Utjecaj agonista Toll-like receptora 7/8 (CL097) na ekspresiju signalnih molekula IRAK-M i Bcl-3, važnih za imunosupresiju induciranu protrahiranom sepsom i malignim tumorom

Petričević, Branka

Doctoral thesis / Disertacija

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:334946

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

Središnja medicinska knjižnica

Petričević, Branka (2010) ***Utjecaj agonista Toll-like receptora 7/8 (CL097) na ekspresiju signalnih molekula IRAK-M i Bcl-3, važnih za imunosupresiju induciranu protrahiranom sepsom i malignim tumorom [The influence of Toll-like receptor 7/8 (CL097) agonist on the expression of signalling molecules IRAK-M and Bcl-3, hallmarks of immunosuppression in prolonged sepsis and cancer].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/753

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Branka Petričević

Utjecaj agonista Toll-like receptora 7/8 (CL097) na ekspresiju signalnih molekula IRAK-M i Bcl-3, važnih za imunosupresiju induciranu protrahiranom sepsom i malignim tumorom

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Disertacija je izrađena na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Istraživačkom laboratoriju Klinike za kirurgiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Beču

Voditelj rada: prof. dr. sc. Damir Vrbanec

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA ISTRAŽIVANJA 9
1.1.2 Građa i signalni putevi Toll-like receptora 13
1.1.3 Negativni regulatori TLR signalnog puta, IRAK-M i Bcl-3 16
1.1.4 Uloga Toll-like receptora u patogenezi bolesti 19
1.2 Agonisti Toll-like receptora 7/8 24
1.2.1 Učinci na stanicu inducirani agonistima TLR7/8 receptora 25
1.3 Uloga negativnih regulatora TLR signalog puta, IRAK-M i Bcl-3, u razvoju imunotoleracije u protrahiranoj sepsi i tumoru 26
1.4 Polarizirani M2 makrofazi 27
1.5 SVRHA ISTRAŽIVANJA 29
2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA 30
2.1 CILJ ISTRAŽIVANJA 30
2.2 HIPOTEZA 31
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA, BIOLOŠKI UZORCI I ISPITANICI 32
3.1 Biološki uzorci 32
3.2 Ispitanici i kontrolna skupina 32
3.3 Materijali 33
3.4 Metode 33
3.4.1 Izolacija, kultivacija i *ex vivo* stimulacija makrofaga dobivenih od monocita 33
3.4.2 *Ex vivo* stimulacija pune krvi 38
3.4.3 Identifikacija makrofaga dobivenih iz monocita i određivanje TLR2, TLR4, MR, CD40 i CD80 protočnom citometrijom 38
3.4.4 Western blot analiza ekspresije proteina IRAK-M i Bcl-3 40
3.4.5 Analiza citokina TNF-α, IL-10 i IL-12 metodom ELISA-e 44
3.5 Statističke metode 47
4. REZULTATI 48
4.1 Učinak HA na sintezu TNF-α sličan je učinku LPS-a. Primjenom CL097 s LPS-om ili HA dolazi do sinergističkog učinka na sintezu TNF-α, IL-12 i IL-10 u kulturi makrofaga dobivenih iz monocita periferne krvi 48
4.2 Sinteza proinflamatornih citokina induciranih stimulacijom TLR 7/8 agonistom CL097 samo je djelomično inhibirana IL-10 52

4.3 CL097 uspješno suzbija porast ekspresije IRAK-M koju izazaiva stimulacija makrofaga LPS-om/HA 53
4.4 CL097 učinkovito smanjuje ekspresiju Bcl-3 u kulturi makrofaga stimuliranih s LPS/HA 55
4.5 CL097 produžuje sintezu TNF-α 56
4.6 CL097 ne mijenja fenotip makrofaga 58
4.7 CL097 pojačava stvaranje TNF-α u perifernoj krvi pacijenata sa sepsom te pacijentata s metastatkim karcinomom stimuliranoj TLR4 agonistima 59
5. RASPRAVA 62
6. ZAKLJUČAK 70
7. KRATKI SARDŽAJ 71
8. KRATKI SARDŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU 72
9. POPIS LITERATURE 73
10. ŽIVOTOPIS 100

POPIS OZNAKA I KRATICA

A – adenin
AP-1 - activator protein-1
APC – antigen presenting cells
Aβ42 -amiloid peptid (Aβ42)
BCG-CWS - Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton
Bcl - B cell leukemia
C – citozin
CD – cluster of differentiation
CLL - kronična limfocitna leukemija
COX-2 - ciklooksigenaza-2
CpG - cytosine-phosphate-guanine
Cy5 – cijanin-5
CYLD - cylindromatosis protein
DC – dendritic cell
DNA – deoxyribonucleic acid
dsRNA – double strand RNA
DUBA - deubiquitinating enzyme A
EAE - eksperimentalni autoimuni encefalitis
EDN - eosinophil-derived neurotoxin
EDTA – etilen diamin tetra acetat
EGF – epidermal growth factor
ELISA – enzyme linked immunosorbent assay
ERK - extracellular signal-regulated kinase
FCS – fetal calf serum
FGF – fibroblast growth factor
FITC – fluorescein izotiocijanat
FSC – forward scatter
G – gvanin
G-CSF – granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor
Gp90 – glycoprotein 90
HA – hijaluronska kiselina
HMGB1 - high mobility group box-1
HPV – humani papiloma virus
Hsp - heat shock protein
IFN – interferon
Ig – imunoglobulin
IKK-γ - IκB kinase
IL- interleukin
IP-10 – interferon gamma induced protein
IRAK - IL-1 receptor associated kinase
IRF - IFN-regulatory factor
I-TAC – Interferon inducible T-cell alpha chemoattractant
IκB - NF-kappa-B inhibitor beta
JNK - Jun N-terminal kinase
LBP – LPS binding protein
LPS – lipopolisaharid

LRR - leucin-rich repeats
M1/M2 – makrofazi 1/makrofazi 2 fenotipa
MACS –magnetic cell separation
MAP – mitogen activated protein
MCMV – mouse cytomegalovirus
mDF – mouse defensin
MHC - Major Histocompatibility Complex
MIP - Macrophage Inflammatory Proteins
MKK6 - MAP kinase 6
MMP – metaloproteinaza
MR – mannose receptor
Mr – molecular weight
MyD88 - myeloid differentiation primary response gene 88
NADPH – nikotin amid adenin dinukleotid fosfat
NEMO - NF-κB essential modulator
NF-κB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK – natural killer
NKDC – natural killer dendritic cell
PAGE - poliakrilamid gel elektroforeza
PAMP - pathogen associated molecular patterns
PBMC – peripheral blood mononuclear cells
PBS – phosphate buffered saline
pDC – plasmacytoid dendritic cell
PE - fikoeritrin
PGN – peptidoglikan
Pin1 - prolyl isomerase 1
Rel - reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
RNA - ribonucleic acid
ROS - reactive oxygen species
RP105 - radioprotective 105
SARM - sterile alpha and Armadillo motif containing protein
SDS - sodim dodecyl sulphat
SOCS-1 – suppressor of cytokine sygnalling -1
SSC – side scatter
ssRNA - single strand RNA
T – timin
TAB - TAK binding protein
TAK1 – TGF β activated kinase 1
TANK - TRAF family-member-associated NF-κB activator
TBK1 – TANK binding kinase 1
TGF β – transforming growth factor β
TH1 – T helper 1
TH2 – T helper 2
TIR domena - Toll/IL-1 receptor domena
TIRAP/Mal - TIR domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like
TLR - Toll-like receptori
TNF - tumor necrosis factor
TRAF6 - TNF receptor associated family 6
TRAIL - tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIF - TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN-β

TRIF/TICAM-1 - TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β/TIR domain-containing adaptor molecule
TRIM30α - tripartite-motif protein 30α
U – uracil
Ubc 13 - ubiquitin-conjugating enzyme
Uev 1A - ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
uPA – urokinase plasminogen activator
uPA – urokinase plasminogen activator
VEGF – vascular endothelial growth factor

1. UVOD I SVRHA ISTRAŽIVANJA

1.1 Toll-like receptori

Obitelj Toll-like receptora (TLR) ima ključnu ulogu u prirođenim obrambenim mehanizmima te u stečenom/specifičnom imunološkom odgovoru. TLR (1) su evolucijski očuvani proteini koji domaćinu omogućuju prepoznavanje velikog broja struktura bakterija, virusa, protozoa i gljiva poznatih pod nazivom PAMP (pathogen associated molecular patterns) kao što su bakterijski lipopolisaharid, virusna RNA, DNA s ponavljajućim sekvencama CpG, flagelin i mnogi drugi (2). TLR također prepoznaju i cijeli niz liganada domaćina koji nastaju razaranjem različitih vrsta stanica u upalnim i stres reakcijama. Nakon vezivanja liganda i TLR-a dolazi do aktivacije niza signalnih puteva koji rezultiraju akutnim odgovorom domaćina potrebnim za eliminaciju patogena (3,4). TLR također potiču i sazrijevanje dendritičnih stanica koje su odgovorne za inicijaciju stečenog/specifičnog imunološkog odgovora. Međutim nekontrolirana aktivacija TLR-a nosi i negativne posljedice. Tako se pretjerana aktivnost pojedinih vrsta TLR-a povezuje s patogenezom autoimunih, kroničnih upalnih i infektivnih bolesti (2,5,6). Primjerice, stimulacija TLR-a i izražaj kostimulacijske molekule CD40 na auto-antigen prezentirajućim dendritičnim stanicama inducira razvoj dilatativne kardiomiopatije (7). Drugi zanimljiv primjer negativnog utjecaja TLR-a je u razvoju ateroskleroze, gdje hipofunkcionalni polimorfizam TLR4 nosi manji rizik razvoju ateroskleroze (2). Također postoje naznake da TLR sudjeluju u patogenezi dijabetesa melitusa i eksperimentalno induciranog autoimunog encefalomijelitisa (2). TLR imaju važnu ulogu i u razvoju i progresiji kroničnih upalnih bolesti kao što su astma, bolest dišnih puteva posredovanu TH2 odgovorom (T helper 2) te reumatoidnom artritisu, upalnoj bolesti zglobova posredovanoj TH1 (T helper 1) odgovorom. U središnjem živčanom sustavu moguća je uloga TLR-a opisana u razvoju Alzheimerove bolesti. Naime, aktivacijom TLR2, TLR4 i TLR9 na stanicama mikroglije, dolazi do stvaranja brojnih proinflamatornih posrednika i nakupljanja β amiloid peptida (8-10). TLR mogu također inducirati i pojačati egzacerbaciju infekcije potičući pretjeranu proizvodnju proinflamatornih citokina i tako uzrokovati oštećenje tkiva ili s druge strane oslabiti zaštitni imunitet stimulirajući funkciju regulatornih T limfocita. Budući da TLR prepoznaju široki spektar liganada patogena i domaćina te da su izraženi na velikom broju stanica, TLR mogu utjecati na pojavu i razvoj mnogih upalnih i imunoloških bolesti.

1.1.1 Toll-like receptori i njihovi ligandi

Ljudski i mišji Toll-like receptori čine veliku obitelj s najmanje 11 članova (Tablica 1, Slika 1). TLR 1-9 su očuvani kod ljudi i miševa, dok je TLR10 funkcionalan jedino kod ljudi (1). Nasuprot tome, TLR11 je prisutan i funkcionalan samo kod miševa, dok je kod ljudi njegova translacija zakočena (11). Istraživanjima na „knock-out" miševima pronađeni su brojni egzogeni (patogenog podrijetla) i endogeni (podrijetla domaćina) ligandi TLR-a (12).

TLR2 i TLR4 glavni su receptori za prepoznavanje različitih dijelova bakterijske stijenke. TLR4 je ključan za učinkovit odgovor domaćina na gram-negativne bakterije te prepoznaje lipopolisaharid (LPS) (13). Za vezanje LPS-a za TLR4 potrebni su i dodatni proteini – LBP (LPS binding (vezujući) protein), prisutan u serumu, CD14 i MD-2 (slobodni ili na membrani stanica) (14). Još nekoliko molekula poput integrina CD11b/CD18 dodatno pospješuju stanične odgovore na LPS (15). TLR4 također sudjeluje u odgovoru domaćina na pneumolizin, glavni čimbenik virulencije Streptococcusa pneumoniae te na proteine respiracijskog sincicijskog virusa (16,17).

TLR2 posreduje stanične odgovore na lipoproteine i lipoteihoičnu kiselinu (LTA) iz gram-pozitivnih bakterija i mikobakterija (18,19) te na atipični LPS (iz Porphyromonasa gingivalisa) (20). TLR2 se aktivira i infekcijom gram-negativnih bakterija (npr. Francisellom tularensis) (21). On također posreduje i imunološki odgovor na lipoproteine niza organizama, uključujući i Borreliu burgdorferi, Treponemu pallidum, Aspergillus fumigatus i Mycoplasmu fermentes (6). Široki raspon liganada koje vezuje TLR2 vjerojatno omogućuje heterodimerizacija TLR2 s drugim TLR receptorima. Tako na primjer TLR1/2 heterodimer vezuje niz lipoproteina različitih od onih koje vezuju heterodimeri TLR1/6 (1).

TLR 3, 7 i 8 imaju značajnu ulogu u staničnom odgovoru na viruse. TLR3 veže dvolančanu virusnu RNA (22), a TLR 7 i 8 jednolančanu RNA (23, 24), nukleozide s imunostimulirajućim svojstvima te nukleozidima slične lijekove kao što su imidazokinolini i loksoribini (25, 26).

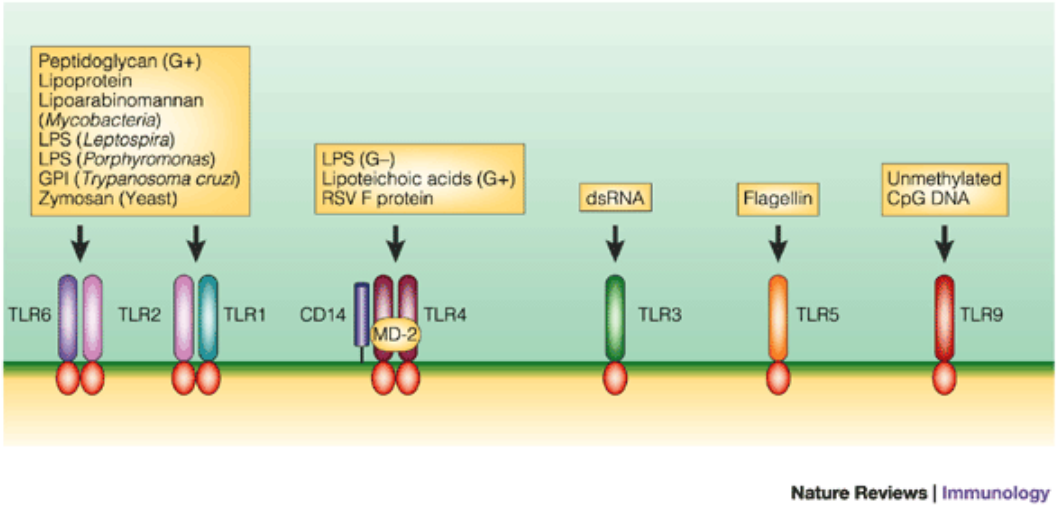
TLR9 posreduje stanični odgovor na bakterijsku DNA prepoznajući parove citozin-gvanina (CpG motive) (21). Također ga aktiviraju i virusi Herpesa (27, 28) te Aspergillus (29). Tako su miševi s hipofunkcionalnim TLR9 podložni oportunističkoj infekciji mišjim

citomegalovirusom (MCMV) (30). Prepoznavanje MCMV putem TLR9 receptora plazmacitoidnih dendritičnih stanica (pDC) ili drugih tipova dendritičnih stanica izaziva odgovor domaćina na MCMV aktivacijom NK (natural killer) stanica (31).

TLR11 izražen je na epitelnim stanicama mokraćnog mjehura i posreduje odgovor na infekcije uropatogenim bakterijama kod miševa (11), te su tako miševi deficijentni za TLR11 skloni urinarnim infekcijama. Nedavno je potvrđeno da profilinu slična molekula protozoe Toxoplasme gondii aktivira dendritičke stanice putem TLR11 i potiče stvaranje interleukina-12 (IL-12). Zanimljivo je da kod čovjeka ne postoji funkcionalan TLR11 (11, 32), vjerojatno zbog selektivnog gubitka tijekom procesa evolucije.

Osim što TLR vežu ligande patogena, oni također interagiraju s molekulama domaćina, uključujući i antimikrobne molekule poput mišjeg-defenzina 2 (mDF2) (33), ROS (reactive oxygen species) (34), proteine koji se oslobađaju iz mrtvih ili umirućih stanica kao što su HMGB1 (high mobility group box-1) (35), protein surfaktanta A (36), fibrinogen (37), razgradne produkte ekstracelularnog matriksa poput fragmenta fibronektina (38), oligosaharida hijaluronske kiseline (39) i EDN (eosinophil-derived neurotoxin) (40). Proteini toplinskog šoka (heat shock proteini - Hsp) poput Hsp60, Hsp70, Hsp90 (gp90) također aktiviraju TLR2 i TLR4 i potiču stvaranje proinflamatornih citokina monocita i makrofaga te sazrijevanje dendritičkih stanica. Međutim postoji i niz nepoznanica u definiranju točnog podrijetla i prirode TLR liganada domaćina i njihove interakcije s TLR-om. Tako na primjer postoje dokazi koji ukazuju da bi učinci proteina toplinskog šoka na lučenje citokina mogli biti posljedica kontaminacije LPS-om (41). Također još nije potpuno razjašnjeno kako brojni agonisti stimuliraju jedan TLR, niti kako jedan agonist interagira s više različitih TLR-a. Moguće je da i druge akcesorne molekule ili receptori poput MD-2, CD14 ili drugi neidentificirani proteini imaju ulogu u prezentiranju liganada TLR receptorima (6).

Slika 1. Prikaz Toll-like receptora i njihovih liganada.



