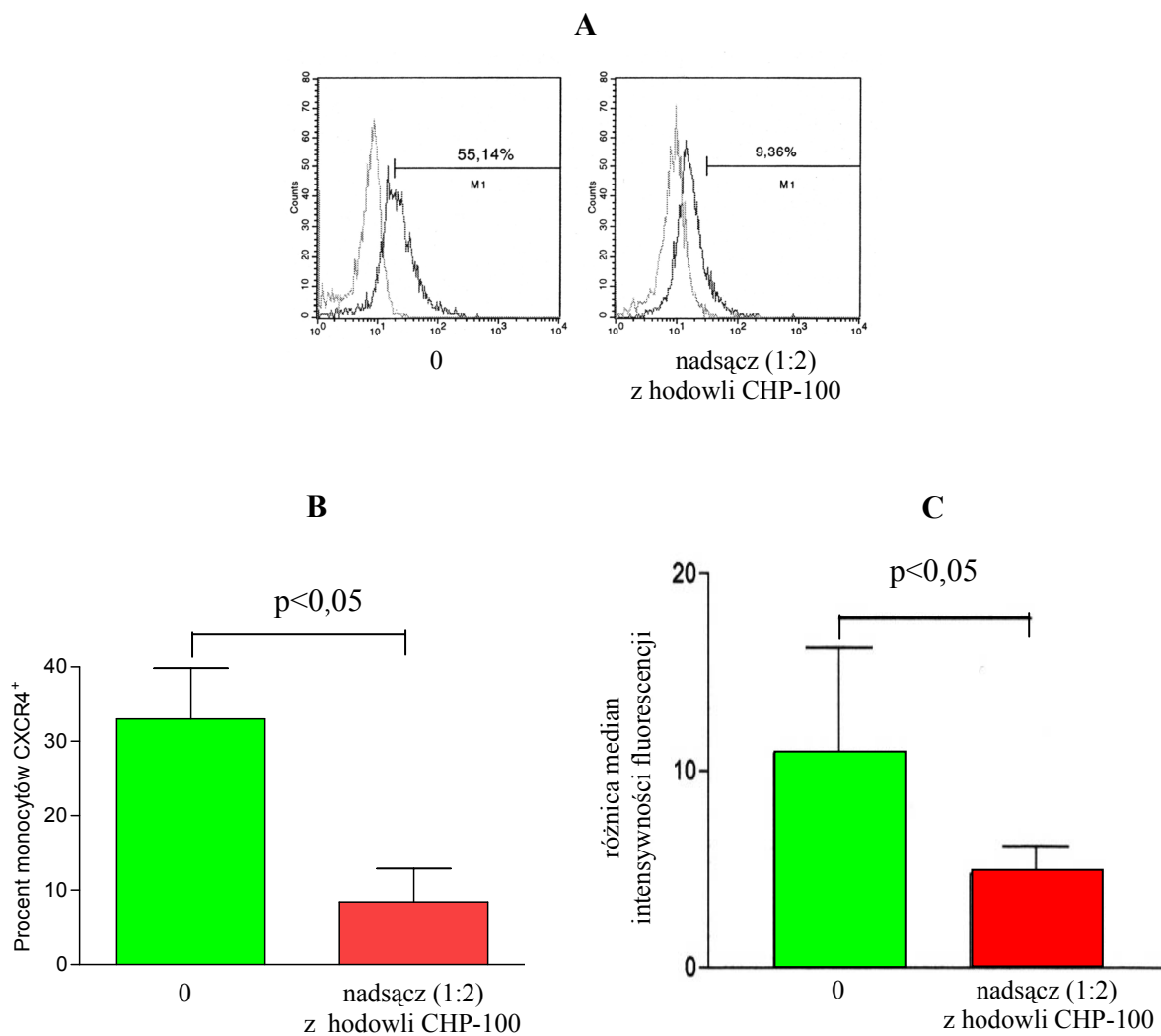


Fig.7. Ekspresja receptora CXCR4 na monocytach po 4 godzinnej hodowli w nadsączach z linii komórkowej CHP-100

Monocyty hodowano 4 godziny w podłożu z 50% dodatkiem supernatantu z hodowli komórek CHP-100. Po hodowli analizowano ekspresję CXCR4.

A - przykładowe dane z pojedynczego eksperymentu (procent monocytów CXCR4 dodatnich).