Tablica 1. TLR i njihovi ligandi.(3,30,36,42)

TLR	**Podrijetlo liganda**	**Ligandi**
TLR1	Bakterije i mikobakterije	Triacil lipopeptid
	Neisseria meningitides	Topivi čimbenici
TLR2	Gram-pozitivne bakterije	Peptidoglikan (PGN)
	Brojni patogeni	Lipoprotein/lipopeptidi
	Gram-pozitivne bakterije	Lipoteihoična kiselina
	Mikobakterije	Lipoarabinomanan
	Staphylococcus epidermidis	Fenol-solubilni modulin
	Trypanosoma cruzi	Glikoinozitolfosfolipidi
	Treponema maltophilum	Glikolipidi
	Neisseria	Porini
	Gljive	Zimosan
	Leptospira interrogans	Atipični LPS
	Porphyromonas gingivalis	Atipični LPS
	Domaćin	Hsp70 (Heat shock proteini)
	Domaćin	EDN (Eosinophil-derived neurotoksin)
TLR3	Virusi	Dvolančana RNA
TLR4	Gram-negativne bakterije	Lipopolisaharidi (LPS)
	Biljke	Taksol

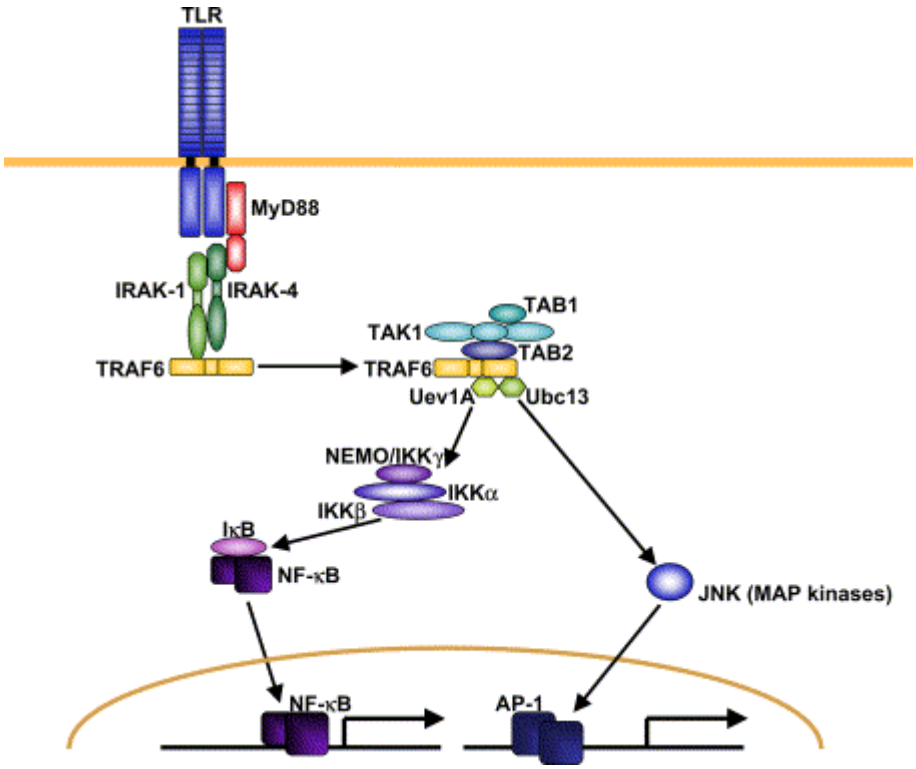
TLR	Podrijetlo liganda	Ligandi
	RSV (Respiratory syncytial virus)	Fuzijski protein
	MMTV (Mouse mammary tumor virus)	Proteini ovojnice
	Chlamydia pneumoniae	Hsp60
	Domaćin	Hsp60, Hsp70
	Domaćin	Tip III ponavljajuća ekstra domena A fibronektina
	Domaćin	Oligosaharidi hijaluronske kiseline
	Domaćin	Polisaharidni fragmenti heparan sulfata
	Domaćin	Fibrinogen
TLR5	Bakterije	Flagelin
TLR6	Mikoplazme	Diacil lipopeptidi
TLR7	Sintetički spojevi	Imidazokinolini
	Sintetički spojevi	Loksoribini
	Sintetički spojevi	Bropirimini
	Virusi	Jednolančana RNA
TLR8	Sintetički spojevi	Imidazokinolini
	Virusi	Jednolančana RNA
TLR9	Bakterije i virusi	CpG ODN (Oligodeoksinukleotidi)
	Malarija	Pigment hemozoin
TLR10	Nepoznato	
TLR11	*Toxoplasma gondi*	Profilinu sličan protein

1.1.2 Građa i signalni putevi Toll-like receptora

Citoplazmatska domena Toll-like receptora vrlo je slična onoj obitelji interleukina-1 (IL-1) receptora te se tako naziva Toll/IL-1 receptor (TIR) domena. Ekstracelularni dijelovi ovih receptora znatno se razlikuju i nisu strukturno srodni. Receptor IL-1 sadrži „Ig-like“ (Ig-sličnu) domenu dok TLR nose leucinom bogate ponavljajuće sekvence (leucin-rich repeats – LRRs) u izvanstaničnom dijelu. Nizvodno od TIR domene u signalnom putu svih TLR osim TLR3, adaptorska je molekula MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88).

TLR3 i TLR4, uz prisutan MyD88 signalni put, aktiviraju signalni put neovisan o MyD88 koji započinje regrutacijom adaptorske molekule TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN-β) (43-51). Nakon stimulacije, TLR dimeriziraju, mijenjaju konformaciju, vežu MyD88 koji regrutira IRAK (IL-1 receptor associated kinase) i omogućuje joj interakciju s TLR-om preko „death" domena (domena smrti) obaju molekula. IRAK se aktivira fosforilacijom te veže TRAF6 (TNF receptor associated family 6) što dovodi do nizvodne aktivacije dva različita signalna puta i konačno do aktivacije JNK (c-Jun N-terminal kinase) i NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Slika 2).

Slika 2. TLR MyD88 ovisan signalni put.



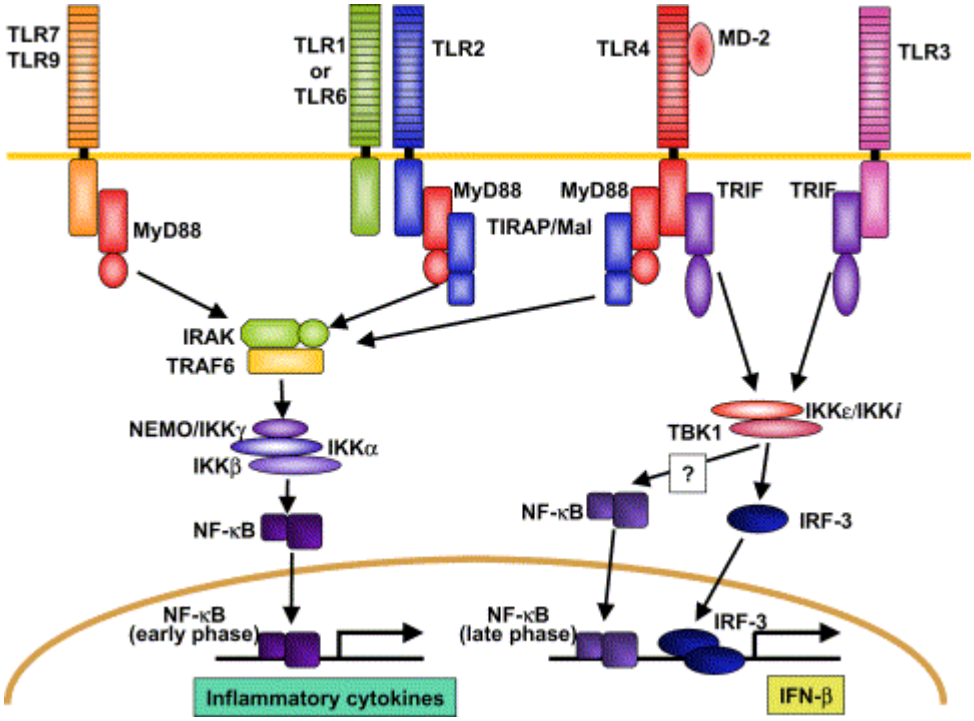
Molekula IRAK je serin/treonin kinaza vezana uz IL-1 receptor te uz TIR domenu (52). Do sada su opisana četiri člana IRAK obitelji: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 i IRAK-M. Proteini IRAK obitelji sastoje se od N-terminalnog dijela koji interagira s MyD88 i centralne domene s aktivnosti kinaze. IRAK-1 i IRAK-4 sadrže za funkciju kinaze ključan aspartatni ostatak koji nije očuvan u IRAK-2 i IRAK-M što ih čini katalitički inaktivnima (53). IRAK-4 fosforilira IRAK-1 nakon TLR stimulacije i tako je aktivira (54) te je stoga središnji posrednik TLR signalnog puta. Nasuprot tome, IRAK-M „knock-out" miševi pokazuju

izrazito pojačano stvaranje proinflamatornih citokina nakon stimulacije TLR-a te pretjerani upalni odgovor na bakterijsku infekciju što upućuje na inhibicijsku ulogu IRAK-M u prijenosu signala TLR-a (55).

TRAF6 je član obitelji čimbenika vezanih za receptor za TNF (tumor necrosis factor) (56). Nakon aktivacije TLR-a TRAF6 se regrutira i veže za kompleks TLR-a i IRAK-1 koja ga tada aktivira. Kompleks IRAK-1/TRAF6 disocira od receptorskog kompleksa i veže se s TAK1 (TGF-β-activated kinase 1) te TAK1 vežuće proteine TAB1, TAB2 i TAB3 (TAK binding proteins) u membrani dijelu. IRAK-1 ostaje u membrani i razgrađuje se, dok se kompleks TRAF6, TAK1, TAB1, TAB2 i TAB3 pomiče u citoplazmu i formira veliki kompleks s drugim proteinima poput E2 ligaza (ubikvitin protein ligaze) Ubc13 i Uev1A (57). Ubc13 i Uev1A kompleks katalizira sintezu poliubikvitinskog lanca na TRAF6 i IKK-γ/NEMO (IκB kinase/NF-κB essential modulator). Ubikvitinacijom se aktivira kompleks TRAF6, TAK1, TAB1, TAB2 i TAB3, nakon čega TAK1 fosforilira IKK-β i MKK6 (MAP kinase 6) koji zatim moduliraju aktivaciju NF-κB, MAP kinaza (mitogen activated protein kinase) i AP-1 (activator protein-1) što rezultira transkripcijom gena upalnog odgovora (58). Naime IKK-β fosforilira IκB (inhibitor of κB) što uzrokuje njegovu disocijaciju i aktivaciju NF-κB.

Nasuprot tome, kod TLR 3 i TLR4 (uz MyD88 ovisan signalni put) nizvodni prijenos signala započinje adaptorskom molekulom TRIF (Slika 3). TRIF putem TRAF3 aktivira TBK1 (TRAF-family-member-associated NF-κB activator (TANK) binding kinase 1). TBK1 među ostalim obuhvaća obitelj inducibilnih IκB kinaza (IKK-*i*, također poznatu pod imenom IKK-ε) koje izravno fosforiliraju IRF-3 i IRF-7 (IFN-regulatory factor-3 i 7). Tako fosforilirani IRF3 i IRF7 tvore homo- i heterodimere, translociraju se u jezgru i potiču izražaj interferona tipa I kao i interferon inducibile gene (2,3,59-62). MyD88 neovisnim putem također se aktivira NF-κB i sinteza citokina putem interakcije TRIF i TRAF-6 (63).

Slika 3. MyD88 ovisan i neovisan put.

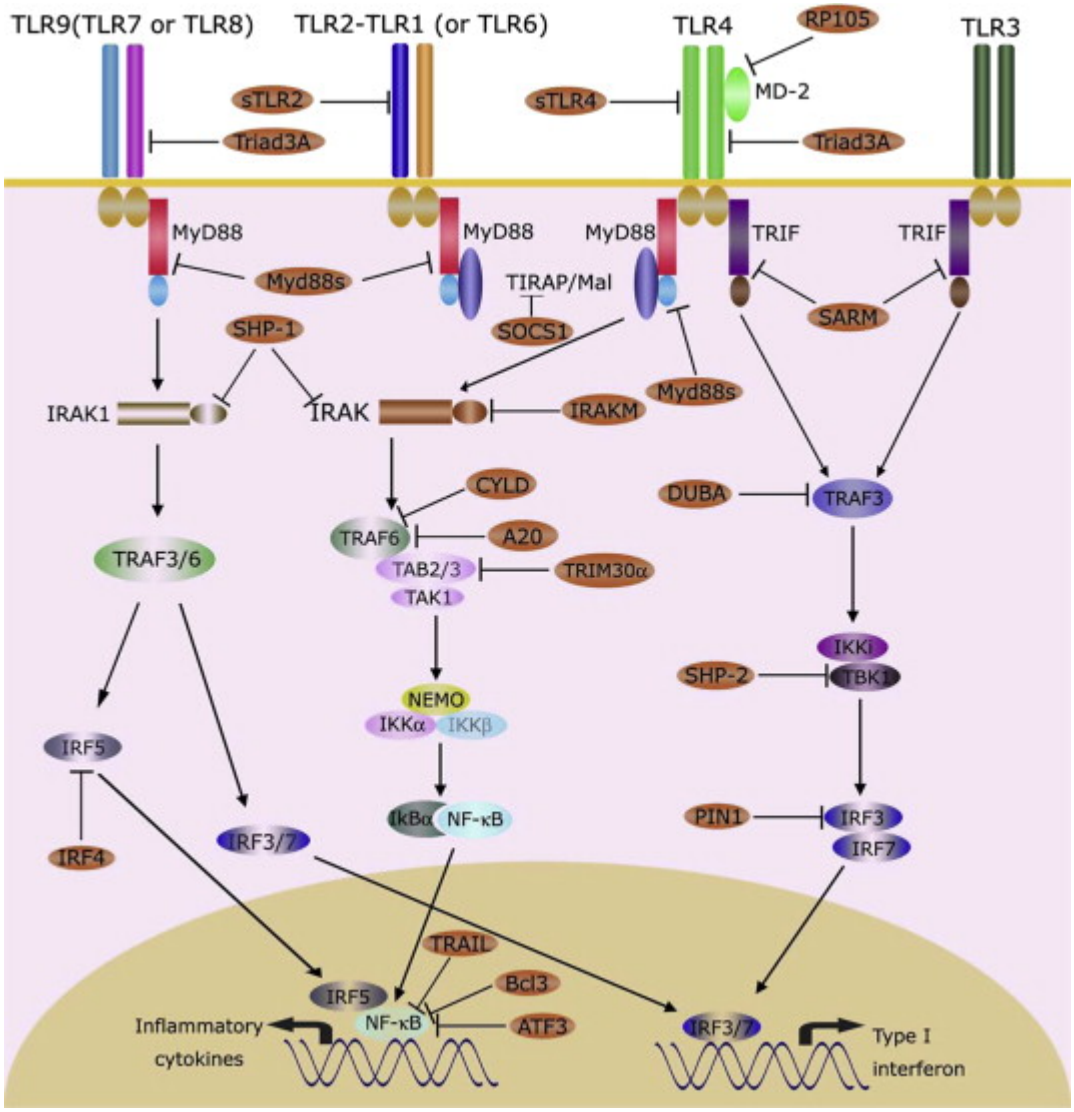


U oba TLR signalna puta (MyD88 ovisnom i neovisnom) sudjeluje i niz adaptorskih molekula kao što su (TIRAP)/Mal (TIR domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like) i TRIF/TICAM-1 (TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β/TIR domain-containing adaptor molecule) (64-67). Smatra se da te molekule omogućuju specifičnost pojedinih TLR signalnih kaskada. TIRAP/Mal vezuje se uz MyD88 i ključan je za prijenos signala TLR2 i TLR4 te aktivaciju JNK i NF-κB (68,69), a ne nalazi se kod TLR3, TLR5, TLR7 i TLR9 te ne aktivira IRF-3. Druga adaptorska molekula TRIF/TICAM neophodna je za MyD88 neovisan prijenos signala TLR3 i TLR4, indukciju IFN-β i sintezu citokina u kasnijoj fazi (70,71).

1.1.3 Negativni regulatori TLR signalnog puta, IRAK-M i Bcl-3

TLR su najpoznatiji senzori invazije patogenih mikroorganizama. Ključni su za razvoj urođenog imuniteta na patogene. Međutim, jačina i trajanje aktivacije TLR signalnog puta strogo je regulirana, budući da njihova pretjerana aktivacija može biti opasna

Slika 4. Signalni putevi TLR-a i negativna regulacija.



za domaćina. Presnažna upala može uzrokovati autoimmune bolesti kao što su eksperimentalni autoimuni encephalitis, sistemski lupus eritematodes i dr. Ravnoteža se održava brojnim negativnim regulatorima, a regulacija je vrlo precizna (5,72) (Slika 4).

Ekspresija većine negativnih regulatora može se inducirati samom aktivacijom TLR-a i djeluje na principu negativne povratne sprege. Međutim postoje i neki konstitutivno izraženi čimbenici koji postaju funkcionalni tek nakon produžene aktivacije TLR-a. Svaki negativni regulator ima svoj ciljni protein, a mehanizmi djelovanja im se razlikuju. Najčešći mehanizmi su degradacija, deubikvitinacija i kompeticija. Negativni regulatori ne mogu međusobno kompenzirati funkcije te u slučaju nedostatka jednog od njih nastaju bolesti.

Ubikvitinacija je jedan od mehanizama koji dovodi do razgradnje signalnih molekula i tako koči prijenos signala. Ubikvitini su peptidi izgrađeni od 76 aminokiselina, a vežu se na proteinski substrat koji se tada usmjerava i razgrađuje u 26S proteasomu. Nekoliko negativnih regulatora prijenosa signala TLR-a koristi ovaj princip. Tako Triad3A (Triad domain-containing protein 3 koji ima funkciju ubikvitin-protein ligaze), vezuje ubikvitin na TLR4 i TLR9 i potiče njihovu razgradnju (73). Drugi je primjer (SOCS)-1 (suppressor of cytokine signalling-1) koji prepoznaje fosforiliranu adaptorsku molekulu Mal, inducira njezinu razgradnju te tako zaustavlja prijenos signala s TLR2 i TLR4 (74). Tako djeluje i Pin1 (prolyl isomerase 1) koji preko IRF3 suprimira TLR3 aktivaciju (75). Potičući lizosomsku degradaciju TAB2 i TAB3, TRIM30α (Tripartite-motif protein 30α) dio je negativne povratne sprege koja smanjuje stvaranje proinflamatornih citokina IL-6 i TNF-α (76).

Ubikvitinacija, međutim može olakšavati interakcije proteina i tako dovesti do aktivacije signalnog puta, stoga je deubikvitinacija još jedan od mehanizama inhibicije prijenosa signala. Tako deubikvitinirajući enzim A20 odstranjujući K63-vezani poliubikvitinski lanac s TRAF6 prekida aktivaciju NF-κB (77). Sličnan učinak ima i CYLD (cylindromatosis protein) na prijenos signala TLR2 vežući se na TRAF6, TRAF7, NEMO, Bcl3 i TAK1. (78) te DUBA (deubiquitinating enzyme A) interagirajući s TRAF3 (79).

Kompeticija inaktivnih molekula sa signalnim molekulama također zaustavlja prijenos podražaja TLR-a. Tako inaktivna adaptorska molekula SARM (Sterile alpha and Armadillo motif containing protein) natječući se s adaptorom TRIF koči nizvodne interakcije TIR domene TLR-a (80). IRF5 i IRF7 transkripcijski su faktori koji potiču ekspresiju proinflamatornih citokina i tipa I interferona, a interagiraju s MyD88. IRF4, sljedeći u nizu negativnih regulatora, vlastitim vezanjem za MyD88 onemogućava vezanje IRF5 (81). Nefunkcionalni homolog TLR4 – RP105 (radioprotective 105) vežući se s TLR4 onemogućava primarnu interakciju s LPS-om (82). Sličan učinak ima i nefunkcionalna molekula MyD88 (83,84).

Sljedeća skupina inhibitora TLR signalnog puta djeluje drugim mehanizmima. Jedan od inhibitora je i član obitelji IRAK kinaza – IRAK-M. Iako posjeduje 12 serin/treonin kinaza subdomenu, nedostaje joj katalitički aktivan aspartat te tako i katalitička aktivnost kinaza IRAK-1 i IRAK-4. Zanimljivo je da je IRAK-M uglavnom izražena u monocitima/makrofazima, dok su IRAK-1, IRAK-2 i IRAK-4 eksprimirane ubikvitarno. U usporedbi s makrofazima divljeg tipa, IRAK-M deficijentni makrofazi stvaraju znatno više

razine citokina stimulacijom TLR-a, osobito CpG DNA. Kod IRAK-M-deficijentnih makrofaga izloženih CpG DNA, fosforilacija JNK, p38, i ERK1/2 pojačana je ubrzanom fosforilacijom i degradacijom IκBα. Takvi makrofazi ne razvijaju toleranciju na endotoksin, a razine citokina nakon restimulacije s LPS-om se ne smanjuju kao što je to slučaj kod makrofaga divljeg tipa. IRAK-M onemogućava formiranje IRAK-1/TRAF6 kompleksa inhibirajući disocijaciju IRAK-1 od MyD88 (85) čime ostvaruje inhibirajući učinak na prijenos signala.

Bcl-3 (B cell leukemia) interagira s p50, članom obitelji NF-κB, a pripada obitelji IκB molekula. Makrofazi i dendritične stanice porijekla Bcl-3 deficijentnih miševa sintetiziraju znatno više citokina na podražaj LPS-om u usporedbi s onima divljeg tipa. *Bcl3*$^{-/-}$ makrofazi pretretirani s LPS-om gube mogućnost razvoja tolerancije na endotoksin koja se javlja kod onih divljeg tipa te se očituje smanjenom proizvodnjom citokina nakon restimulacije LPS-om. U istraživanju TLR tolerancije *in vivo* na modelu miševa kimera koštane srži pokazano je da pretretiranje LPS-om miševa koji su dobili koštanu srž divljeg tipa štiti od septičkog šoka, dok miševi s *Bcl3*$^{-/-}$ koštanom srži umiru od septičkog šoka. Negativna regulacija TLR signalnog puta Bcl-3 molekulom uzrokavana je vezivanjem Bcl-3 s p50. Kod nestimuliranih makrofaga divljeg tipa, homodimeri p50 zauzimaju vezna mjesta za NF-κB na molekuli DNA. Nakon stimulacije s LPS-om dolazi do poliubikvitinacije i degradacije p50 i njegove zamjene transkripcijski aktivnim dimerima c-Rel i p65. Bcl-3 produžuje poluvrijeme vezanja p50 za DNA njegovom stabilizacijom i učinkovitom inhibicijom poliubikvitinacije te tako kontrolira i ograničava odgovor na LPS (86). Od ostalih negativnih regulatora valja spomenuti TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) koji stabilizira IκB-α (87) te solubilne TLR4 i TLR2 receptore za koje se smatra da ometaju vezivanje liganda za koreceptor TLR-a (88,89).

1.1.4 Uloga Toll-like receptora u patogenezi bolesti

Iako su TLR važni za prvu liniju antimikrobne obrane, oni imaju i ulogu u razvoju mnogih upalnih i imunoloških bolesti budući da prepoznaju i ligande podrijetla domaćina. U sljedećem poglavlju izneseni su primjeri uloge TLR-a u nastanku različitih patoloških stanja.

U razvoju bolesti koje zahvaćaju središnji živčani sustav opisana je uloga TLR-a u nastanku Alzheimerove bolesti. Mikroglija eksprimira profil TLR-a sličan perifernim monocitima/makrofazima (90) – izrazito TLR2 i TLR3, umjereno TLR1, TLR4, TLR5,

TLR6, TLR7 i TLR8 te vrlo malo TLR9 (42,91). Aktivacijom TLR2, TLR4 i TLR9 dolazi do pojačanog upalnog odgovora te nakupljanja β-amiloid peptida (Aβ42) koji je izravno neurotoksičan te stimulira mikrogliju na lučenje neurotoksičnih posrednika (92-94). Također se istražuje uloga TLR-a u razvoju multiple skleroze ili slične bolesti u miševa – eksperimentalnog autoimunog encefalitisa (EAE). Pronađeno je da signalna kaskada TLR3 i TLR4 potiče T staničnu infiltraciju u EAE te tako i njegovu indukciju i progresiju (95-97).

TLR posreduju i u razvoju plućnih bolesti uključujući astmu i brojne infektivne bolesti. TLR su izraženi na alveolarnim makrofazima, glatkim mišićima dišnih puteva, fibroblastima, memorijskim T stanicama i regulatornim T limfocitima (36,98-106). Indukcija i progresija upale u astmi koordinirana je interakcijom antigen-prezentirajućih stanica (APC) i T limfocita, a pobliže regulirana stanjem aktivacije TLR-a uglavnom na APC. Dokazano je da niskodozna stimulacija TLR4 usmjerava odgovor domaćina prema TH2 fenotipu, dominantnom tipu odgovora u astmi (107-111). Nedavno je pokazano da određeni polimorfizmi TLR2mogu djelovati zaštitno u razvoju astme (112), te da agonisti TLR2 imaju terapijski učinak inducirajući Th1 odgovor (113,114), kao i agonisti TLR9 – nemetilirani CpG (115-118). Funkcionalnost TLR-a vrlo je bitna za zaštitu od infektivnih bolesti pluća. Tako su za svladavanje infekcije Chlamydiom pneumoniae potrebni funkcionalni TLR2 i TLR4 (119), a kod deficijentnih TLR2, TLR4 i TLR9 javlja se podložnost tuberkulozi (120-122). Očuvani TLR2 i adaptorska molekula MyD88 značajni su za učinkovitu obranu od Legionelle pneumophillae (123), MyD88 od Cryptococcus neoformans (124), a TLR3 od virusa Influenze A (125).

Gastrointestinalne epitelne stanice izražavaju gotovo sve poznate TLR (126-129), a njihova aktivacija precizno je regulirana. Poremećaji u ekspresiji i aktivnosti određenih TLR-a uočeni su kod niz bolesti probavnog sustava. Predispozija za razvoj i održanje upalnih bolesti crijeva povezuje se s pojačanim izražajem i određenim polimorfizmima TLR4 (CB i UC), TLR5 te sličnim receptorima Nod (nucleotide-binding oligomerization domain proteins) – Nod2 (130-139). Također je utvrđen promijenjeni izražaj TLR2 i TLR4 u upalnom odgovoru izazvanom H. Pylori (127,140,141) te promjena ekspresije TLR5 i TLR9 na želučanoj sluznici koja prati infekciju ovom bakterijom (142). Opisana je i povezanost sklonosti infekciji različitim patogenima s mutacijama TLR-a (143-147).

Očuvani TLR4 i TLR9 također su važni za učinkovito svladavanje bakterijskih infekcija bubrega (148-152). Obzirom da su različiti TLR izraženi u različitim slojevima kože (153-

155) zanimljiva je njihova uloga u razvoju različitih kliničkih slika određenih dermatoloških bolesti. Tako se primjerice tuberkuloidni oblik lepre povezuje s pojačanom ekspresijom TLR1/2 u koži (156), dugotrajne akne vulgaris s pojačanom ekspresijom TLR2 (157), a smanjeni izražaj TLR5, promijenjeni raspored TLR2 i pojačani izražaj TLR1 s razvojem psorijaze (153,158,159). Očuvana funkcija TLR2/1 heterodimera nužna je za učinkovit imunološki odgovor na Borreliu burgdorferi (160,161).

TLR signalni put također se povezuje s razvojem malignih bolesti, što podupiru i sljedeći rezultati bazičnog i kliničkog istraživanja. Mnoge se kronične upalne bolesti povezuju s razvojem malignih bolesti uključujući upalne bolesti crijeva, hepatitis te infekciju Helicobacterom pylori (162). Stimulacijom TLR2/9 Helicobacterom pylori u kroničnom gastritisu aktivira se ciklooksigenaza-2 (COX-2) te se time podržava razvoj karcinoma želuca (163). Na modelu mišjeg metastatskog karcinoma dojke pokazana je uloga LPS-a u poticanju metastaziranja tumora. Stimulacijom TLR4 receptora mijenja se fenotip makrofaga koji infiltriraju tumor u tzv. M2 fenotip, koji osim izražene imunosupresivne funkcije ima i ulogu u poticanju neoangiogeneze i tumorske invazije (164). LPS također može poticati tumorsku progresiju djelujući izravno na maligne stanice, inducirajući NF-κB i posljedično tome ekspresiju β-1 integrina čime se potiče adhezija tumorskih stanica za endotel i ekstracelularni matriks te tako i tumorska invazija, a kod određenih stničnih linija koje posjeduju MyD88 funkcionalni signalni put iducira se i antiapoptoza (165). Tako je kod mišjeg CT-26 kolorektalnog karcinoma, tumor promovirajući učinak LPS-a posljedica stvaranja upalnih citokina poput TNF-α, primarno od strane stanica prirođenog imuniteta (166). TLR na tumorskim stanicama može doprinjeti i izbjegavanju imunološkog nadzora pa tako kočenje signalnog puta TLR4 dokida supresiju proliferacije T limfocita i aktivira NK stanice, usporavajući rast tumora i produžavajući preživljenje oboljelih miševa (167). Na temelju iznesenog, može se zaključiti da aktivacija TLR-a u tumorskom tkivu doprinosi subverziji imunološkog odgovora domaćina i progresiji malignoma (Tablica 2).

Tablica 2. Uloga Toll-like receptora u razvoju malignih bolesti.

TLR	Tumorske stanice koje eksprimiraju TLR	TLR funkcije	Citati
TLR2/TLR9	Karcinom želuca	Progresija tumora	[163]
TLR4	Karcinom dojke	Progresija tumora	[164]
TLR9	Gliom	Apoptoza tumorskih stanica	[174]
TLR7, TLR9	Kronična limfocitna leukemija (CLL)	Stanična smrt CLL-a	[178]
TLR5	Mišja stanična linija karcinoma dojke D2F2	Promocija tumorskog rasta u ranoj fazi, a inhibicija u kasnoj	[179]
TLR3	Stanice karcinoma dojke	Apoptoza stanica karcinoma	[180]
TLR2, TLR3, TLR4	Karcinom laringsa	Nepoznato	[181]

Toll-like receptori također se istražuju u svrhu ciljane antitumorske terapije, kao cilj antitumorskih vakcina kojima se nastoji prevladati tolerancija imunološkog sustava, postići njegova reaktivacija te tako i prepoznavanje i uništenje tumorskih stanica. Osnova aktivacije i usmjeravanja imunološkog odgovora prema tumorskim antigenima je korištenje odgovarajućih adjuvansa koji potiču učinkovitu proizvodnju protutijela i funkciju ubilačkih stanica (168). Poznato je da je sazrijevanje dendritičnih stanica i indukcija proizvodnje citokina, koji čine osnovu antineoplastične aktivnosti BCG-CWS (Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton) kod karcinoma mokraćnog mjehura posredovano TLR2 i TLR4 (169). Tako je i antitumorska aktivnost modifikatora biološkog odgovora OK-342 (preparata Streptococcus pyogenesa) ovisna o aktivaciji TLR4, a ispituje se u liječenju karcinoma glave i vrata (170). Aktivacija TLR3 dvolančanom RNA (dsRNA) na dendritičnim stanicama potiče stvaranje interferona tipa I koji inducira apoptozu tumorskih stanica i citotoksičnost NK stanica (171). CpG ODN (oligodeoksinukleotidi) oponašajući imunostimulacijski učinak bakterijske DNA, aktiviraju TLR9 receptor i predstavljaju potentan adjuvans za terapiju B staničnih limfoma (172). Imikvimod, TLR7 agonist, u širokoj je uporabi za liječenje bazeocelularnog karcinoma, a uz imunostimulacijske ima i izravne proapoptotiče učinke na tumor (173). Slično stimulacija TLR9 CpG-om, izraženog na ljudskim i mišjim stanicama glioma, produžuje preživljenje miševa s eksperimentalno induciranim tumorima mozga. CpG

snižava razinu TLR9 nakon čega slijedi apoptoza GL261 stanica glioma *in vitro* kao i *in vivo*. Također, stimulacija CpG-om pojačava antigen prezentirajuće sposobnosti mikroglije, usmjeravajući imuni odgovor prema CD8(+) T stanicama te smanjujući broj CD4(+)CD25(+) regulatornih T stanica. Stoga se primjena CpG ispituje u imunoterapiji glioma (174). Zanimljivo je da bi TLR agonisti mogli biti osobito podgodni u liječenju kronične limfocitne leukemije (CLL) obzirom na visoku ekspresiju nekoliko TLR-a uključujući i TLR7 i TLR9. Agonisti TLR-a mogli bi indirektno uništiti CLL stanice potičući aktivnost NK i citotoksičnih stanica ili mijenjajući mikrokoliš tumora i kočeći angiogenezu (175).

Imunološki adjuvansi izazivaju različite odgovore domaćina ciljano djelujući na različite TLR receptore i njihove unutarstanične adaptore. Aktivacija TLR7, TLR8 i TLR9 inducira sintezu IFN-α, potiče učinkovitiju prezentaciju antigena, aktivira citotoksične T limfocite i polarizira imuni odgovor u Th1 smjeru (176). Signalizacija putem TLR4 i TLR5 potičući proizvodnju IL-12 u dendritičnim stanicama također stimulira Th1 odgovor (177). Novije studije ukazuju i na potencijalno negativne učinke TLR-a u antitumorskom liječenju. Naime, određeni ligandi TLR2 usmjeravaju imuni odgovor prema TH2 (177). Stoga će biti potrebno pažljivo odabrati ciljni TLR, te koristiti različite kombinacije TLR agonista u odgovarajućim uvjetima ili upotrebljavajući TLR ligande s drugim imunostimulansima (177). Također se javlja i problem smanjivanja TLR imunostimulacijskog učinka u slučaju kada postoji velika tumorska masa. Tako unatoč primjeni TLR3 i TLR4 liganada, LPS-a i poli IC, zbog negativnog djelovanja velikog broja tumorskih stanica, ne dolazi do aktivacije dendritičkih stanica, indukcije MHCII niti ekspresije kostimulacijskih molekula CD40 i CD86 te stvaranja citokina IL-12, TNF-α i IL-6. Tumorske stanice također induciraju inhibitorne molekule (B7-DC, B7-H1 i CD80) na dendritičnim stanicama slezene *in vivo* i na dendritičnim stanicama porijekla koštane srži, čak i uz prisutnost TLR agonista. Rezultati ovih istraživanja morat će se uzeti u obzir u razvoju imunoterapije tumora (178).

Toll-like receptori imaju važnu ulogu u infektivnim, upalnim i malignim bolestima. Razumijevanje značaja njihovog signalnog puta u patogenezi bolesti otkriva potencijal primjene njihovih liganada u klinici te u razvoju specifičnog imunomodulirajućeg liječenja uključujući i ciljanu antitumorsku terapiju.

1.2 Agonisti Toll-like receptora 7/8

TLR7 i TLR8 receptori su filogenetski i strukturno srodni članovi TLR obitelji, a zajedno s TLR9 čine jednu od šest TLR skupina (182). TLR7 i TLR8 lokalizirani su unutar stanice u endosomima, slično kao i TLR3 i TLR9, a smo manji dio TLR8 nalazi se na površini stanice (183-185). Ova četiri receptora čini grupu tzv. antivirusnih TLR-a. TLR7 i TLR8 su receptori jednolančane RNA (single stranded RNA – ssRNA) i smatraju se aktivatorima urođenog imunosnog odgovora na infekciju virusom. Sekvence RNA koje stimuliraju oba receptora nisu potpuno razjašnjene, ali se smatra da ssRNA bogata GU i poli-U sekvencama stimulira oba receptora (186-188). Način modifikacije nukleozida RNA utječe na raspoznavanje i razlikovanje virusne i ljudske ssRNA (189). Znanstveni i klinički interes za TLR7 i TLR8 u području tumorske biologije proizlazi iz antitumorske aktivnosti malih molekula koje djeluju kao agonisti jednog ili oba receptora (190-192).

Brojne su male molekule agonisti TLR7 i TLR8 dostupne na tržištu. Jedna od najpoznatijih i registrirana kao lijek je imikvimod (R837). Aktivira dominantno TLR7, a vrlo slabo TLR8 (183). Rezikvimod (R848) selektivni je ligand TLR7 u miševa te TLR7 i TLR8 kod ljudi. Izaziva jaču sekreciju citokina, aktivaciju makrofaga i stanični odgovor u usporedbi s imikvimodom (193-196). Gardikvimod aktivira TLR7, a tek u visokim koncentracijama TLR8. Sljedeći komercijalno dostupan spoj je CL075 koji značajnije stimulira TLR8, potiče sekreciju TNF-α i IL-12 u ljudskim PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), a manje aktivira TLR7. Nasuprot tome CL097 dominantno stimulira TLR7 aktivirajući NF-κB pri koncentraciji 0,1 μg/ml medija, dok je koncentracija od 1 μg/ml medija potrebna za isti učinak stimulacijom TLR8 (197-201). Zadnji u nizu spojeva je loksoribin (gvanozinski analog) čija je aktivnost uglavnom ograničena na TLR7 (183,202,203).

Ovisno koji receptor značajnije stimuliraju razlikuju se i učinci ovih molekula. Tako dominantno stimulacija TLR7 inducira sekreciju IFN-α i IFN-reguliranih kemokina kao I-TAC i IP-10, dok stimulacija TLR8 potiče sekreciju proinflamatornih citokina i kemokina uključujući i TNF-α i IL-12 te MIP-1α (197). Od značaja za antitumorski imunosni odgovor je učinak imidazokinolina na NK stanice. TLR8 agonisti značajnije neizravno aktiviraju NK stanice u odnosu na TLR7 agoniste (198).

1.2.1 Učinci na stanicu inducirani agonistima TLR7/8 receptora

TLR7/8 agonisti modificiraju upalni odgovor i stvaranje upalnih medijatora. Budući da dendritične stanice na stimulaciju imikvimodom reagiraju najvišim koncentracijama citokina smatraju se stanicama njegovog primarnog odgovora (204-206). Imikvimod također inducira funkcionalno sazrijevanje epidermalnih Langerhansovih stanica i stimulira njihovu migraciju u regionalne limfne čvorove gdje potiču T stanični odgovor (207). Stimulacija TLR7 ili TLR8 signalnih puteva imidazokinolinima rezultira aktivacijom centralnih transkripcijskih faktora, osobito NF-κB, koji induciraju transkripciju niza gena poput onih za citokine, kemokine, adhezijske molekule i proteine povezene s apoptozom (208). Topičko liječenje kutanih tumora i virusima uzrokovanih lezija imikvimodom rezultira pojačanom ekspresijom gena s funkcijom urođenog imuniteta (209,210) kao što su IFN-α, TNF-α, IL-2, -6, -8, -12, G-CSF i GM-CSF te mnogi kemokini (193,204-206,211). TLR7/8 agonisti induciraju i IFN-γ. Zbog navedenih učinaka imikvimod, kao TLR7/8 agonist, inducira infiltraciju subkutanog melanoma plazmacitoidnim dendritičkim stanicama na mišjem modelu (212). Može se zaključiti da citokini inducirani imikvimodom i TLR7/8 agonistima usmjeravaju imunološki odgovor prema TH1 tipu, a suprimiraju TH2 odgovor. Time se indirektno stimuliraju protutumorski citotoksični T limfociti i NK stanice (198,213-217) putem aktivacije i poticanja sazrijevanja antigen prezentirajućih dendritičnih stanica. Antitumorski odgovor također induciraju i izravno potičući nastanak antitumorskih dendritičnih stanica tzv. NKDC (natural killer dendritic cells) stanica koje počinju eksprimirati granzim B, perforine i TRAIL (218).

Zbog navedenih imunostimulirajućih svojstava ravijeni su i sintetski TLR7/8 agonisti, imidazokinolini koji su se u početnim ispitivanjima koristili kao potencijalni antivirusni lijekovi (219-221). Međutim, nakon što je potvrđen njihov protutumorski učinak u pretkliničkim istraživanjima (192), primjena imidazokinolina ušla je i u eksperimentalnu i kliničku onkologiju. Imikvimod se tako počeo koristiti u liječenju genitalnih bradavica uzrokovanih virusom HPV-a (222). Kliničke studije su pokazale njegovu djelotvornost i u liječenju bazeocelularnog karcinoma (223-227), keratoakantoma (228,229), aktiničkih keratoza (230-234), Bowenove bolesti (235,236), kutanih metastaza melanoma (237-240) te kutanih T-staničnih limfoma (241-244). Njegovoj učinkovitosti u liječenju navedenih bolesti doprinosi i još jedan važan antitumorski mehanizam, proapoptotski, koji je manje izražen kod drugih TLR7/8 agonista (218,245). Drugi sintetski agonisti TLR7/8, kao što je rezikvimod, ispituju se u kliničkim studijama kao potencijalni antivirusni lijekovi (246,247).

Temeljem navedenog može se zaključiti da imidazokinolini antitumorski učinak ostvaruju dominatno putem stimulacije sinteze proinflamatornih citokina, kao što je IL-12, aktivirajući signalne puteve TLR7/8 receptora i NF-κB, čime induciraju TH1 protutumorski stanično posredovani odgovor.