C - procent monocytów wykazujących ekspresję CXCR4. Porównanie średnich (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

D - porównanie średnich różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) CXCR4 z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

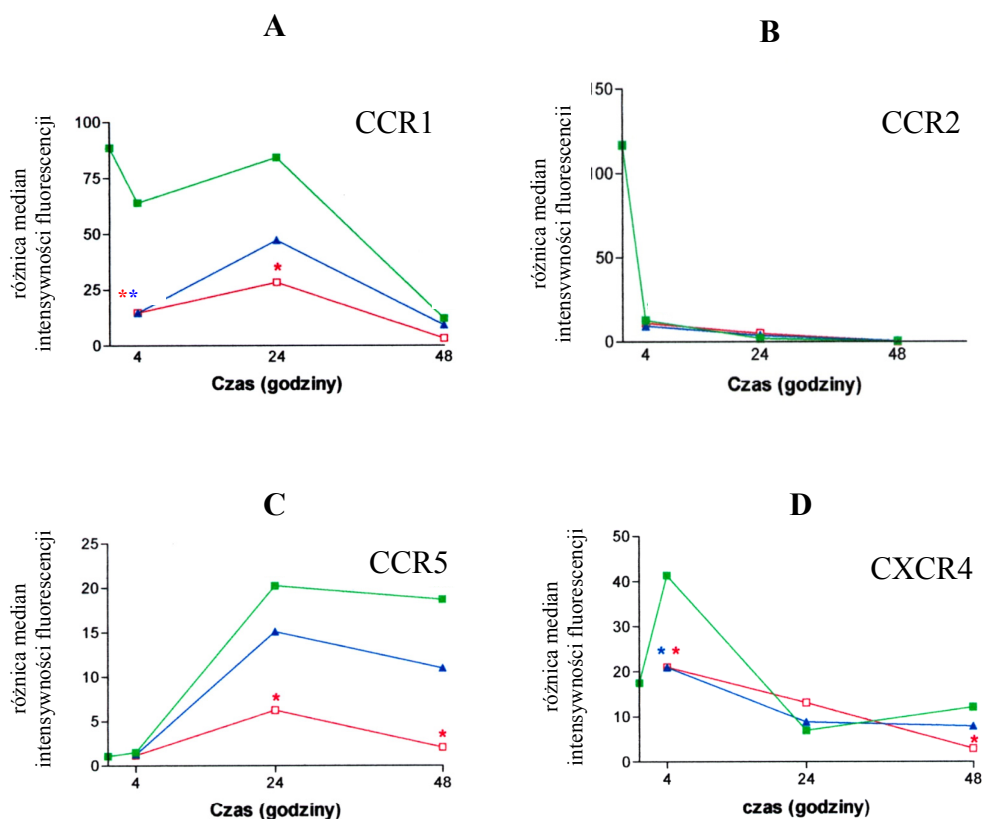


Fig.8. Ekspresja receptorów chemokinowych CCR1, CCR2, CCR5 i CXCR4 na monocytach eksponowanych na mieszaninę gangliozydów (GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}).

Monocyty hodowano 4, 24 i 48 godzin w podłożu (■) lub w obecności mieszaniny gangliozydów o stężeniach 10 (▲) i 100 (□) µg/ml po czym inkubowano ze znakowanymi fikoerytryną przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko receptorom chemokinowym. Wyniki przedstawiono jako średnie różnic median intensywności fluorescencji.

* p<0,05 w porównaniu do kontroli w danym czasie.

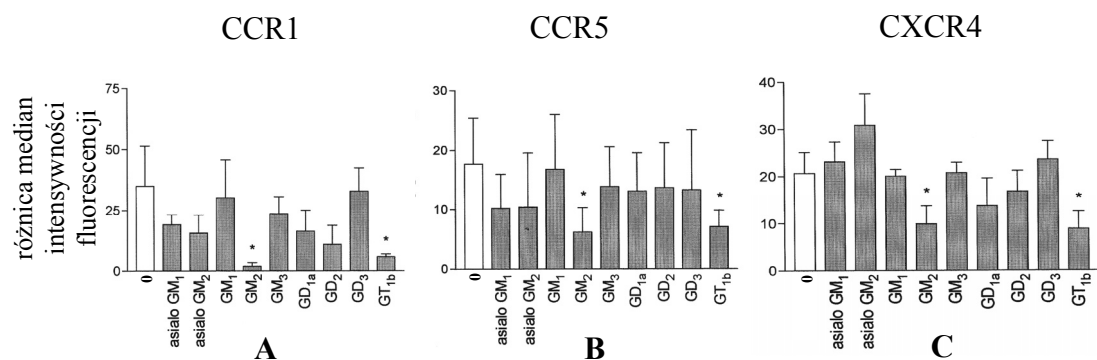


Fig.9. Wpływ różnych typów gangliozydów na ekspresję receptorów chemokinowych na monocytach.