1.3 Uloga negativnih regulatora TLR signalog puta, IRAK-M i Bcl-3, u razvoju imunotoleracije u protrahiranoj sepsi i tumoru

Brojni klinički i eksperimentalni dokazi ukazuju da se kod pacijenata sa sepsom razvija stanje "imunopralize" tijekom razvoja bolesti. Nakon početnog snažnog proinflamatornog odgovora, inducira se antiinflamatorni odgovor koji ublažava jačinu upale i posljedično tome oštećenje tkiva. Smatra se da upravo taj protuupalni odgovor značajno doprinosi podložnosti ovih kritično bolesnih pacijenata sekundarnim bolničkim infekcijama. Ovakvo stanje imunosupresije u protrahiranoj sepsi povezuje se sa smanjenom reaktivnošću stanica monocitno-makrofagnog sustava (248,249). Naime, dokazano je da monociti periferne krvi pacijenata u protrahiranoj sepsi reagiraju znatno oslabljenom proizvodnjom proinflamatornih citokina na stimulaciju endotoksinom – lipopolisaharidom (LPS-om), agonistom TLR4, što se povezuje s lošijom prognozom ovih bolesnika (250-254). Opisano je nekoliko molekula koje posreduju u navedenom procesu imunosupresije. Za jednu od njih, IRAK-M (Interleukin-1 receptor-associated kinase – M), pokazano je da pozitivno korelira s mortalitetom u gram negativnoj sepsi (255). Štoviše, ekspresija IRAK-M je povećana i u uvjetima eksperimentalno inducinane endotoksinemije (256). IRAK-M negativan je regulator signalnog puta Toll like receptora u stanicama monocitno-makrofagnog sustava (85,257,258). Kao što je već opisano vežući se za molekulu IRAK-4, IRAK-M onemogućava nizvodni prijenos signala TLR-a tj. koči interakciju IRAK-4 i IRAK-1 te posljedično transkripciju proinflamatornih citokina – TNF-α i IL-12 (259). Ulogu IRAK-M u negativnoj regulaciji potvrđuju i istraživanja učinjena na transgenim životinjama s inaktiviranim „knock-out" genom za IRAK-M (IRAK-M$^{-/-}$ miševi), kod kojih se nakon stimulacije TLR-a u *ex vivo* testovima dobila značajno veća koncentracija proinflamatornih citokina u odnosu na kontrolne životinje „wild type" (260). U istom istraživanju pokazana je i zaštitna uloga inaktivacije gena za IRAK-M. Tako IRAK-M$^{-/-}$ miševi imaju značajno viši postotak preživljenja tijekom 10 dana gram negativne bakterijemije (80%) u odnosu na kontrolne „wild type" životinje (0%).

Slično njezinoj ulozi u sepsi, istraživanja su pokazala ulogu IRAK-M u imunosupresiji izazvanoj tumorima (261). Najbolji dokaz za to su IRAK-M$^{-/-}$ miševi, koji su rezistentni na rast inokuliranih tumorskih stanica za razliku od kontrolnih životinja (262). Iako monociti periferne krvi imaju potencijalno citotoksičan učinak na tumorske stanice, nakon što infiltriraju tumor monociti – makrofazi, i budu izloženi TLR4 agonistu - hijaluronskoj kiselini (HA) koju proizvode tumorske stanice, oni počinju eksprimirati IRAK-M, smanjeno lučiti citokine važne za protutumorski odgovor (IL-12), poprimaju deaktivirani fenotip i počinju podupirati tumorski rast (263), a njihov povećani broj nosi lošiju prognozu kao što je pokazano na primjeru karcinoma dojke (264). Stoga oni postaju novi cilj terapijskih intervencija. Uzimajući u obzir navedena istraživanja, može se zaključiti da je imunosupresija povezana sa sepsom i tumorima posredovana sličnim signalim putevima, te da ovisi o protrahiranoj stimulaciji agonista TLR4.

Drugi negativni regulator signalnog puta TLR4 je molekula B-cell leukemia-3 (Bcl-3), također inducirana stimulacijom lipopolisaharidom (LPS). Uloga Bcl-3 je stabilizacija kompleksa transkripcijskih faktora p50 što dovodi do inhibicije transkripcije gena i smanjene proizvodnje citokina. U kulturi makrofaga pokazano je da Bcl-3 smanjuje odgovor proinflamatornih citokina nakon stimulacije LPS-om (265). Sukladno tome Bcl-3$^{-/-}$ miševi i Bcl-3$^{-/-}$ stanične kulture preosjetljive su na TLR aktivaciju te ne mogu kontrolirati odgovor na LPS (266). Ekspresija Bcl-3 tako ima ulogu u ograničavanju upalnog i imunološkog odgovora kao posljedice stimulacije TLR receptora. Bcl-3 posreduje još jedan važan mehanizam imunosupresije. U radu Grundsrom i sur. (267) opisana je njegova uloga kao transkripcijskog represora sinteze IL-2 CD4+ T limfocita, te tako posreduje u razvoju njihove tolerancije.

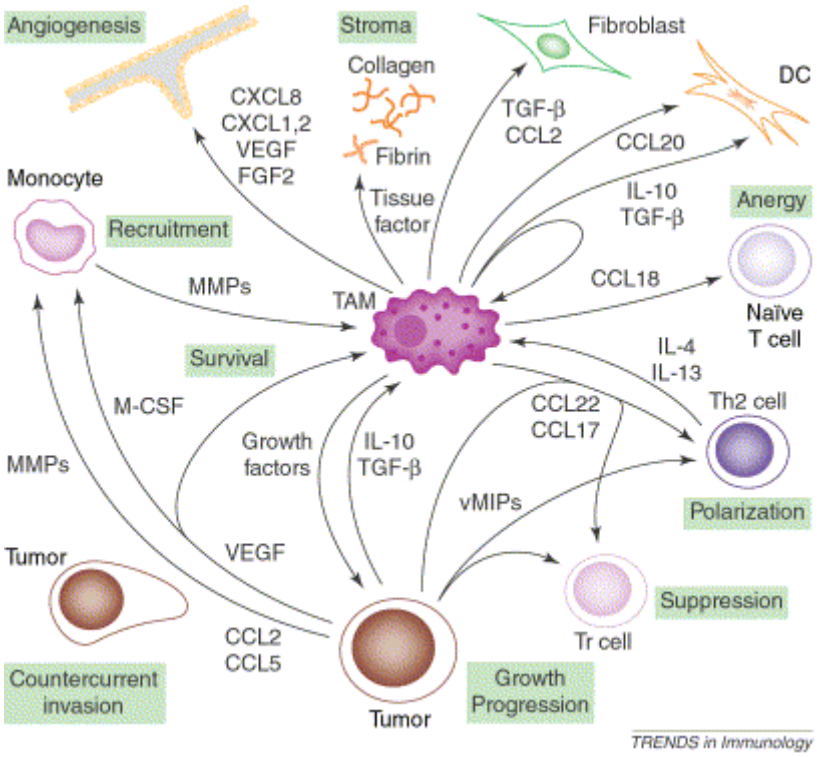
1.4 Polarizirani M2 makrofazi

Navedeni negativni regulatori TLR signalnog puta IRAK-M i Bcl-3 eksprimirani su u tzv. M2 polariziranom fenotipu makrofaga primjer kojih su makrofazi koji infiltriraju tumorsko tkivo te monociti periferne krvi septičnih pacijenata. Među ostalim čimbenicima upravo i ove dvije molekule doprinose M2 fenotipu monocita/makrofaga.

Sami M2 makrofazi – ili alternativno aktivirani makrofazi čine ekstrem kontinuuma funkcijskih stanja (od M1 do M2) koja su inducirana različitim signalima iz mikrookoliša. Različiti fenotipovi makrofaga razlikuju se u ekspresiji receptora, sintezi citokina i kemokina te efektorskim funkcijama. Tako M1 fenotip stvara IL-12, važan za poticanje protutumorskog i protuvirusnog imuniteta, kao i TNF-α i i niz prinflamatornih citokina, dok M2 makrofazi proizvode imunosupresivni IL-10, TGF-β te antagonist receptora IL-1 (IL-1ra), ublažavaju upalni i stečeni Th1 imuni odgovor, odstranjuju stanični debri te potiču angiogenezu, tkivno remodeliranje i obnovu (268,269). IL-14, IL-13, IL-10 i glukokortikoidi, te TLR4 agonisti kao što su hijaluronska kiselina u tumoru i lipopolisaharid u protrahiranoj sepsi, potiču alternativno aktivirani fenotip makrofaga i polariziraju tip II odgovora. Navedeni stimulusi (TLR4) induciraju negativne regulatore TLR signalnog puta IRAK-M i Bcl-3, čija ekspresija također karakterizira upravo tumor infiltrirajuće makrofage i endotoksin tolerantne monocite u sepsi (263,267,270-272).

Kao što je već navedeno, makrofazi koji infiltriraju tumore (Slika 5), kao i oni u protrahiranoj sepsi, polariziranog su M2 fenotipa, slabije prezentiraju antigene suprimiraju aktivaciju i proliferaciju T limfocita, oslobađajući prostaglandine, IL-10 i TGF-β (273-280). Oni također stvaraju niz čimbenika rasta koji mogu poticati rast tumora, neoangiogenezu i razgradnju vezivnog tkiva kao što su EGF, FGF, TGF-β, VEGF, kemokini, metaloproteinaze MMP9, uPA (281). Tako stvorene metaloproteinaze imaju veće značenje od same razgradnje vezivnog tkiva, one naime promoviraju i angiogenezu i oslobađanje drugih faktora rasta potrebnih tumoru (282-283). Smatra se da ovako alternativno aktivirani makrofazi koji potiču angiogenezu, remodeliranje tumorske strome i disfunkciju citotoksičnih T limfocita, podržavaju rast tumora, slabe imunološki odgovor te da su mogući uzrok nedjelotvornosti antitumorskih vakcina (284). Stoga su se počele istraživati brojne ciljane antitumorske terapijske intervencije koje bi smanjile utjecaj ili broj ovih stanica te tako smanjile rast tumora.

Slika 5. Tumorski makrofazi s polariziranim M2 fenotipom.



1.5 SVRHA ISTRAŽIVANJA

Naše istraživanje usmjeno je upravo na traženje potencijalnog puta reaktivacije ili promjene fenotipa alternativno aktiviranih makrofaga kako bi smanjili njihov utjecaj na subverziju imuniteta u sepsi i malignim bolestima. Reaktivacija bi uključila ponovnu uspostavu sinteze citkina kao što je IL-12 važan za indukciju protutumorskog i protuvirusnog imuniteta te snižavanje negativnih regulatora TLR signalnog puta, IRAK-M i Bcl-3. Kako bi se to postiglo korišten je TLR7/8 agonist CL097 zbog njegovih već ranije opisanih imunostimulirajućih učinaka. Potencijalno reaktivirajući učinak CL097 najprije je testiran na modelu hiporeaktivnih monocita, a kasnije je istraživanje prošireno i na njegovu *ex vivo* primjenu na perifernoj krvi pacijenata sa sepsom i malignim diseminiranim tumorima gdje je također procijenjeno njegovo imunostimulirajuće djelovanje.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

2.1 CILJ ISTRAŽIVANJA

Do sada je opisano deset različitih humanih TLR receptora, važnih u posredovanju prirođene i stečene imunosti (285). Istražena je njihova uloga ne samo u stimulaciji imunološkog odgovora već i u imunosupresiji. Tako protrahirana stimulacija TLR4 receptora izaziva hiporeaktivnost monocita/makrofaga, koje nalazimo u krvi pacijenata s protrahiranom sepsom i u tumorskom tkivu, te se smatra odgovornom za endotoksinom izazavanu toleranciju i deaktivaciju monocita u tumoru. Tako promijenjeni monociti/makrofazi pokazatelji su lošije prognoze, te bi uspostavljenje njihovog aktivnijeg fenotipa moglo biti od važnosti u postizanju učinkovitijeg antitumorskog i antimikrobnog odgovora.

U navedenom primjeru hiporeaktivnih monocita/makrofaga dolazi do negativne regulacije signalnog puta TLR4 receptora te posljedično tome do manje proizvodnje proinflamatornih citokina. Malo je poznato o utjecaju drugih TLR agonista na negativnu regulaciju signalnog puta TLR4, te može li se on reaktivirati kada je jednom deaktiviran. Otkriveno je da kostimulacija TLR4 i TLR7/8 receptora dovodi do sinergističkog učinka na proizvodnju proinflamatornih citokina poput TNF-α i IL-12 (257,270,286-291), što upućuje da dva navedena agonista TLR-a aktiviraju proizvodnju citokina dvama različitim signalnim putevima.

Ovi rezultati navode na razmišljanje da bi TLR 7/8 agonisti mogli zakočiti ekspresiju negativnih regulatora TLR signalnog puta, kao što su IRAK-M i Bcl-3. TLR 7/8 agonisti molekule su jednolančane RNA ili sintetski imidazokinolinski spojevi poput CL097 (271) ili rezikvimoda. Ovi su spojevi do sada u klinici našli primjenu kao adjuvansi cjepiva protiv virusa hepatitisa B, a istražuju se i u fazi II kliničkih studija liječenja infekcije virusom hepatitisa C (272). U našem bi se istraživanju CL097 pokušao primijeniti u svrhu umanjivanja imunosupresije uzrokovane protrahiranom stimulacijom TLR4 receptora monocita/makrofaga. Stoga bi ciljevi ovoga rada bili:

(1) istražiti može li TLR 7/8 agonist CL097 umanjiti ekspresiju proteina IRAK-M i Bcl-3, negativnih regulatora TLR4 signalnog puta, važnih za izazivanje hiporeaktiviteta

monocita (hiporeaktivitet postignut prolongiranom stimulacijom TLR 4 agonistima – LPS i HA; tako promijenjeni monociti odgovaraju onim u bolesnika sa sepsom i tumor infiltrirajućim makrofazima),

(2) ispitati učinak TLR7/8 agonista CL097 na proizvodnju citokina (TNF-α, IL-12, IL-10) i ekspresiju površinskih staničnih biljega u kulturi hiporeaktivnih monocita, te tako prikazati potencijalni učinak stimulacije TLR 7/8 agonistom na uspostavljanje aktiviranog imunofenotipa monocita, važnog u antitumorskom i antimikrobnom imunološkom odgovoru.

(3) usporediti imunoreaktivnost (stvaranje citokina nakon *ex vivo* stimulacije TLR agonistima) pune krvi bolesnika sa sepsom i malignim diseminiranim tumorima s onom zdravih dobrovoljaca.

(4) pokušati *ex vivo* modulirati promijenjenu imunoreaktivnost krvi navedenih bolesnika stimulacijom TLR 7/8 agonistom.

2.2 HIPOTEZA

Na temelju iznesenog postavljena je sljedeća hipoteza istraživanja:

„Agonist Toll like receptora 7/8 - CL097 inhibira ekspresiju negativnih regulatora signalnog puta Toll like receptora 4 – molekula IRAK-M i Bcl-3 važnih za hiporeaktivitet monocita.“

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA, BIOLOŠKI UZORCI I ISPITANICI

3.1 Biološki uzorci

U svrhu istraživanja koristili su se uzorci periferne krvi bolesnika sa solidnim malignim tumorima u stadiju metastatske bolesti i bolesnika sa sepsom te zdravih dobrovoljaca. Bolesnicima i zdravim dobrovoljcima jednokratno je izvađena 1 epruveta (9 ml) periferne krvi u svrhu *ex vivo* stimulacije agonistima Toll-like receptora (TLR) radi ispitivanja imunoreaktivnosti. Također je uzet uzorak od 90 ml periferne krvi zdravim dobrovoljcima radi izolacije, kultivacije i *ex vivo* stimulacije monocita te istraživanja njihovog imunološkog odgovora.

3.2 Ispitanici i kontrolna skupina

U istraživanje je uključeno 12 bolesnika sa solidnim malignim tumorima (prosječna dob 72 godina), 12 bolesnika sa septičkim šokom (prosječna dob 59 godina) hospitaliziranih na Klinici za kirurgiju, Algemeines Krankenhaus u Beču i 15 zdravih dobrovoljaca (prosječna dob 32 godina). Pacijenti s metastatskom malignom bolesti imali su karcinom kolona (n=4), gušterače (n=5), dojke (n=1), kolangiocelularni karcinom (n=1) i karcinom bronha (n=1) te unazad 4 tjedna nisu bili podvrgnuti kirurškom zahvatu, niti su primili kemo- ili imunoterapiju. Svi bolesnici sa septičkim šokom bili su na adrenergičkoj potpori (katekolamini > 0,1 μg/kg/min) te je šok trajao dulje od 3 dana. Svi su pacijenti bili mehanički ventilirani. Septičko žarište bilo je kod 6 pacijenata u trbuhu (perforacija kolona, pankreatitis), kod 4 u plućima (pneumonija) te je kod 2 pacijenta sepsa bila neodređenog podrijetla. Broj ispitanika/dobrovoljaca odabran je na temelju literaturnih podataka i male varijacije rezultata. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Beču, te potvrdilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Od svih je pacijenata i dobrovoljaca dobiven informirani pristanak.

3.3 Materijali

Izolirani monociti kultivirani su u mediju RPMI 1640+GlutaMax-I (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) uz dodatak 10% FCS (fetalnog telećeg seruma; GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) i antibiotika (100 IU/ml penicilina, 10 µg/ml streptomicina, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA). Sustav MACS LS separacijskih stupaca i anti-CD14 magnetnih čestica kupljeni su od Miltenyi Biotech (Auburn, CA). LPS koji smo koristili je LPS E. coli O55:B5 pročišćen ionskom kromatografijom od Sigma Aldrich (St. Louis, MO), TLR-7/8 ligand CL097 (www.invivogen.com/PDF/CL097_TDS.pdf) od Invitrogen, Carlsbad, CA i kalijeva sol hijaluronske kiseline od Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Primarno anti IRAK-M protutijelo za Western blot kupljeno je od Chemicon International (Temecula, CA), primarno Bcl-3 protutijelo od Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), sekundarni anti-zečji IgG Cy5 konjugat od Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Određivanje citokina TNF-α, IL-10 i IL-12 u supernatantu kulture stimuliranih stanica i iz plazme, nakon *ex vivo* stimulacije pune krvi, učinjeno je pomoću ELISA kita od R&D Systems (Minneapolis, MN). Protutijela označena florokromima za protočnu citometriju su: FITC konjugirana protutijela protiv CD14 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), CD80 (Immunotech, Marseille, FR) i CD40 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) te PE konjugirana protutijela protiv CD14, receptora za manozu - MR (Immunotech, Marseille, FR), TLR2 i TLR4 (eBioscience, San Diego, CA). Stanična linija MCF-7 kupljena je od ATCC (Manassas, VA). Za neutralizaciji IL-10 korišteno je monoklonsko anti-humano IL-10 protutijelo (R&D Systems, Minneapolis, MN).

3.4 Metode

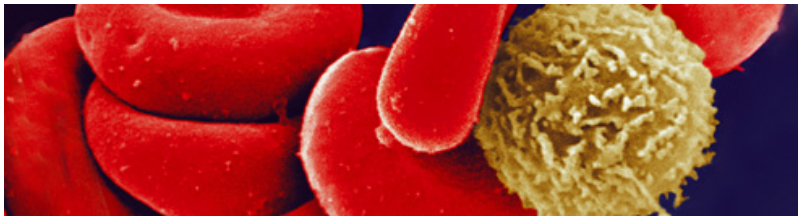
3.4.1 Izolacija, kultivacija i *ex vivo* stimulacija makrofaga dobivenih od monocita

Izolacija mononukleara periferne krvi (PBMC) i monocita (CD14+ stanica) iz pune krvi: Mononukleari periferne krvi (PBMC - peripheral blood mononuclear cells) zdravih pacijenata izolirani su centrifugiranjem u Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska). Iz PBMC – monociti, odnosno CD14 pozitivne stanice, dalje su izolirane tehnologijom MACS stupaca, koja se temelji na upotrebi MACS MicroBeads (mikročestica), MACS LS Columns (koloni) i MidiMACS separatora (Slika 6). MACS MicroBeads – mikročestice, sastoje se od protutijela vezanih za vrlo male,

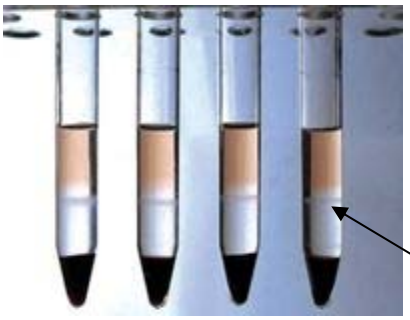
superparamagnetične čestice. Protutijela su usmjerena na različite površinske stanične markere specifične za T, B limfocite, NK stanice ili kao u našem slučaju monocite (anti CD14). MACS kolone su plastični stupci koji u svom središnjem dijelu sadrže feromagnetične čestice, a pričvršćuju se u MidiMACS separator, držač s vrlo jakim magnetnim poljem. Tek smještanjem u separator, MACS kolona dobiva trajna magnetska svojstva. Proces izolacije stanica protječe na sljedeći način. Pri prolasku kroz kolonu stanice označene s MACS mikročesticama zaostaju u koloni zbog jakog magnetnog polja, dok neoznačene stanice samo prolaze kroz kolonu. Na posljetku se stanice zaostale u koloni izdvoje na način da se kolona odstrani iz separatora, time gubi magnetna svojstva, a stanice se dobiiju ispiranjem i protiskivanjem kolone MACS puferom. MACS kolone su specijalizirane za separaciju stanica promjera do 30 μm – monocita, T ili B limfocita te NK stanica, a LS MACS kolone, koje su korištene u našim eksperimentima, prilagođene su za maksimalni ulazni broj stanica $2x10^9$, a maksimalni broj izoliranih stanica iznosi 10^8.

Postupak se odvija na sljedeći način. Nakon izolacije PBMC, stnice se isperu u MACS puferu, te inkubiraju tijekom 16 min na ledu s CD14+ MACS česticama (u koncentraciji 20 μl/10^7 st.) u MACS puferu (80 μl/10^7 st.). Stanična suspenzija PBMC nanese se u LS kolonu, u midiMACS separatoru. Magnentno označene CD14+ stanice ostaju u koloni, dok se neoznačene ispiru. Nakon odstranjivanja LS kolone iz magnetnog polja separatora, magnetno označene stanice CD14+ dobiju se protiskivanjem kroz kolonu.

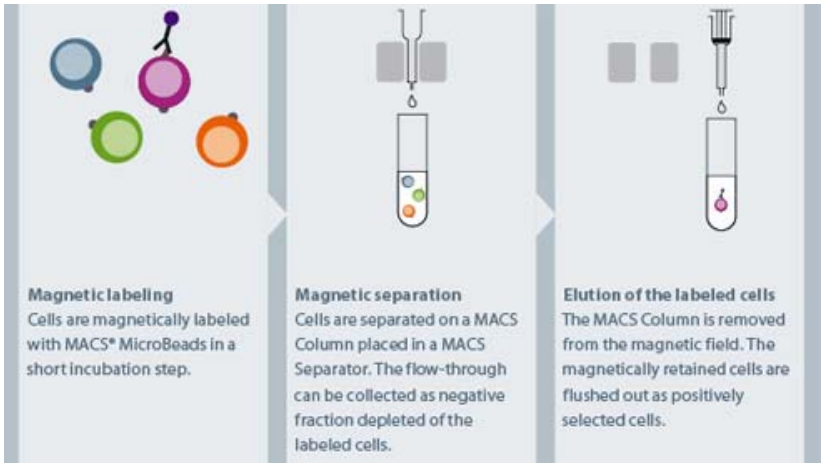
Slika 6. Postupak izolacije monocita iz periferne krvi: a) periferna krv; b) izolacija PBMC centrifugiranjem u Ficollu; c) označavanje PBMC s MACS MicroBeads – mikročesticama i pozitivna separacija MACS tehnologijom; d) MACS LS kolona u MidiMACS separatoru; e) izolirani monociti.



a) periferna krv



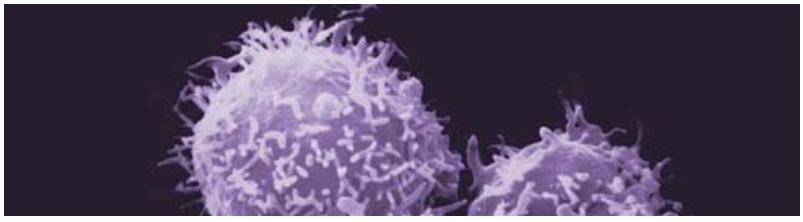
b) izolirani PBMC



c) označavanje PBMC s magnetnim mikročesticama; prolaz neoznačenih stanica kroz kolonu; ispiranje označenih stanica iz kolone nakon pomicanja kolone iz separatora



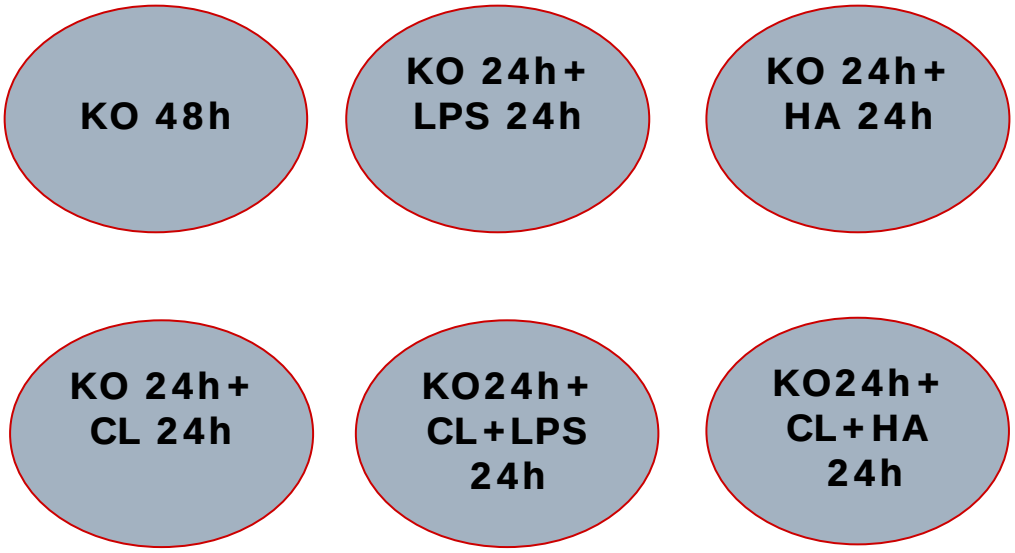
d) separator s kolonom



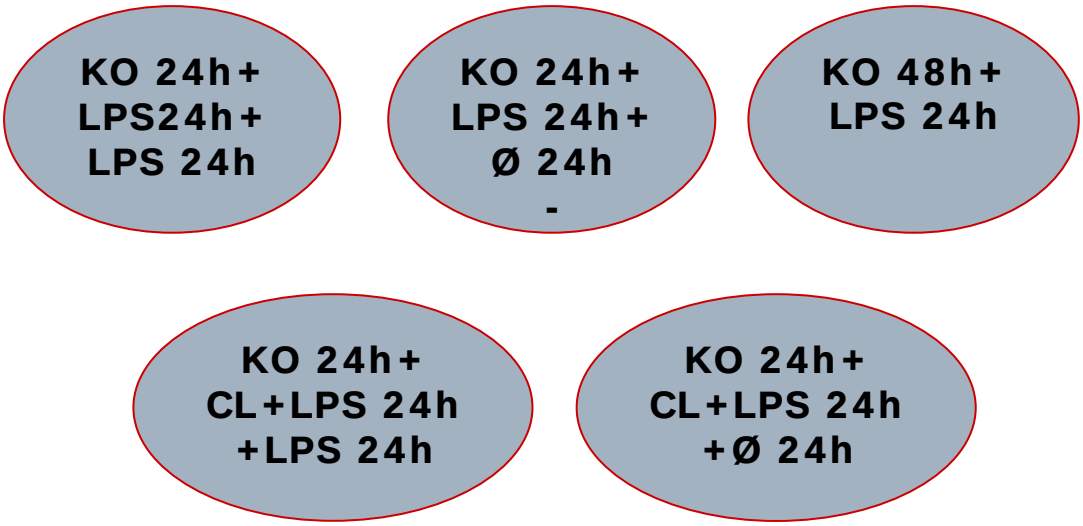
e) izolirani monociti

Kultivacija CD14+ stanica i *ex vivo* stimulacija TLR agonistima: CD14+ stanice su kultivirane tijekom 24 h u multiwell pločama (sa 6 jažica, gustoća stanica: $1,25x10^6$ stanica/ml/jažici ploče) u RPMI 1640+GlutaMax-I mediju s dodatkom 10% FCS (fetalnog calf seruma - fetalnog telećeg seruma) i antibiotika (100 IU/ml penicilina i 100 μg/ml streptomicina). Nakon početne kultivacije od 24 sata, stanice su stimulirane TLR4 ligandima (lipopolisaharidom - LPS ili hijaluronskom kiselinom - HA) samim ili u kombinaciji s TLR7/8 agonistom CL097 tijekom sljedećih 24 sata. Dio stanica ostavljen je 48 sati u kulturi bez stimulacije kao kontrola. Dizajn eksperimenta prikazuje Slika 7. U pokusu neutralizacije učinka IL-10 blokirajućim protutijelom, izolirane stanice kultivirane su 24 sata, zatim su inkubirane s monoklonskim anti humanim IL-10 protutijelom u koncentraciji 5 μg/ml tijekom jednog sata, nakon čega dalje stimulirane s LPS/HA/CL097 na prethodno opisan način. U eksperimentu s ponovljenom LPS stimulacijom nakon početne kultivacije od 24 sata, stanice su stimulirane s LPS-om s ili bez dodatka CL097 tijekom sljedećih 24 sata, nakon čega su isprane i dodatno stimulirane s LPS-om 24 sata ili su ostavljene u kulturi bez stimulacije kao što je prikazano na Slici 8. Za pokus sa stimulacijom makrofaga tumorskim supernatantom (sadrži hijaluronsku kieslinu) u kulturu je dodan tijekom svih 48 sati tumorski supernatant sa ili bez dodatka CL097 tijekom drugih 24 sata kulture. Za stimulaciju LPS je razrijeđen u 0,9% NaCl (Mayrhofer Pharmazeutika Linz, Austria) i primijenjen u koncentraciji 100 ng/ml medija. CL097 je razrijeđen u vodi pročišćenoj od endotoksina (InvivoGen, Carlsbad, CA) na koncentraciju od 2,5 μg/ml medija (prema preporuci proizvođača). Tumorski supernatant dobiven je 24 satnom kultivacijom stanične linije MCF-7 karcinoma dojke, filtriran je i dodan u kulturu makrofaga kao 20% dio volumena medija. Kalijeva sol hijaluronata HA je resuspednirana u PBS -/- (Phosphate buffered saline; GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) i primijenjena u koncentraciji 200 μg/ml medija, što odgovara koncentraciji koja dovodi do maksimalne proizvodnje TNF-α, nakon čega nastupa faza zasićenja (prema našim eksperimetalnim podacima).

Slika 7. Grafički prikaz dizajna eksperimenta stimulacije monocita – 48h.



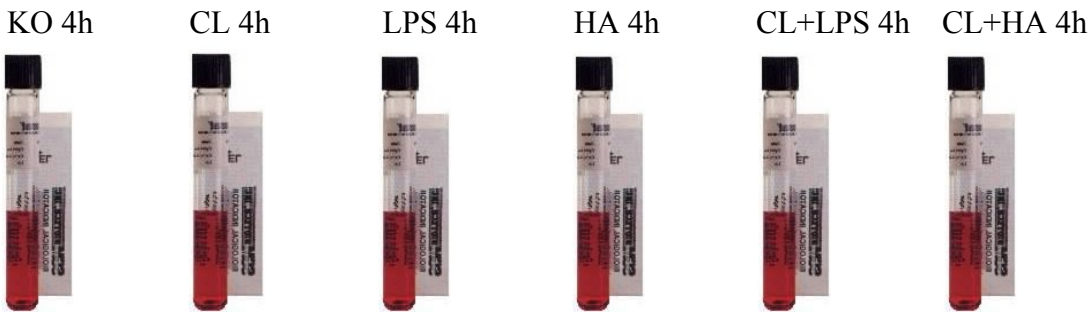
Slika 8. Grafički prikaz dizajna eksperimenta stimulacije monocita – 72h.



3.4.2 *Ex vivo* stimulacija pune krvi

Radi stimulacije pune krvi pacijenata i zdravih dobrovoljaca izvađeno je 9 ml pune krvi u heparinizirane epruvete (Lithium Heparin, Vacuette, Greiner bio-one, Kremsmuenster, Austria) u kojima je i učinjena stimulacija *ex vivo* s TLR4 agonistom: LPS-om (100 ng/ml) ili HA (200 μg/ml), s ili bez dodatka TLR 7/8 agonista CL097 (2,5 μg/ml) ili bez stimulacije (Slika 9). Tako stimulirana krv kultivirana je na 37 ˚C tijekom 4 sata. U pokusu *ex vivo* stimulacije pune krvi zdravog dobrovoljca hijaluronskom kiselinom radi dobivanja vremensko/dozne kinetike citokina TNF-α, puna krv je stimulirana s HA u sljedećem rasponu doza: 0 μg/ml, 1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 500 μg/ml, 1000 μg/ml tijekom 1, 2, 4, 8 i 20 sati.

Slika 9. Dizajn eksperimenta stimulacije pune krvi ex vivo.

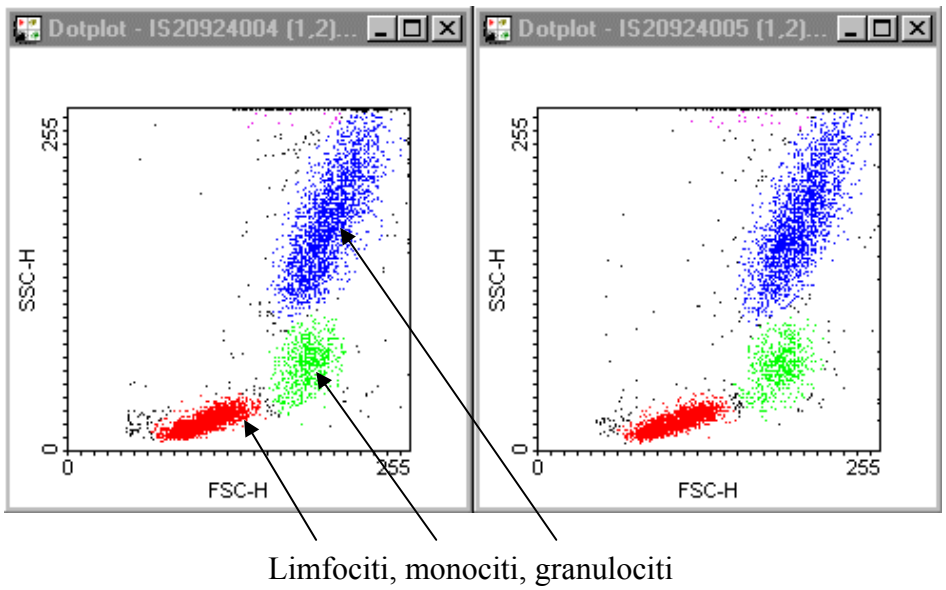


3.4.3 Identifikacija makrofaga dobivenih iz monocita i određivanje TLR2, TLR4, MR, CD40 i CD80 protočnom citometrijom

Protočna citometrija je metoda kojom se određuje broj i analiziraju svojstva mikroskopskih čestica ili stanica raspršenih u mlazu tekućine. Ona istodobno omogućuje multiparametrijsku analizu fizikalnih i kemijskih karakteristika pojedinačnih stanica koje protječu kroz optički i/ili elektronički detektorski sustav. Metoda se temelji na sljedećem principu. Laserska zraka određene valne duljine usmjerava se na hidrodinamički fokusiran mlaz tekućine. Na mjestu gdje mlaz prolazi kroz lasersku zraku usmjereno je nekoliko detektora, jedan paralelan s laserskom zrakom (Forward Scatter - FSC) i nekoliko okomitih na nju (Side Scatter SSC) te jedan ili više detektora fluorescencije. Svaka raspršena čestica/stanica promjera od 0,2 do 150

μm koja prođe kroz lasersku zraku na specifičan način raspršuje svjetlost, a fluorescentne tvari na česticama su pobuđene i emitiraju svjetlost veće valne duljine od svjetlosnog izvora. Ovu kombinaciju raspršenog i fluorescentnog svjetla bilježe detektori. Analizom fluktuacija svjetline na svakom detektoru (po jedan za svaki fluorescentni emisijski vršak) moguće je dobiti podatke o fizikalnoj i kemijskoj strukturi čestica/stanica. Tako na primjer FSC korelira s volumenom stanica, a SSC ovisi o njihovoj unutrašnjoj građi (obliku jezgre, količini i tipu citoplazmatskih granula ili građi membrane). Suvremeni protočni citometri mogu analizirati nekoliko tisuća čestica/stanica u sekundi te imaju nekoliko lasera i detektora fluoresecencije (standardno – 4 lasera i 18 detektora) što omogućuje analizu stanica višestruko obilježenih protutijelima s različitim fluorescentnim bojama. Protutijela su usmjerena na različite ekstra- i intracelularne molekule stanica. Time se postiže bolja identifikacija ciljne populacije stanica odnosno njihova fenotipizacija. Podaci dobiveni protočnom citometrijom mogu se prikazati jednodimenzionalno – u tzv. histogramima ili u dvije dimenzije – u točkastim dijagramima (Slika 10), te u tri dimenzije. U dijagramima se mogu izdvojiti regije prema FSC, SSC i intenzitetu fluorescencije i izdvojiti različite populacije stanica.

Slika 10. Prikaz populacija leukocita protočnom citometrijom (točkasti dijagram): limfocita, monocita i granulocita.



U našim eksperimentima korišten je sljedeći protokol za pripremu stanica za analizu protočnom citometrijom te uređaji i softver za analizu dobivenih podataka: nakon kultivacije i stimulacije s TLR agonistima CD14+ stanica izoliranih MACS metodom, stanice su prikupljene radi određivanja ekspresije površinskih markera CD14, TLR2, TLR4, MR, CD40 i CD80. Stanice su nakon izolacije kultivirane tijekom 24 sata, te stimulirane tijekom daljnjih 24 sata s HA ili LPS-om, s ili bez dodatka CL097, ili su ostavljene u kulturi bez stimulacije kao kontrole. Nakon prikupljanja stanice su dva puta isprane s PBS-/- s 1% FCS-om te s 0,1% natrij azidom. Nakon toga su inkubirane s protutijelima s florokromima (CD14, TLR2, TLR4, MR, CD40 i CD80) tijekom 20 minuta na ledu, nakon čega su isprane tri puta PBS-/- s navedenim dodacima. Ekspresija navedenih markera analizirana je protočnim citometrom FC500 (Beckmann Coulter, Fullerton, CA). Po uzorku je zabilježeno i analizirano najmanje 2500 CD14+ stanica. Podaci su analizirani softwerom CXP (Beckmann Coulter).