Monocyty hodowano przez 4 lub 24 godziny z wysoko oczyszczonymi gangliozydami o stężeniu 10µg/ml każdy i oznaczano ekspresję CCR1 i CXCR4 po 4 godzinach hodowli (**Fig. 6 A, C**) oraz ekspresję CCR5 po 24 godzinach hodowli (**Fig. 6 B**). Wyniki przedstawiono jako średnie różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

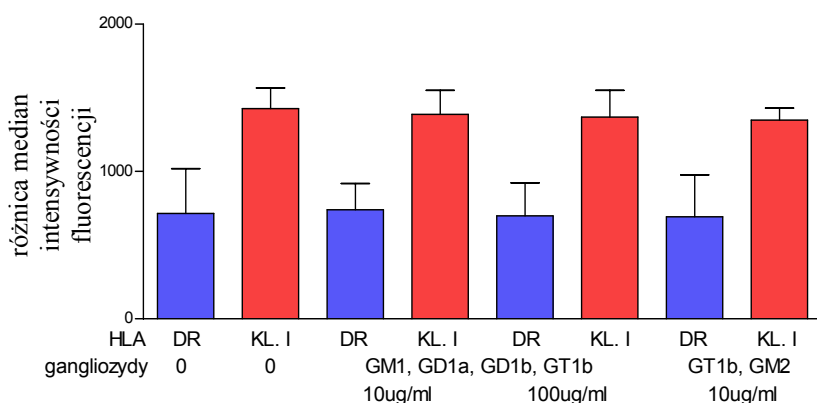


Fig.10. Wpływ rozpuszczalnych gangliozydów na ekspresję antygenów HLA-klasy I i HLA-DR na monocytach.

Monocyty hodowano 4 godziny w podłożu (kontrola), w obecności mieszanki gangliozydów GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} w stężeniach 10 lub 100µg/ml, lub GT_{1b} i GM₂ w stężeniu po 10µg/ml każdy i oznaczano ekspresję HLA klasy I (ABC) i II (DR). Wyniki przedstawiono jako średnie różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

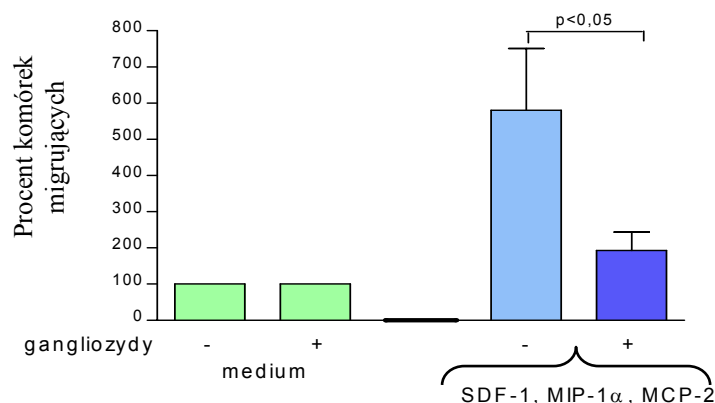


Fig.11. Wpływ gangliozydów na chemotaksję monocytów do SDF-1, MIP-1α i MCP-2

Monocyty preinkubowano 4 godziny w podłożu bez lub z mieszaniną gangliozydów (GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}) w stężeniu 100μg/ml, po czym przeprowadzano 1 godziną chemotaksję monocytów do mieszaniny chemokin SDF-1β, MIP-1α i MCP-2. Liczbę migrujących komórek określano cytometrycznie. Wyniki przedstawiono jako średnią (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

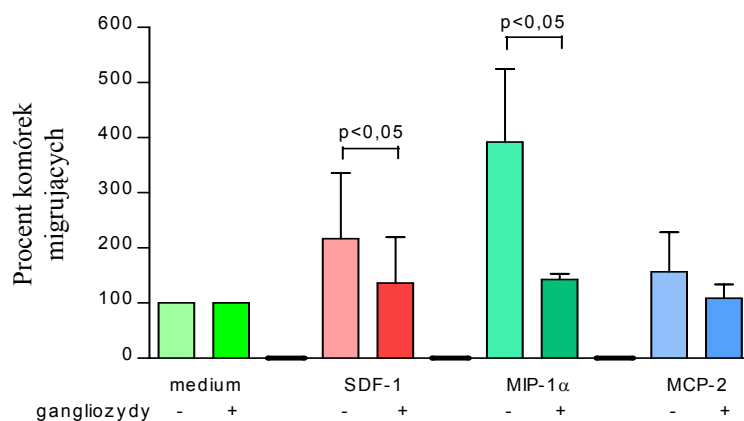


Fig.12. Chemotaksja monocytów do SDF-1, MIP-1α i MCP-2 w obecności gangliozydów GM₂ i GT_{1b}.