3.4.4 Western blot analiza ekspresije proteina IRAK-M i Bcl-3

Za navedenu analizu Western blotom proteini su izolirani iz stanične kulture makrofaga metodom zamrzavanja i otapanja te sonikacijom (ultrazvučnim razbijanjem) u puferu za lizu. Tako izolirani proteini se nalaze u otopini te se od membrana i nukleinskih kiselina izdvajaju centrifugiranjem. Obzirom da se tijekom izolacije oslobađaju proteaze, u pufer za lizu se moraju dodati inhibitori proteaza, a izolacija se mora učiniti u što kraćem roku i u ohlađenim instrumentima kako bi se proteoliza usporila. Nakon izolacije koncentraciju proteina u uzorcima određujemo Bradford protein esejem. To je kolorimetrijska metoda koja se temelji na spektroskopskom mjerenju promjene apsorbancije Coomassie boje iz crvene u plavu nakon vezivanja boje za proteine. Porast apsorbancije je proporcionalan količini vezane boje i tako količini odnosno koncentraciji proteina u uzorku. Masa ukupnih proteina po uzorku koji će se analizirati Western blotom mora biti jednaka (npr. 20 μg). Time se osigurava jednako nanošenje ukupne količine proteina po uzorku. Stoga je potrebno izračunati volumen uzorka koji odgovara toj masi, a izračunava se iz dobivene vrijednosti koncentracije. Detalji protokola za izolaciju proteina navedeni su niže u tekstu.

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu proteina IRAK-M i Bcl-3 korištena je metoda Western blot (Slika 11). To je analitička metoda koja se koristi za određivanje specifičnih proteina iz

uzorka – proteinskog ekstrakta. Kada nije potrebno odrediti biološku aktivnost proteina (enzimska aktivnost, receptorska aktivnost itd.) koje analiziramo, već samo identificirati protein, nije potrebno održati nativne uvjete i 3D strukturu proteina. U nativnim uvjetima, uzorak proteina često se agregira i nije ga moguće razdvojiti elektroforezom. Kako je u našem slučaju bilo potrebno samo identificirati protein, za razdvajanje proteina nisu korišteni nativni uvjeti, već denaturirajući – gdje se gubi sekundarna, trecijarna i kvaternarna struktura proteina. Deanturacija je postignuta otapanjem proteina u merkaptoetanolu (Laemmli puferu; koji reducira disulfidne veze) i zagrijavanjem uzorka na 95˚C te upotrebom SDS-a (sodim dodecyl sulphat – natirij dodecil sulfata) – anionskog detergenta u gelu i puferu za elektroforezu. SDS-om se osim denaturacije i disocijacije na podjedinice proteina, povećava i njihova ukupna topljivost te tako izbjegava stvaranje proteinskih agregata. Tako obrađeni proteini razdvojeni su na pojedinačne polipeptidne lance koji se upotrebom SDS-PAGE (poliakrilamid gel elektroforeze) elektroforeze razdvajaju prema veličini. Naime većina proteina može vezati 1,4 g SDS-a po gramu proteina, maskirajući naboj polipeptidnih lanaca tako da neto naboj po jedinici mase bude približno konstantan. Elektroforetsko razdvajanje stoga ovisi samo o efektivnom promjeru molekule koji odgovara relativnoj molekulskoj masi, a rezultat je isključivo efekta sita u gelu. Koncentracijom poliakrilamida u gelu prilagođava se rasponu molekulskih masa proteina koje želimo razdvojiti (veći protein - manji postotak i obrnuto). Gel se sastoji od gela za koncentriranje i gela za razdvajanje. Uzorci se nanose na gel za koncentriranje u kojem je niža koncentracija poliakrilamida te se prolaskom kroz njega proteini razdvajaju na oštre pruge. Na granici dva gela uzorci proteina se suze u uske startne vrpce te se tako postiže bolja moć razlučivanja. Prolaskom kroz gel za razdvajanje, s višom koncentracijom poliakrilamida, razdvajaju se proteini prema molekulskoj masi. Za kalibraciju gel sustava koristi se set proteina poznatih molekulskih masa koji se razdvoji, a potom vizualizira zajedno s analiziranim uzorcima. Po završenoj elektroforezi proteini se prebacuju iz gela na nosač - nitrocelulozu membranu, čime se proteini imobiliziraju na površini membrane i lako su dostupni za interakcije s antitijelima. Prijenos proteina izvodi se primjenom električnog polja okomitog na ravninu gela (electroblotting). Gel i membrana se smještaju između dva snopa filter papira u plastične mrežice u uređaj za blot u kojem se nalazi pufer za prijenos koji omogućuje kontakt s elektrodama. Primjenom električnog polja negativno nabijeni proteini putuju prema pozitivnoj elektrodi i zaustavljaju se na membrani. Proteini se adsorbiraju na nitrocelulozu membranu hidrofobnim i elektrostatskim interakcijama, ne vežu se kovalentno. Nakon prijenosa proteini se fiksiraju (precipitiraju i imobilziraju na membrani; otopinom octene kiseline i etanola) te se mogu prikazati

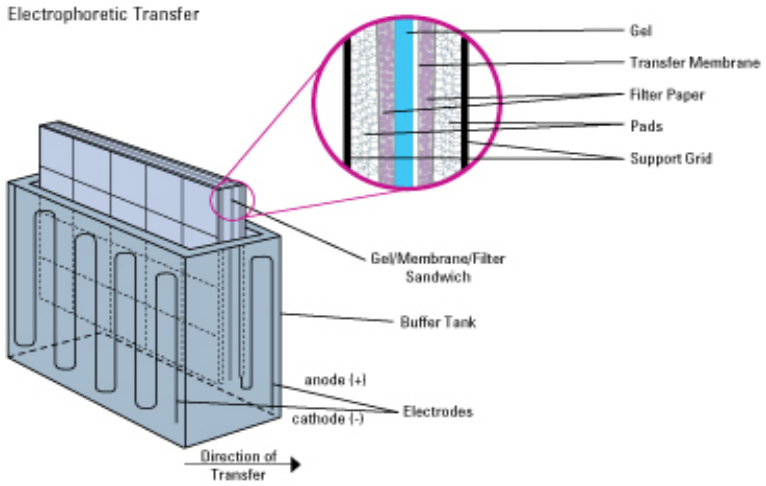
primjenom metoda za bojenje ukupnih proteina – u našem slučaju bojenje Rutheniumom, nakon čega se skeniranjem membrane i kvanitativnom analizom slike provjerava jednako nanošenje uzoraka proteina. Za detekciju specifičnog proteina, prije reakcije s protutijelima, moraju se blokirati nespecifična vezna mjesta koja se nalaze na samoj membrani, a na koja se nisu vezali prenešeni proteini. To se postiže inkubacijom s bezmasnim mlijekom u prahu. Proteini čiju prisutnost i količinu želimo dokazati se zatim prikazuju specifičnim detekcijskim sustavima – u našem slučaju protutijelima obilježenim fluorescentnom bojom. Postupak se odvija u dva koraka – membrane se najprije inkubiraju s primarnim protutijelom specifičnim za traženi protein, nakon čega se ispiru kako bi se odstranio višak nevezanih protutijela. Zatim se inkubiraju sa sekundarnim protutijelom species specifičnim za primarno protutijelo, a koje je konjugat s fluoresecentnom bojom. Sada se na membrani mogu detektirati proteini od interesa za koje su vezana specifična protutijela (fluoreseceirajuće proteinske pruge) skeniranjem gela. Obradom slike može se napraviti kvalitativna i kvantitativna analiza Western blota.

Slika 11. Prikaz postupaka u Western blotu:

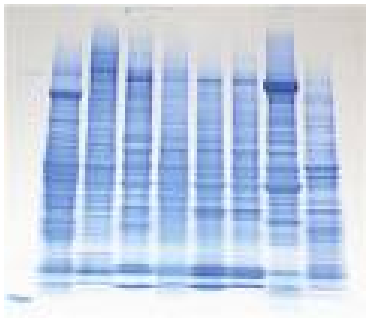
a) elektroforeza proteina



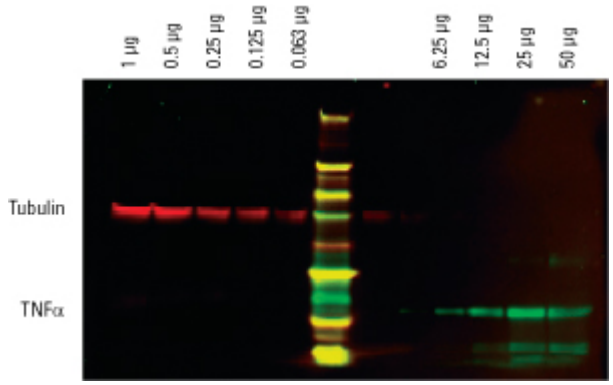
b) transfer proteina s gela na membranu (electroblotting)



c) prikaz ukupnih proteina na membrani



d) prikaz specifičnog proteina protutijelom označenim fluorescentnom bojom



U nastavku su navedeni detalji protokola za izolaciju proteina i metode Western blota korištenih za određivanje razine proteina IRAK-M i Bcl-3.

Nakon stimulacije s TLR agonistima kao što je opisano u odlomku o *ex vivo* stimulaciji makrofaga dobivenih od monocita, makrofazi su prikupljeni i isprani u PBS-u. Proteinska frakcija stanica izolirana je metodom sonikacije, u puferu za lizu (1mM EDTA, 1% Triton X-100 u PBS-/-) s koktelom inhibitora proteaza (Complete Mini, Roche, Mannheim, Njemačka). Nakon centrifugiranja (15 000 rpm, 10 min, 4˚C), koncentracija proteina je određena modificiranim Bradford esejem (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), kao standard je korišten goveđi serumski albumin.

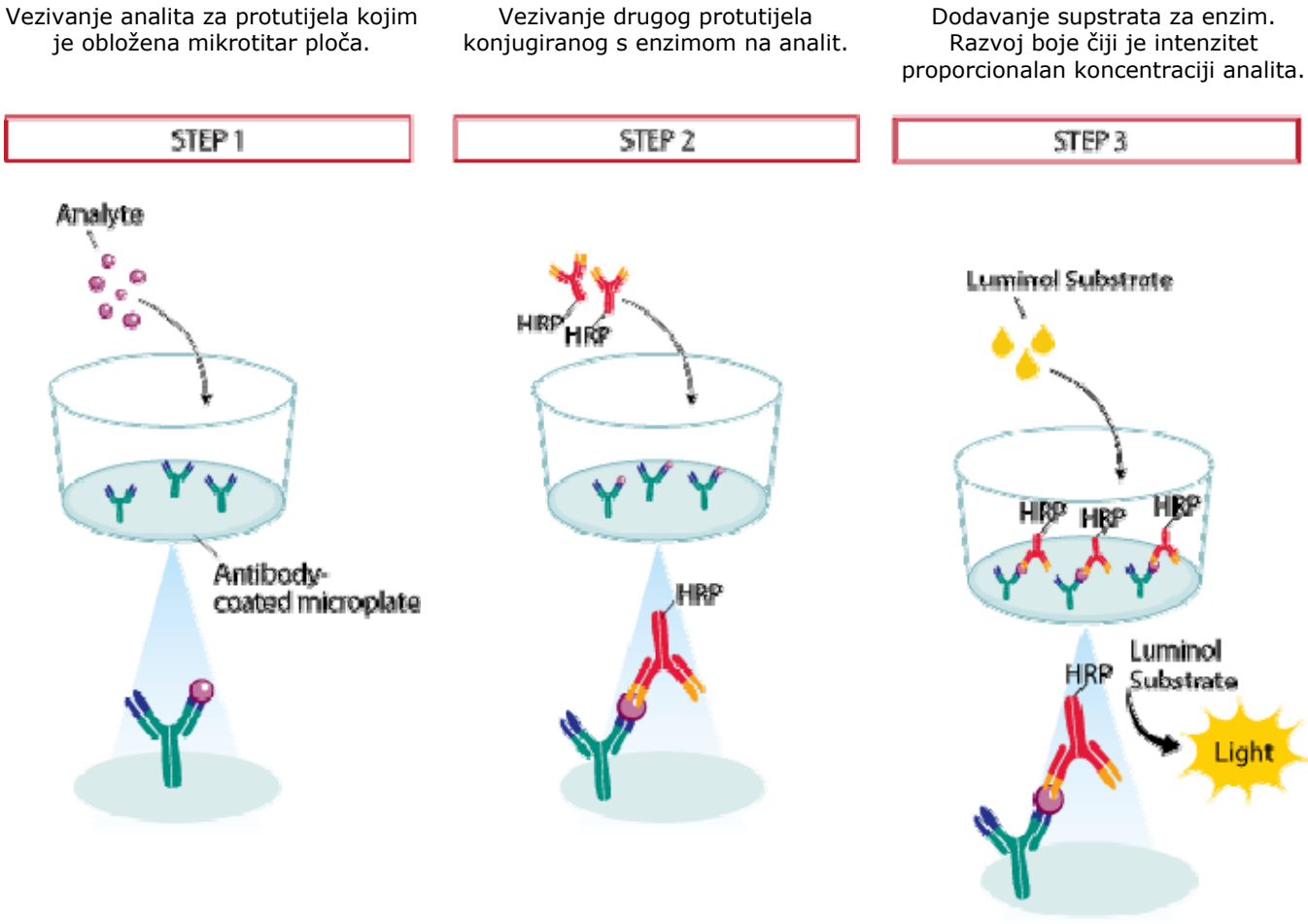
Uzorak proteina pripremljen je za elektroforezu denaturacijom - ključanjem tijekom 5 min u Laemmli puferu. 20 μg proteina svakog uzorka naneseno je na 10% SDS-poliakrilamidni gel (sodium dodecyl sulphate) u Tris/glicin/SDS puferu i prenešeno na nitroceluloznu membranu (0,45 micron, Pierce, Rockford, IL), primjenom električnog polja od 60 V tijekom 1 h i 15 min. Proteini su fiksirani na membrani vodenom otopinom octene kiseline i etanola. Detekcija ukupnih proteina i potvrda jednake količine nanešenog proteina po uzorku učinjena je bojenjem po Rutheniumu. Blokiranje nespecifičnih veznih mjesta na membrani za ligand učinjeno je 5% bezmasnim mlijekom u prahu u PBS-u s dodatkom Tweena 20 (PBS-T) tijekom 1,5 h. Tijekom 12 h membrane su inkubirane s primarnim protutijelom, nakon čega su isprane u PBS-T te inkubirane tijekom daljnjih 1 h sa sekundarnim protutijelom – konjugatom s fluoreseceirajućom bojom Cy5 (razrjeđenje 1:250, kozji anti-zec IgG, Jackson ImmunoResearch) te ponovno isprani u PBS-T tri puta. Fluoreseceirajuće proteinske pruge su detektirane skeniranjem gela (Typhoon tri Variable Mode Imager; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

3.4.5 Analiza citokina TNF-α, IL-10 i IL-12 metodom ELISA-e

Koncentracija citokina (IL-12, IL-10, TNF-α) određena je metodom enzimskog imunoeseja ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) koristeći komercijalni kit (R&D Systems). Analizirani su uzorci supernatanta kulture makrofaga dobivenih iz monocita te uzorci plazme nakon *ex vivo* stimulacije pune krvi TLR agonistima kako je opisano ranije u odlomku o *ex vivo* stimulaciji i kultivaciji. Uzorci su zamrznuti i pohranjeni na -80˚C te otopljeni, razrjeđeni i analizirani prema uputi proizvođača ELISA komercijalnog kita (R&D systems). U ovom testu koristi se tehnika kvantitativnog sendvič enzimskog imunoeseja kao što je prikazano na Slici 12. Citokini se određuju u mikrotitar pločama prethodno obloženim monoklonskim protutijelima za IL-12, IL-10 ili TNF-α. Dodaje se razrijeđeni uzorak supernatanta kulture ili seruma te standardi. Nakon inkubacije s uzorkom, citokini se vezuju na protutijela ploče, dok se druge komponente uzorka uklanjaju ispiranjem i aspiracijom. Sada se u mikrotitar ploče dodaje drugo protutijelo specifično za IL-12, IL-10 ili TNF-α koje je vezano za enzim. Nakon inkubacije i ispiranja viška protutijela dodaje se supstrat enzima te se razvija boja čiji je intenzitet proporcionalan razini vezanih citokina. Razvitak boje zaustavljen je dodavanjem Stop otopine (sulfatna kiselina) te se intenzitet boje može izmjeriti spektrofotometrom. Koncentracija citokina se određuje iz standardne krivulje koja se dobije mjerenjem intenziteta

boje od ranije poznatih koncentracija citokina standarda. Svaki uzorak određivan je dvostruko kako bi se izbjeglo odstupanje unutar samog testa.

Slika 12. Princip Quantikine ELISA testa.



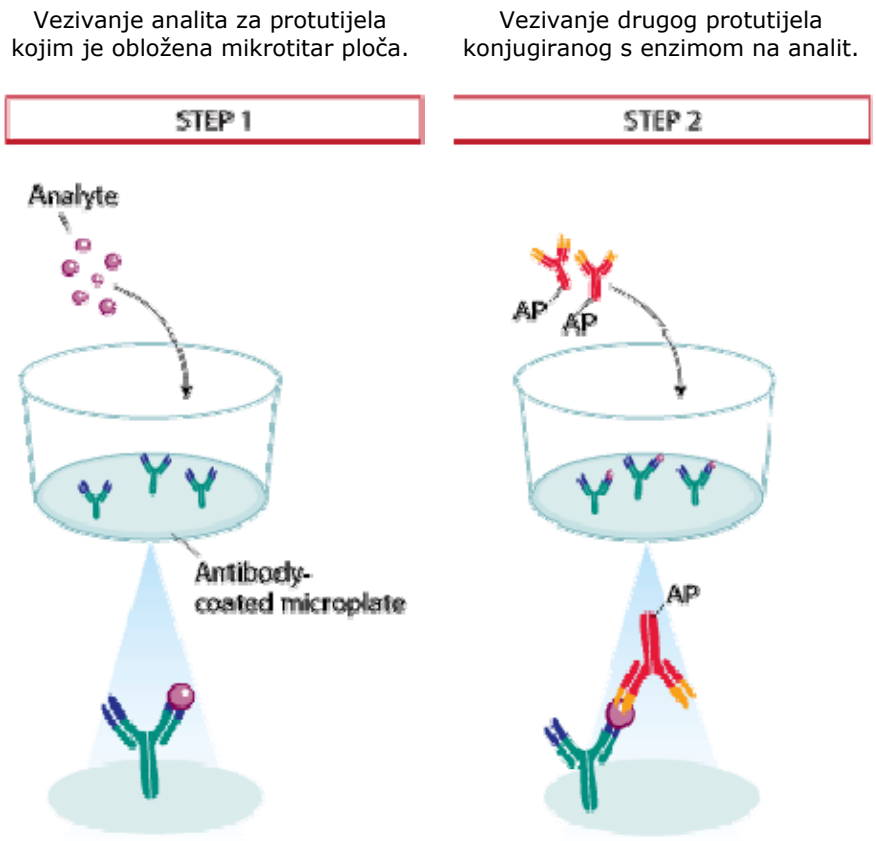
Slijede podaci specifični za test svakog od određivanih citokina. U analizi ELISA-om razine TNF-α korišten je komercijalni kit R&D Systems Quantikine – Human TNF-α/TNFSF1A. Anti TNF-α protutijelo na mikrotitarskoj ploči mišje je monoklonsko protutijelo, dok je anti TNF-α konjugat s peroksidazom poliklonsko. Kao supstrat korišten je vodikov peroksid i kromogen tetrametil benzidin. Stop otopina je sulfatna kiselina. Rezultat reakcije očitavao se spektrofotometrom na 450 nm valne dužine. Osjetljivost testa za TNF-α je 15,6 pg/ml.