Monocyty preinkubowano 4 godziny w podłożu bez lub z gangliozydami (GM₂ i GT_{1b}) w stężeniu 10μg/ml każdy, po czym przeprowadzono 4 godziną chemotaksję monocytów do podłoża z dodatkiem SDF-1β, MIP-1α i MCP-2. Liczbę migrujących komórek określano cytometrycznie. Wyniki przedstawiono jako średnią (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

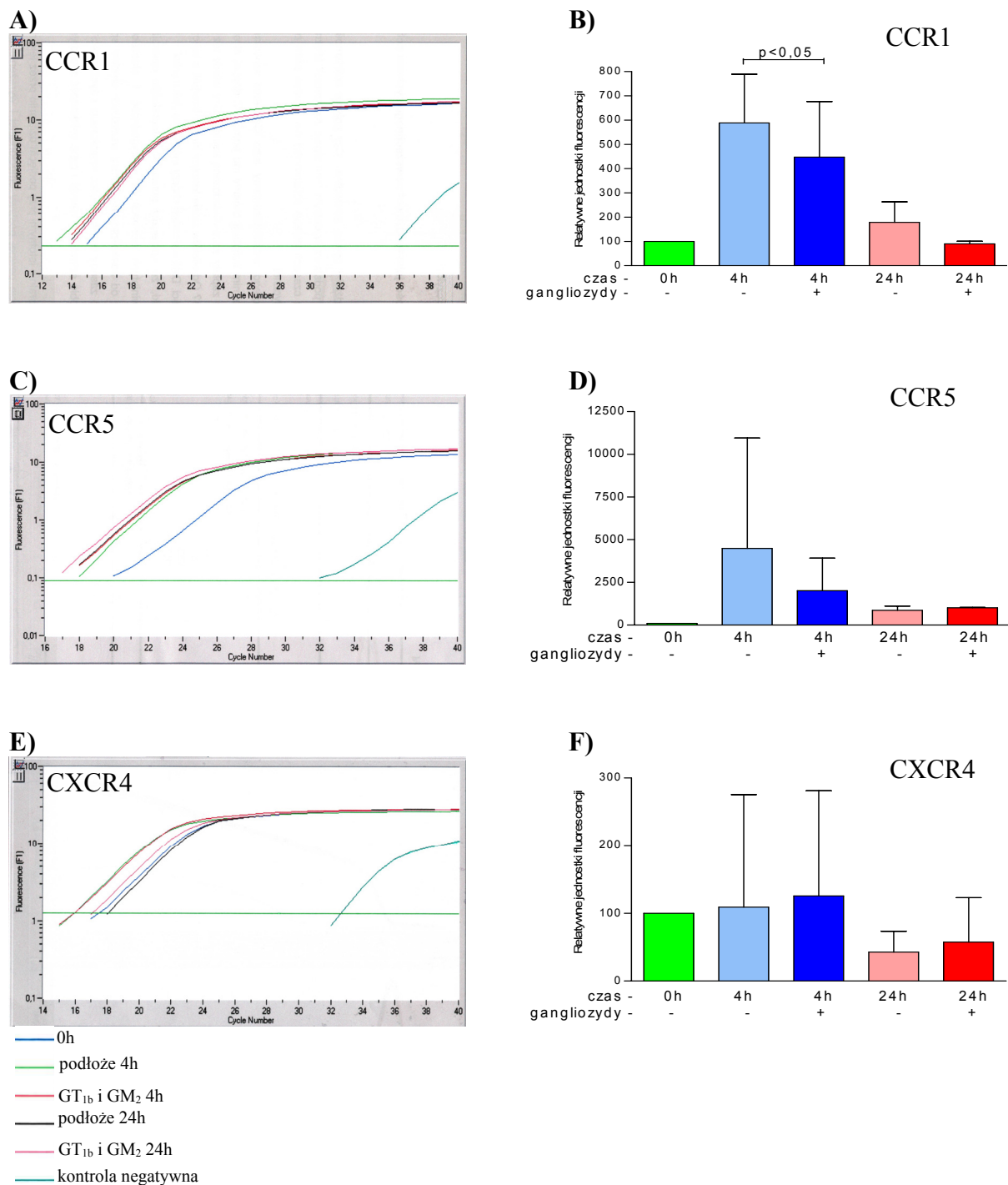


Fig.13. Wpływ gangliozydów na ekspresję mRNA receptorów chemokinowych w monocytach.

Monocyty hodowano 4 i 24 godziny w podłożu (kontrola) lub w obecności gangliozydów GM₂ i GT_{1b}. Następnie z komórek izolowano całkowite RNA i przeprowadzono reakcje RT-PCR i Real Time PCR. Wyniki przedstawiono jako średnie relatywne jednostki fluorescencji. A, C, E - przykładowe dane z pojedynczych eksperymentów. B, D, F - uśrednione dane (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

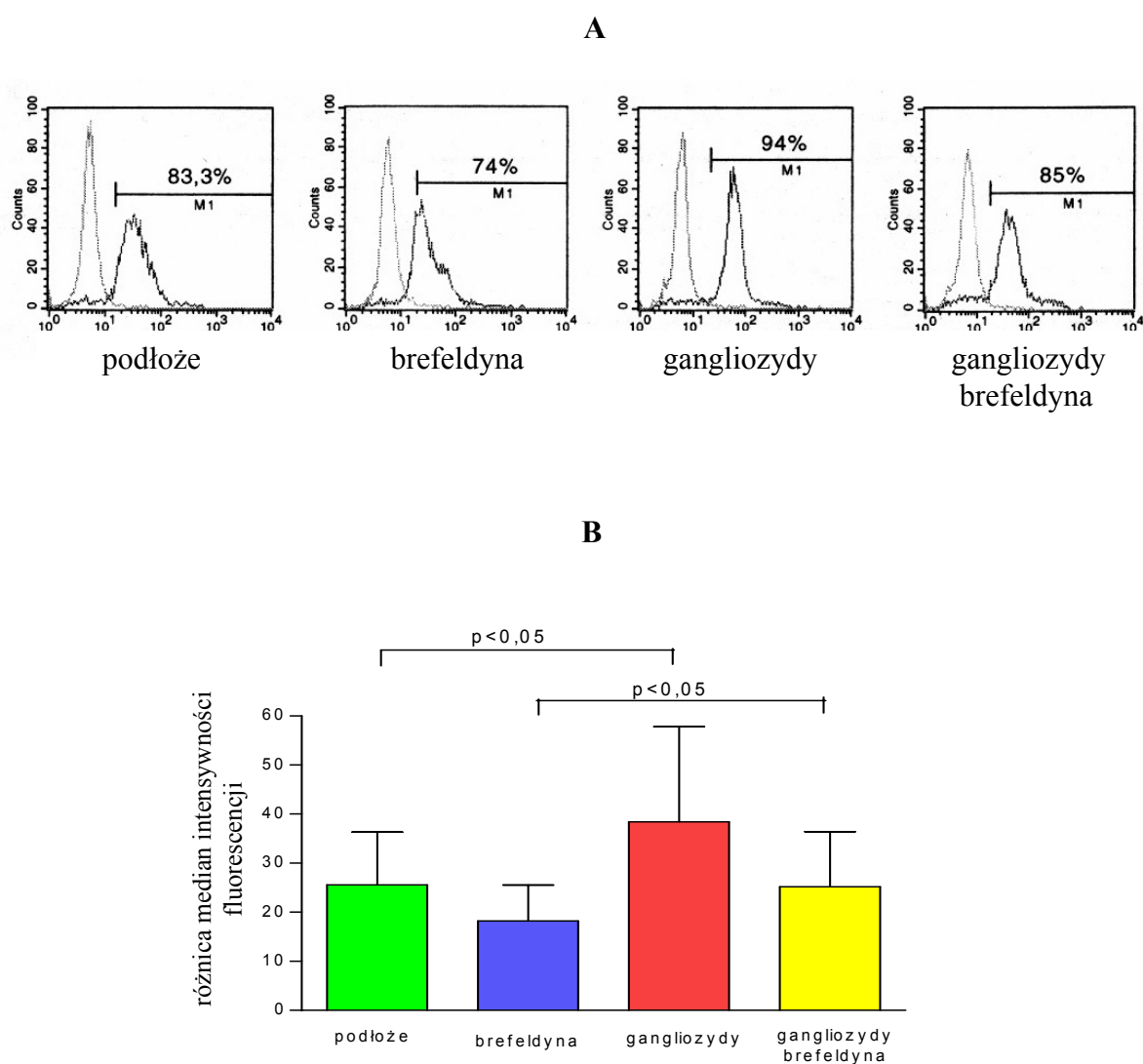


Fig.14. Ekspresja cytoplazmatyczna CXCR4 w monocytach po hodowli w obecności mieszaniny gangliozydów GM₂ i GT_{1b} bez lub w obecności brefeldyny.