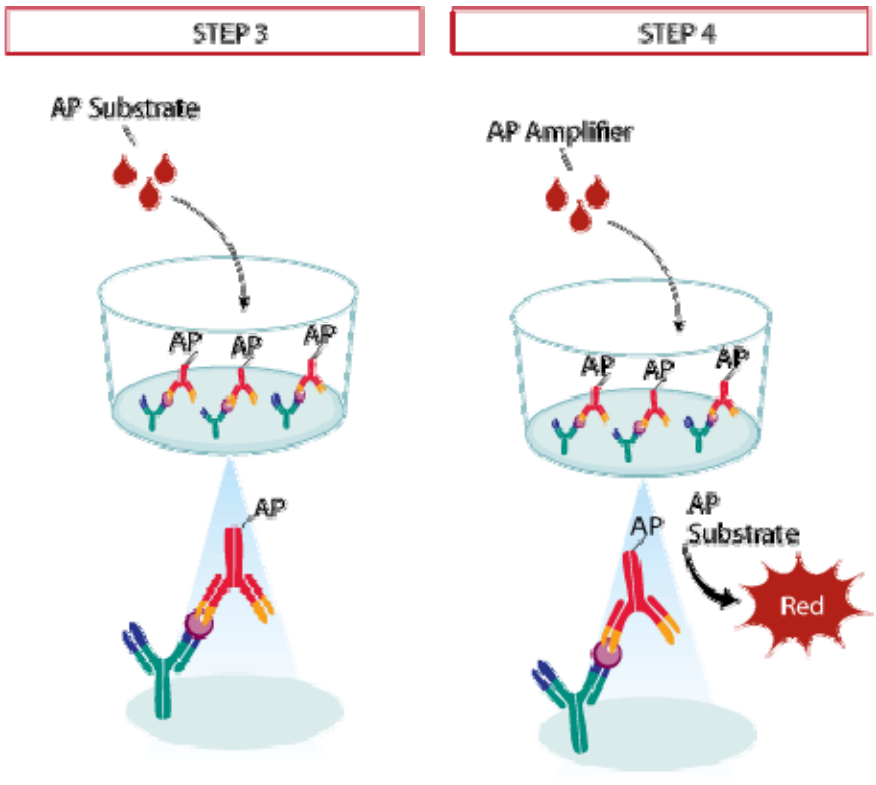
Za analizu ELISA-om razine IL-10 korišten je komercijalni kit R&D Systems Quantikine – Human IL-10 Immunoassay. Anti IL-10 protutijelo na mikrotitarskoj ploči mišje je monoklonsko protutijelo, kao i anti IL-10 konjugat s peroksidazom. Kao supstrat korišten je

vodikov peroksid i kromogen tetrametil benzidin. Stop otopina je sulfatna kiselina, kao i u prethodnom testu. Rezultat reakcije također se očitavao spektrofotometrom na 450 nm valne dužine. Osjetljivost testa za TNF-α je 7,8 pg/ml.

Analiza razine IL-12 učinjena je komercijalnim kitom R&D Systems Quantikine HS – Human IL-12 Immunoassay koji detektira samo IL-12 heterodimer, potpunu molekulu, a ne prepoznaje pojedinačne podjedinice (Slika 13). Anti IL-12 protutijelo na mikrotitarskoj ploči mišje je monoklonsko protutijelo, dok je anti IL-12 konjugat s alkalnom fosfatazom poliklonsko. Kao supstrat korišten je NADPH. Stop otopina je sulfatna kiselina. Prije očitavanja intenziteta boje u mikrotitarske ploče dodani su pojačivači reakcije, obzirom da je riječ o visoko osjetljivom testu. Rezultat reakcije očitavao se spektrofotometrom na 490 nm valne dužine. Osjetljivost testa za IL-12 je 0,781-0,625 pg/ml.

Slika 13. Princip Quantikine HS ELISA testa.





Dodavanje supstrata za enzim.

Dodavanje pojačivača reakcije. Razvoj boje čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji analita

3.5 Statističke metode

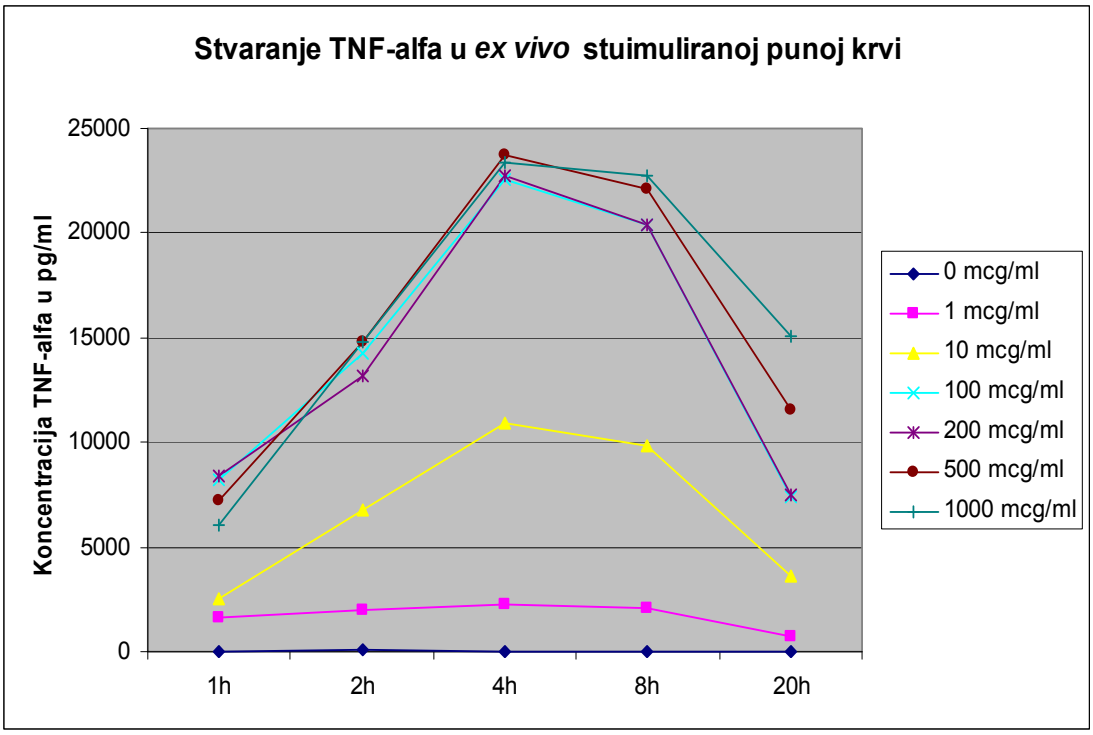
Rezultati su obrađeni u programu SPSS (SPSS for Windows version 15.0). Obzirom da rezultati eksperimenata s izoliranim monocitima u kulturi nisu bili normalno raspoređeni, za njihovu analizu koristili smo neparametrijski test Mann-Whitney U test. Za analizu rezultata stimulacije krvi pacijenata sa sepsom i diseminiranim tumorima te zdravih dobrovoljaca koristili smo ANOVA analizu s Bonferroni post hoc testovima za utvrđivanje razlika između i unutar grupa.

4. REZULTATI

4.1 Učinak HA na sintezu TNF-α sličan je učinku LPS-a. Primjenom CL097 s LPS-om ili HA dolazi do sinergističkog učinka na sintezu TNF-α, IL-12 i IL-10 u kulturi makrofaga dobivenih iz monocita periferne krvi

Iz literature je poznat sinergistički učinak istodobne stimulacije TLR4 receptora LPS-om i TLR 7/8 agonistom na stvaranje citokina – TNF-α i IL-12, što ukazuje na mogućnost prevladavanja endotoksinom izazvane tolerancije koja se javlja u protrahiranoj sepsi. Kako se u našem istraživanju ispituje moguća uloga TLR 7/8 agonista u umanjivanju imunosupresije izazavane tumorom, koja je među ostalim posredovana TLR4 agonistom hijaluronskom kiselinom – HA, zanimalo nas je postiže li se sličan sinergistički učinak na lučenje citokina primjenom TLR 7/8 agonista CL097 i s TLR4 agonistom, hijaluronskom kiselinom. Stoga je najprije ispitan učinak HA na proizvodnju citokina TNF-α u *ex vivo* stimuliranoj punoj krvi zdravog dobrovoljca. Praćen je njezin učinak ovisan o primijenjenoj dozi tijekom 20 sati. Kao što se razabire iz Slike 14. HA je inducirala stavranje TNF-α do vršnih vrijednosti 1000-2000 pg/ml ovisno o primijenjenoj dozi i vremenu. Nakon porasta razine citokina do maksimalnih vrijednosti nakon 4h, dolazi do smanjivanja proizvodnje. Ovi rezultati mogu se usporediti s učinkom LPS-a na indukciju imunoparalize periferne krvi u sepsi, gdje se nakon početnog porasta sinteze proinflamatornih citokina javlja toleracija na endotoksin, odnosno hiporeaktivnost na daljnu stimulaciju.

Slika 14. Sinteza TNF-α u ex vivo stimuliranoj perifernoj krvi ovisna o dozi i vremenu.



Kada je utvrđen LPS-u sličan učinak protrahirane stimulacije s HA na sintezu TNF-α, učinjen je sljedeći eksperiment kako bi se ispitao mogući pozitivan/sinergistički učinak TLR 7/8 agonista CL097 na proizvodnju citokina kada se primjeni zajedno s HA. Kao model su korišteni makrofazi dobiveni kultivacijom monocita periferne krvi tijekom 24 sata. Monociti su prethodno kultivirani kako bi se izbjegao neposredan negativan učinak procesa izolacije monocita. Tijekom izolacije monociti masovno podliježu apoptozi ili aktivaciji, a tijekom kultivacije razvijaju stabilan fenotip makrofaga i tako podjednaku reaktivnost na stimuluse. S druge strane tako kultivirani makrofazi možda bolje koreliraju s makrofazima koje nalazimo u tumorskom tkivu, koji su promijenjeni tumorom izazvanom imunosupresijom. A, kao što će se vidjeti iz kasnijih rezultata, makrofazi samim procesom kultivacije počinju eksprimirati IRAK-M, negativan regulator TLR siganlnog puta, koji je važan za imunosupresiju izazvanu tumorom.

Monociti su kultivirani tijekom 24 sata te smo ih stimulirali s TLR4 agonistima – LPS-om (100 ng/ml) ili HA (200 μg/ml) s ili bez dodatka TLR 7/8 agonista CL097 (2,5 μg/ml) te

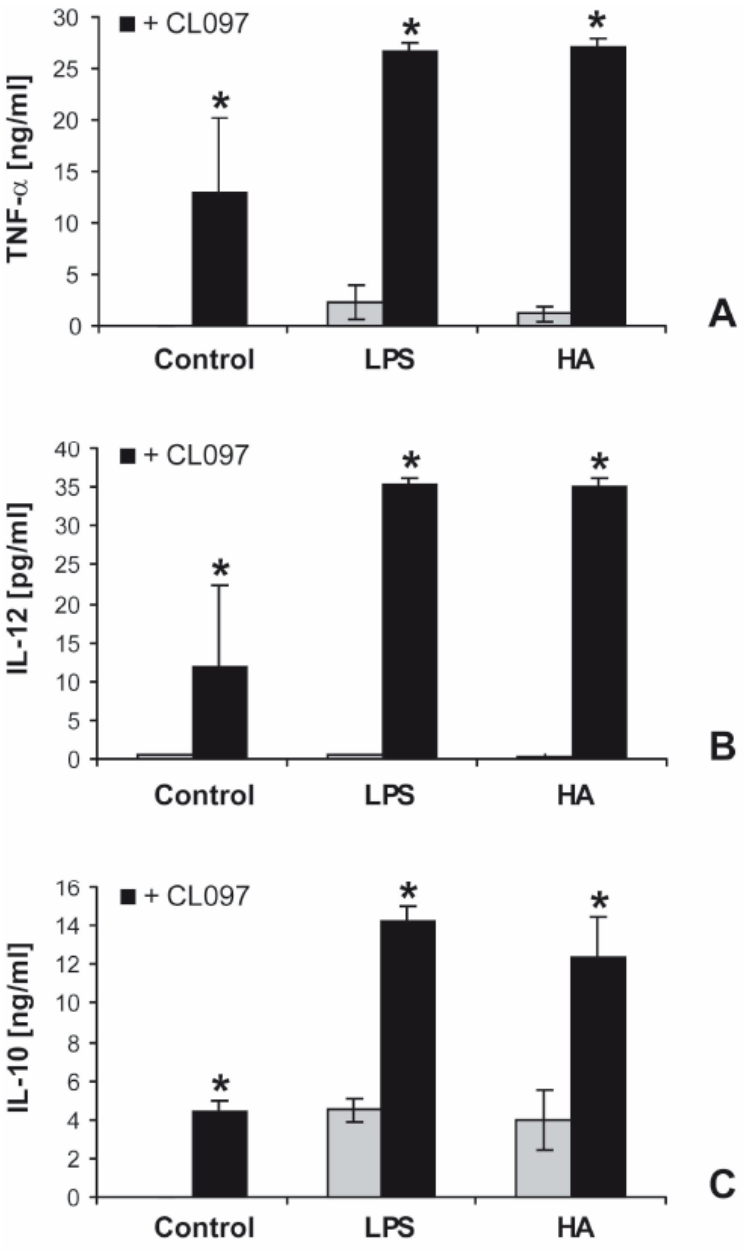
samim CL097 ili bez stimulusa tijekom daljnjih 24 sata. ELISA-om je izmjerena razina citokina TNF-α, IL-12 i IL-10 u supernatanu kulture. Rezultati su prikazani na Slici 15.

Kada se makrofage stimuliralo kombinacijom CL097 i HA došlo je do izrazito visoke sinteze TNF-α (Slika 15A). Ove vrijednosti TNF-α usporedive su s rezultatima kostimulacije makrofaga LPS-om i CL097.

Slično, razina IL-12 značajno je porasla nakon kostimulacije s CL097 i HA u odnosu na stimulaciju samo s CL097 (Slika 15B). Ponovno su vrijednosti IL-12 nakon stimulacije s CL097 i HA bile usporedive s onima nakon stimulacije s CL097 i LPS-om. Sekrecija ovog citokina nije detektirana kada smo makrofage stimulirali samo s LPS-om ili s HA.

Sinteza IL-10 bila je inducirana i porasla je do sličnih vrijednosti kod stimulacije samo s HA ili LPS-om (Slika 15C). Navedena visoka sinteza IL-10 korespondira s niskim vrijednostima TNF-α nakon stimulacije samo s HA. Zanimljivo, sinteza IL-10 bila je visoka i nakon kostimulacije CL097 s LPS-om ili HA, iako je sinteza TNF-α bila visoka u tom slučaju. Naime IL-10 je opisan u literaturi kao inhibitor sinteze TNF-α.

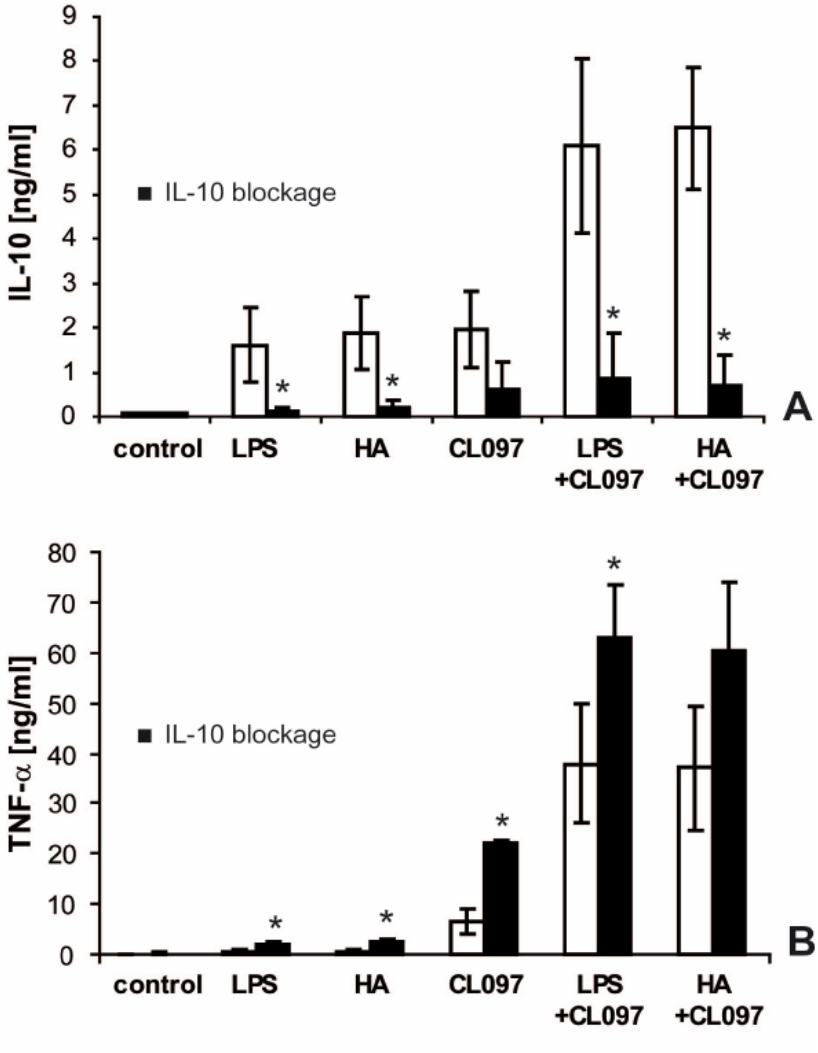
*Slika 15. Sinteza TNF-α, IL-12 i IL-10 u kulturi makrofaga nakon stimulacije CL097 i/ili LPS-om i/ili HA. (A) Sinteza TNF-α, (B) IL-12 i (C) IL-10. Statistički značajne razlike u razini citokina u supernatantu kulture makrofaga između stanica tretiranih ili netretiranih s CL097 su određene Mann-Whitney U testom: * P<0,05.*



4.2 Sinteza proinflamatornih citokina induciranih stimulacijom TLR 7/8 agonistom CL097 samo je djelomično inhibirana IL-10

Kao što smo već spomenuli IL-10 opisan je kao inhibitor sinteze TNF-α. Na temelju naših rezultata koji pokazuju istodobnu indukciju IL-10 i TNF-α moglo bi se zaključiti da regulacija sinteze TNF-α ne podliježe učinku IL-10 u uvjetima kostimulacije s CL097 i TLR4 agonista. Kako bi ispitali ovu pretpostavku učinjen je sljdeći pokus s blokirajućim protutijelima za IL-10. Monociti su kultivirani tijekom 24 sata, nakon čega je u kulturu dodano monoklonsko anti-IL-10 protutijelo. Tada je kultura stimulirana s TLR4 agonistima – LPS-om (100 ng/ml) ili HA (200 μg/ml) s ili bez dodatka TLR 7/8 agonista CL097 (2,5 μg/ml) te samim CL097 ili bez stimulusa tijekom daljnjih 24 sata. ELISA-om je izmjerena razina citokina IL-10 i TNF-α u supernatanu kulture. Rezultati su prikazani na Slici 16. Neutralizacija IL-10 bila je gotovo potpuna što se razabire iz Slike 16A, a rezultirala je još jačom sintezom TNF-α u odnosu na uvjete bez IL-10 blokade (Slika 16B) što nas navodi na zaključak indukcija TNF-α nije u potpunosti neovisna od regulacije IL-10, odnosno djelomično je inhibirana IL-10.