Monocyty hodowano 4 godziny bez lub z gangliozydami GM₂ i GT_{1b} w stężeniu 10 μg/ml każdy, w obecności/nieobecności brefeldyny. Następnie oznaczano cytoplazmatyczną ekspresję CXCR4 oraz procent komórek CXCR4⁺. A – procent komórek CXCR4⁺; B – średnie różnic median intensywności fluorescencji (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

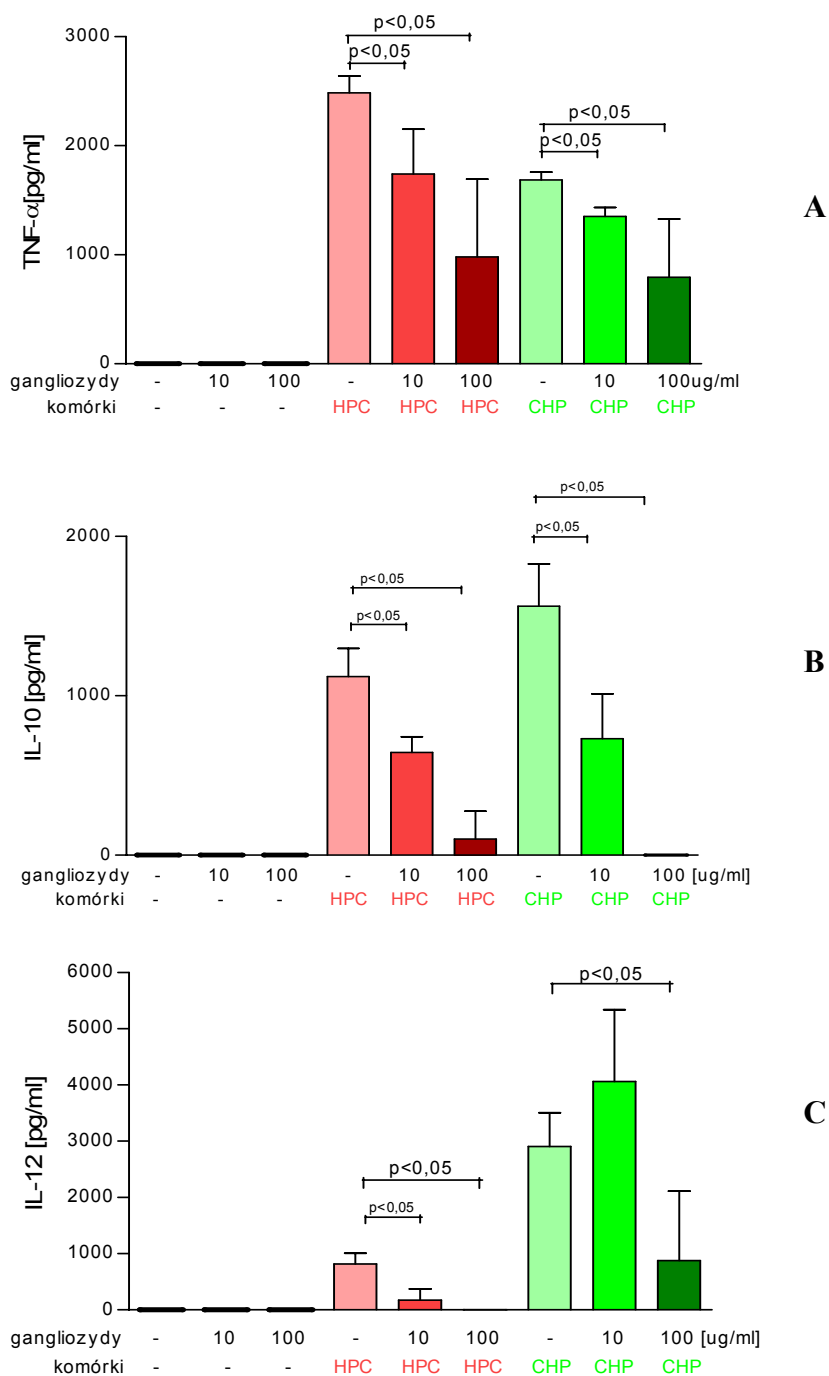


Fig.15. Wpływ gangliozydów na uwalnianie cytokin przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Monocyty preinkubowano 1 godzinę w podłożu bez lub z mieszaniną gangliozydów GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} w stężeniu 10 i 100 μg/ml. Następnie do monocytów dodawano komórki nowotworowe HPC-4 lub CHP-100 i hodowano je 18 godzin. W nadsączach oceniano poziomy stężenia TNFα, IL-12p40 i IL-10 metodą ELISA. Wyniki przedstawiono jako średnie (+/-SD) z trzech reprezentatywnych niezależnych eksperymentów. W supernatancie z hodowli samych komórek nowotworowych nie stwierdzono obecności żadnej z badanych cytokin.

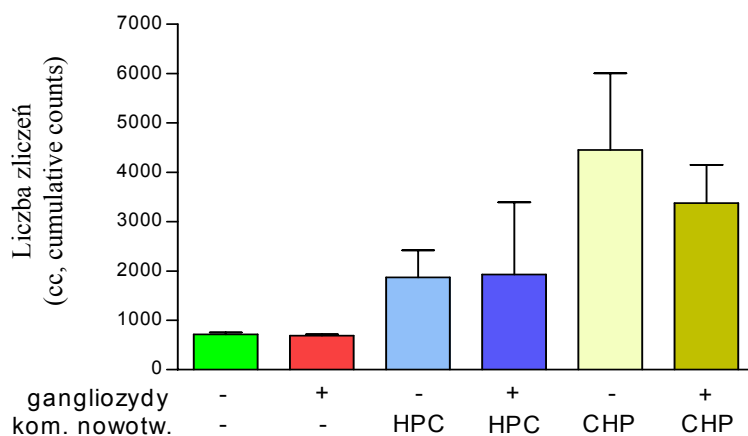


Fig.16. Wpływ gangliozydów na produkcję reaktywnych form tlenu (ROI) przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Monocyty preinkubowano 1 godzinę bez lub z mieszaniną gangliozydów GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} w stężeniu 100μg/ml, po czym dodawano odpowiednio: podłoża, komórki linii HPC-4 lub CHP-100. Czas pomiaru CL wynosił 5 godzin. Wyniki w formie całkowitej liczby zliczeń przedstawiono jako średnie (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.

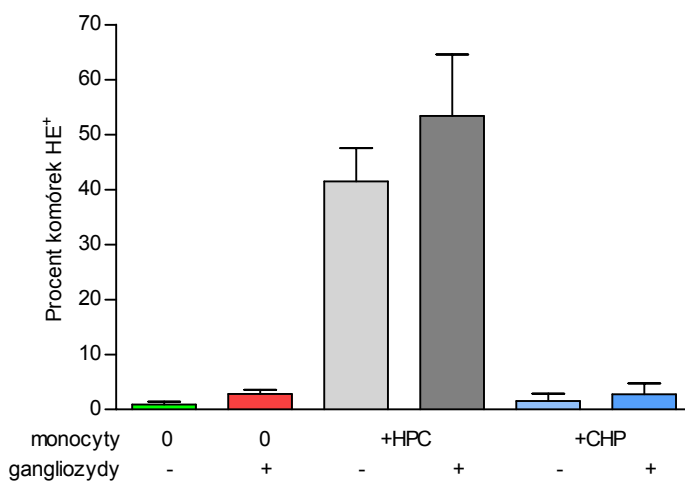
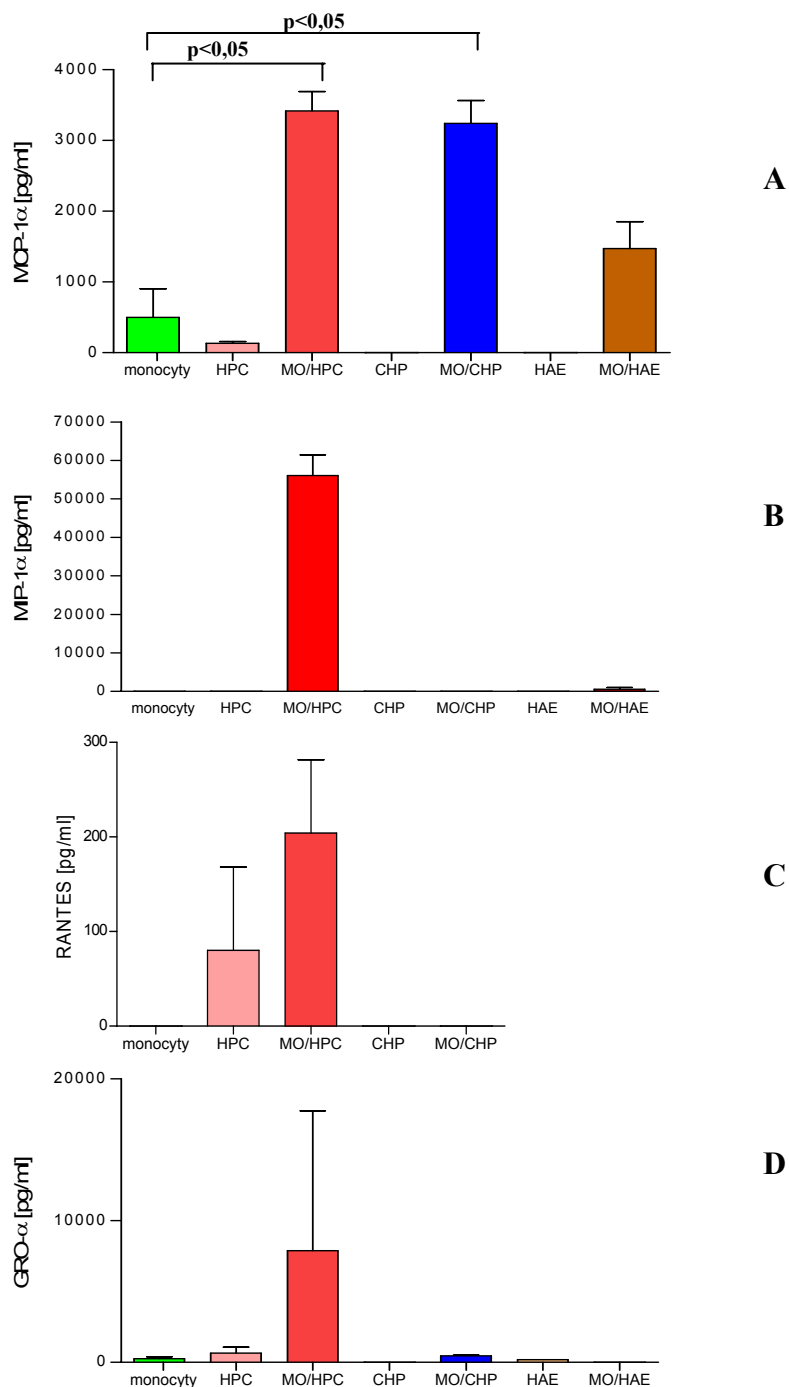


Fig.17. Wpływ gangliozydów na produkcję O₂⁻ przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Monocyty barwiono przeciwciałem anty CD14-FITC i preinkubowano 1 godzinę w medium bez/z mieszaniną gangliozydów GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} w stężeniu 100μg/ml. Następnie monocyty inkubowano z hydroetydyną (15 min.), po czym aktywowano komórkami nowotworowymi linii HPC-4 lub CHP-100 (2 godziny) i poddawano analizie cytofluorymetrycznej. Wyniki przedstawiono jako średni procent komórek produkujących O₂⁻ (+/- SD) z trzech reprezentatywnych, niezależnych eksperymentów.



Rys.18. Wpływ komórek nowotworowych na wydzielanie chemokin przez monocyty.

Monocyty hodowano 18 godzin z komórkami HPC-4 lub CHP-100. W nadsączach oceniano poziom MCP-1 (CCL-2), MIP-1α (CCL-3), RANTES (CCL5) i GRO-α (CXCL1) metodą ELISA. Wyniki przedstawiono jako średnie (+/- SD) z trzech reprezentatywnych niezależnych eksperymentów.

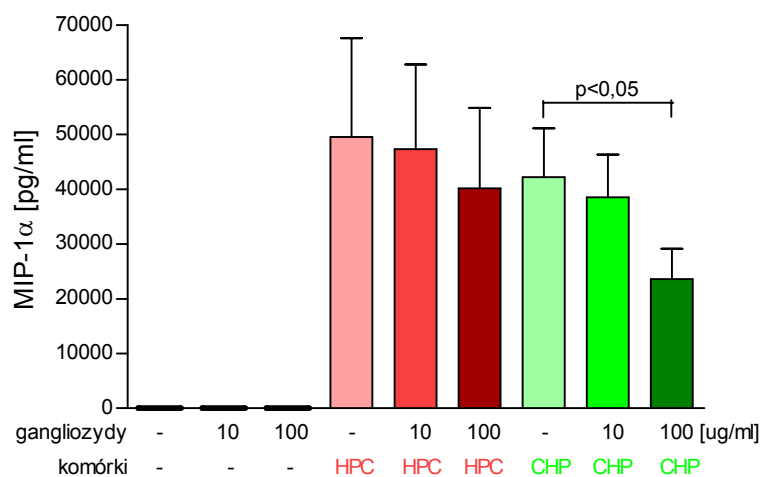


Fig.19. Wpływ gangliozydów na uwalnianie chemokiny MIP-1α przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi.

Monocyty preinkubowano bez lub z mieszaniną gangliozydów GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} w stężeniu 10 i 100 μg/ml przez godzinę, po czym stymulowano je komórkami nowotworowymi i hodowano 18 godzin. W nadsączach oceniano poziomy stężenia MIP-1α metodą ELISA. W supernatancie z hodowli samych komórek nowotworowych nie stwierdzono obecności MIP-1α. Wyniki przedstawiono jako średnie (+/- SD) z trzech reprezentatywnych niezależnych eksperymentów.