*Slika 16. Sinteza IL-10 i TNF-α u kulturi makrofaga nakon stimulacije s CL097 i/ili LPS-om i/ili HA tretiranih s anti-IL-10 protutijelom. (A) Sinteza IL-10 i (B) TNF-α. Statistički značajne razlike u razini citokina u supernatantu kulture makrofaga između stanica tretiranih ili netretiranih s anti-IL-10 protutijelom određene su Mann-Whitney U testom: * P<0,05.*

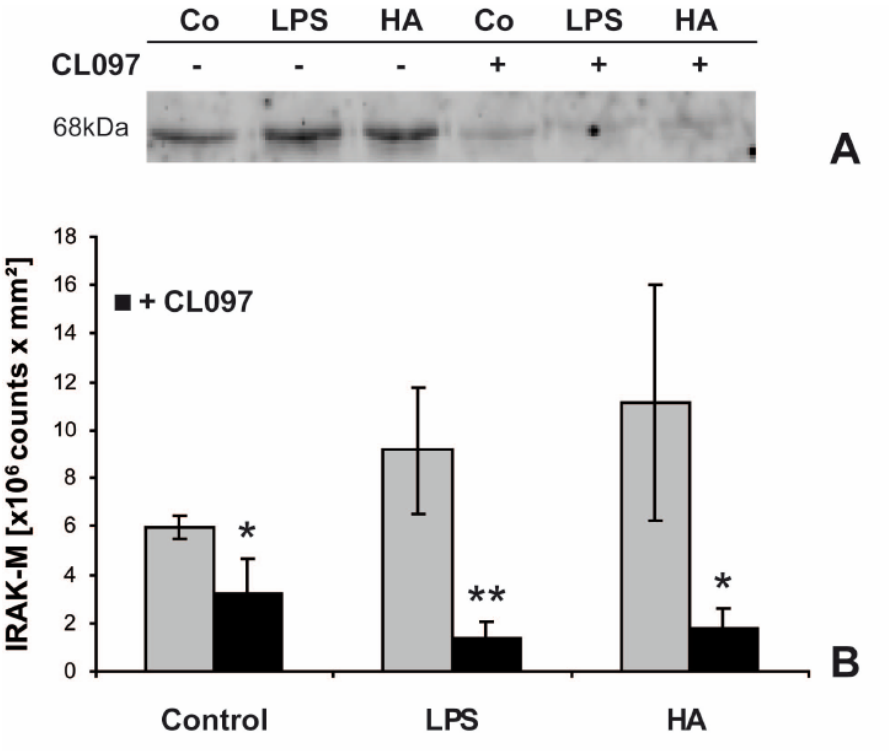


4.3 CL097 uspješno suzbija porast ekspresije IRAK-M koju izazaiva stimulacija makrofaga LPS-om/HA

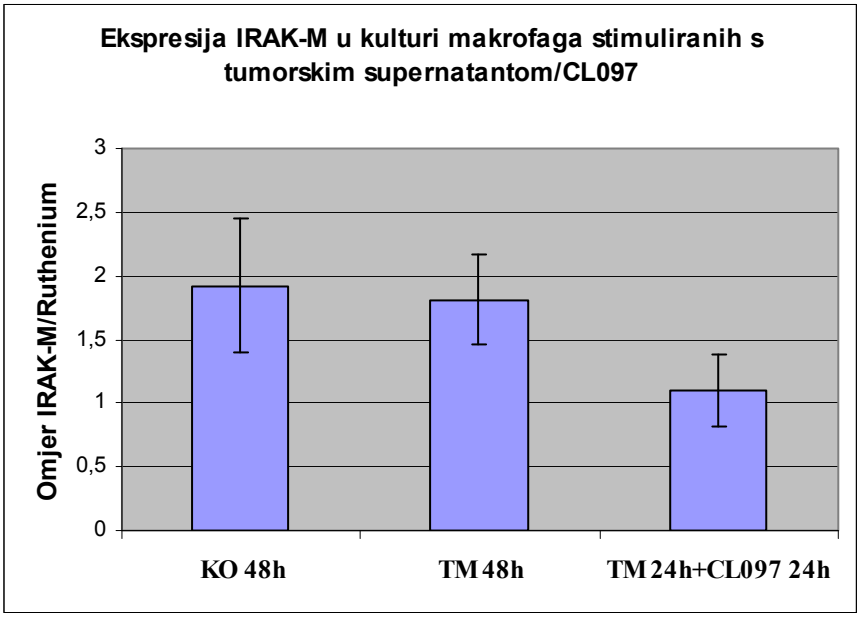
Od ranije je poznato da LPS i hijaluronska kiselina induciraju sinetzu proteina IRAK-M nakon 24 satne stimulacije. U sljedećem se eksperimentu pokušalo pokazati može li agonist TLR 7/8 modulirati ekspresiju IRAK-M. Monociti su kultivirani tijekom 24 sata te stimulirani s TLR4 agonistima – LPS-om (100 ng/ml) ili HA (200 μg/ml) s ili bez dodatka TLR 7/8

agonista CL097 (2,5 μg/ml) te samim CL097 ili bez stimulusa tijekom daljnjih 24 sata. Razina IRAK-M određena je Western blotom. Membrane s proteinima su skenirane i analiziran je intezitet fluorescentnih pruga proteina. Zanimljivo, razina IRAK-M značajno je snižena nakon dodatka CL097 kulturi makrofaga (Slika 17A i B). CL097 uspio je značajno sniziti razinu IRAK-M kada bi se dodao u kulturu istodobno s LPS-om ili HA. Također, kada bi se CL097 dodao u kulturu makrofaga istodobno sa supernatantom tumorske kulture (sadrži HA i potiče ekspresiju IRAK-M), značajno bi snižavao razinu IRAK-M (Slika 18) u odnosu na kultivaciju samo sa supernatantnom tumorske kulture.

*Slika 17. Izražaj IRAK-M u kulturi makrofaga nakon stimulacije s CL097 i/ili LPS-om i/ili HA. (A) primjer Western blota s IRAK-M i (B) kvantitativna analiza srednjih vrijednosti razine proteina IRAK-M (n=6). Za standardizaciju uzoraka (jednako naošenje) korišten je prikaz ukupnih proteina Rutheniumom. Statistički značajne razlike u razini IRAK-M između stanica tretiranih ili netretiranih s CL097 određene su Mann-Whitney U testom: * P<0,05.*



Slika 18. Kvantitativna analiza srednjih vrijednosti razine proteina IRAK-M nakon stimulacije kulture makrofaga tumorskim supernatantom s ili bez CL097. Monociti periferne krvi kultivirani su tijekom 24 sata te naknadno stimulirani s tumorskim supernatantom kulture stanica karcinoma dojke MCF-7 uz dodatak CL097 tijekom sljedećih 24 sata. Kao pozitivna kontrola monociti su tijekom cijelih 48 sati kulture stimulirani s tumorskim supernatantom, a kao negativna monociti su ostavljeni u kulturi 48 sati bez stimulacije. IRAK-M razina određena je Western blotom. Za standardizaciju uzoraka (jednako nanošenje) korišten je prikaz ukupnih proteina Rutheniumom. (n=6)

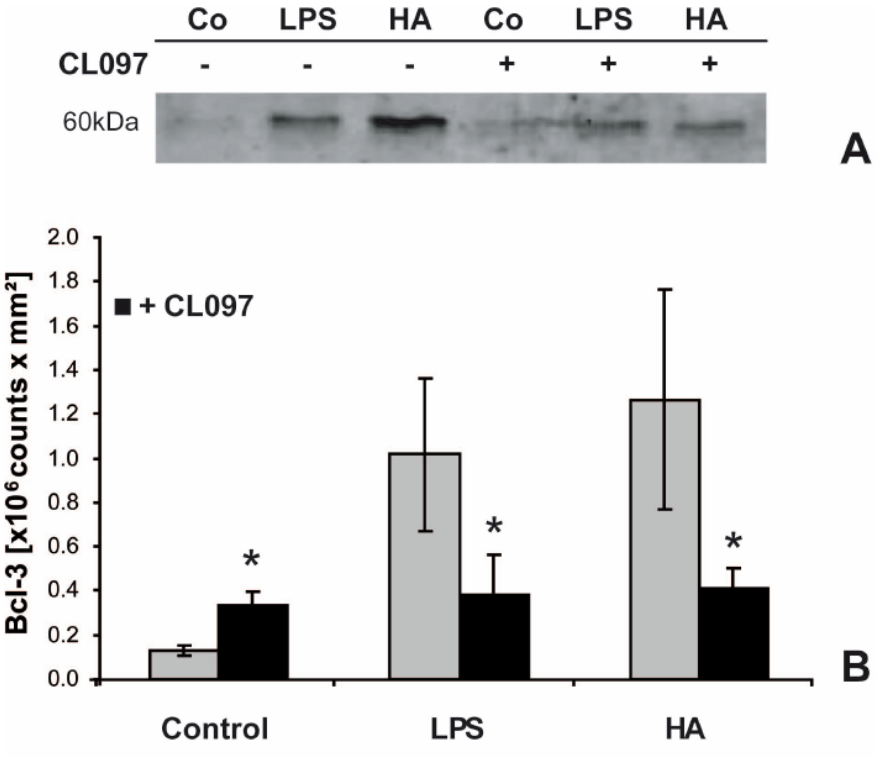


4.4 CL097 učinkovito smanjuje ekspresiju Bcl-3 u kulturi makrofaga stimuliranih s LPS/HA

Bcl-3 drugi je važan negativni regulator TLR signalnog puta. Stoga se u sljedećem eksperimentu pokušalo provjeriti je li pojačana sinteza citokina inducirana s CL097 povezana s promjenom razine Bcl-3 odnosno koči li CL097 i ekspresiju Bcl-3. Analizirana je razina Bcl-3 Western blotom iz kulture makrofaga. Oni su kultivirani tijekom 24 sata, stimulirali s TLR4 agonistima – LPS-om (100 ng/ml) ili HA (200 μg/ml) s ili bez dodatka TLR 7/8 agonista CL097 (2,5 μg/ml) te samim CL097 ili bez stimulusa tijekom daljnjih 24 sata. Analiza rezultata prikazana je na Slici 19. Slično kao što je ranije dokazano za T limfocite, LPS je također inducirao ekspresiju Bcl-3 i u kulturi makrofaga, za razliku od nestimuliranih

stanica. Slična regulacija Bcl-3 dobivena je i stimulacijim hijaluronskom kiselinom. Bitno je naglasiti da i u ovom eksperimentu dodatak CL097 kulturi makrofaga tretirnoj s LPS-om ili HA značajno smanjuje Bcl-3 u odnosu na stimulaciju samo s LPS-om ili HA. Ovi rezultati ukazuju na moguću ulogu Bcl-3 u indukciji sinteze citokina nakon stimulacije s CL097.

*Slika 19. Izražaj Bcl-3 u kulturi makrofaga nakon stimulacije s CL097 i/ili LPS-om i/ili HA. (A) primjer Western blota s Bcl-3 i (B) kvantitativna analiza srednjih vrijednosti razine proteina IRAK-M (n=4). Za standardizaciju uzoraka (jednako nanošenje) korišten je prikaz ukupnih proteina Rutheniumom. Statistički značajne razlike u razini Bcl-3 između stanica tretiranih ili netretiranih s CL097 određene su Mann-Whitney U testom: * P<0,05.*

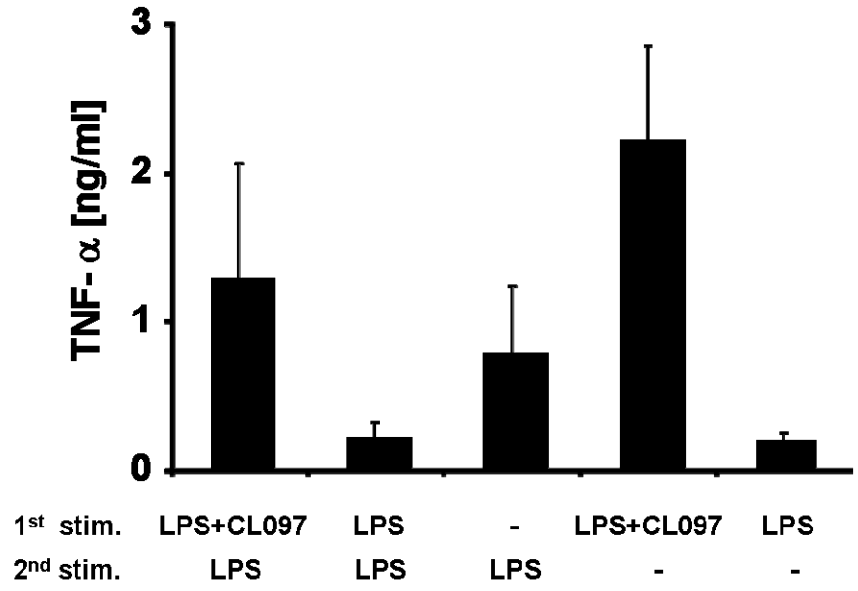


4.5 CL097 produžuje sintezu TNF-α

Iz literature je poznato da ponovljena stimulacija s LPS-om inducira endotoksinsku toleranciju koja je među ostalim karakterizirana smanjenom sintezom TNF-α na sekundarnu stimulaciju LPS-om. Indukcija tolerancije povezuje se s povećanom ekspresijom IRAK-M koja se uočava u kasnoj fazi stimulacije LPS-om, nakon 24 sata (253). U ovom se eksperimentu ispitalo može li stimulacija makrofaga CL097 antagonizirati efekt tolerancije.

Makrofazi su nakon 24 satne kulture najprije stimulirani s CL097 i LPS-om tijekom 24h, a nakon ispiranja stanica slijedila je 24 satna restimulacija samo LPS-om. U kontrolnim kulturama nije provedena sekundarna stimulacija LPS-om. Ostale kontrolne kulture uključivale su ponovljenu stimulaciju samo LPS-om ili jednostruku stimulaciju LPS-om kao što je prikazano na Slici 8 i opisano u poglavlju o metodama. Rezultati odbiveni metodom ELISA-e prikazani su na Slici 20. Stimulacija kulture makrofaga s LPS-om i CL097 te naknadno s LPS-om ili bez sekundarnog LPS stimulusa inducirala je podjednake razine TNF-α. Najzančajniji rezultat bila je trajno visoka proizvodnja TNF-α, i nakon 48 sati nakon kostimulacije kulture LPS-om i CL097, za razliku od vrlo niske razine TNF-α u kulturi dvostruko stimuliranom samo s LPS-om. Ovi rezultati upućuju na zaključak da snižavanje razine IRAK-M i Bcl-3 nakon stimulacije CL097 onemogućava prekid proizvodnje TNF-α.

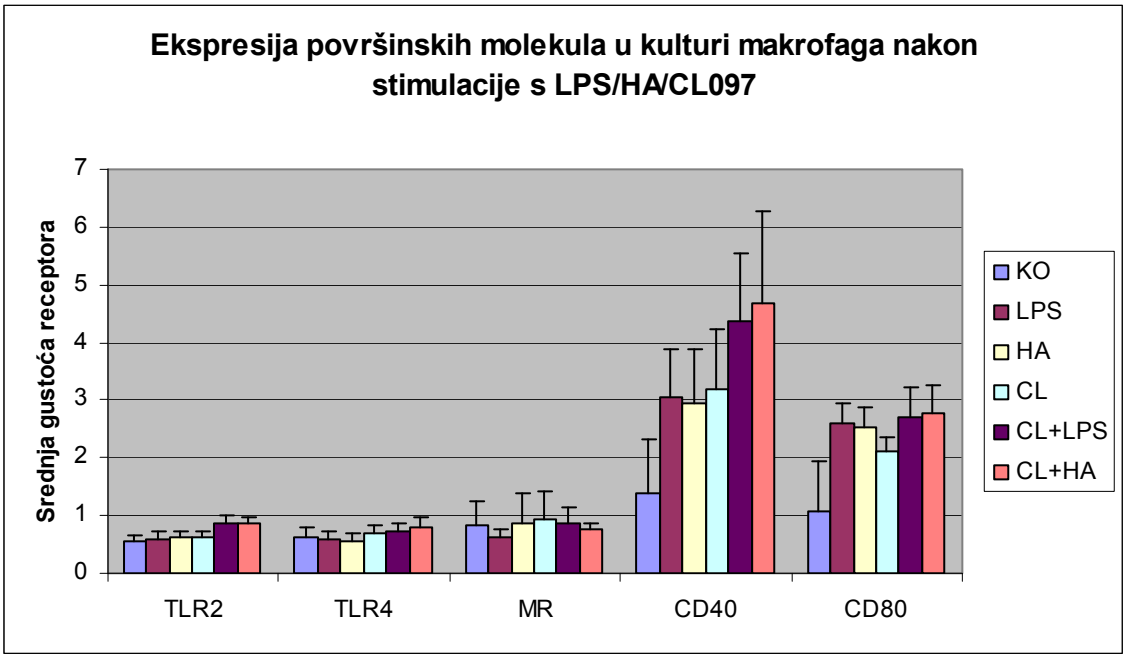
*Slika 20. Proizvodnja TNF-α u kulturi makrofaga prekondicioniranoj s LPS-om i CL097 i restimuliranoj LPS-om. Razina TNF-α određena je ELISA-om. Statistički značajne razlike u razini TNF-α između tretiranih i kontrolni stanica određene su Mann-Whitney U testom: * $P<0,05$.*



4.6 CL097 ne mijenja fenotip makrofaga

Kako je poznato da kostimulacija s TLR4 i TLR 7/8 inducira TH-1 polariziran odgovor citokina, htjeli smo istražiti može li kostimulacija također promijeniti status aktivacije/fenotip makrofaga u odnosu na stimulaciju samo LPS-om. Stoga je određena ekspresija površinskih molekula stanica povezanih s aktiviranim fenotipom monocita/makrofaga (TLR2, TLR4, CD40 i CD80) i receptora za manozu (MR) kod makrofaga dobivenih iz monocita periferne krvi. Stanice su stimulirane ili s LPS-om ili s CL097 ili njihovom kombinacijom kao što je prikazano na Slici 7 i opisano u poglavlju o metodama. Međutim nije uočena značajna razlika u ekspresiji ovih molekula nakon kostimulacije LPS-om i CL097 u odnosu na stimulaciju samo LPS-om (Slika 21). Iz navedenog se može zaključiti da modulacija stvaranja citokina kostimulacijom TLR4 i TLR 7/8 receptora nije utemeljena na potpunoj promjeni fenotipa makrofaga iz M2 u M1.

Slika 21. Ekspresija površinskih molekula u kulturi makrofaga nakon stimulacije s TLR4 i/ili TLR 7/8 agonistima određena metodom protočne citometrije.



4.7 CL097 pojačava stvaranje TNF-α u perifernoj krvi pacijenata sa sepsom te pacijenata s metastatskim karcinomom stimuliranoj TLR4 agonistima

Dalje je istraženo jesu li pojačavajući učinci CL097 u staničnoj kulturi makrofaga zadržani i u kulturi pune krvi. Budući da se granulociti počinju raspadati nakon 18 sati kultivacije periferne krvi, puna krv se nije mogla stimulirati 24 sata kako bi se iz monocita diferencirali makrofazi. Stoga je korišten standardni četverosatni protokol za stimulaciju pune krvi (248,292), protokol je opisan u poglavlju o metodama i prikazan na Slici 9. Kod zdravih je dobrovoljaca kostimulacija s TLR4 i TLR 7/8 agonistima izazivala je aditivan učinak na sintezu TNF-α uspoređujući s izoliranom stimulacijom TLR4 ili TLR 7/8 (Slika 22A). Zanimljivo, CL097 dovodio je do značajnog porasta sinteze IL-10, dok to nije bio slučaj za TLR4 agoniste (Slika 22B). Štoviše, nije bilo pojačavajućeg učinka kostimulacije s dva TLR agonista na sintezu IL-10, već neznačajna redukcija u njegovoj proizvodnji.

Zatim je istraženo je li sličan oblik reaktivnost pune krvi zdravih dobrovoljaca zadržan i kod pune krvi pacijenata sa sepsom ili metastatskim karcinomom. Poznato je da su mononukleari periferne krvi septičnih pacijenata obilježeni znatno bržom indukcijom IRAK-M na stimulaciju LPS-om. Također su i mononukleari pacijenata s metastatskim malignim bolestima obilježeni značajnim izražajem IRAK-M (263). Stoga smo pretpostavili da agens koji smanjuje izražaj IRAK-M može specifično pojačati proinflamatorni odgovor citokina kod takvih pacijenata.

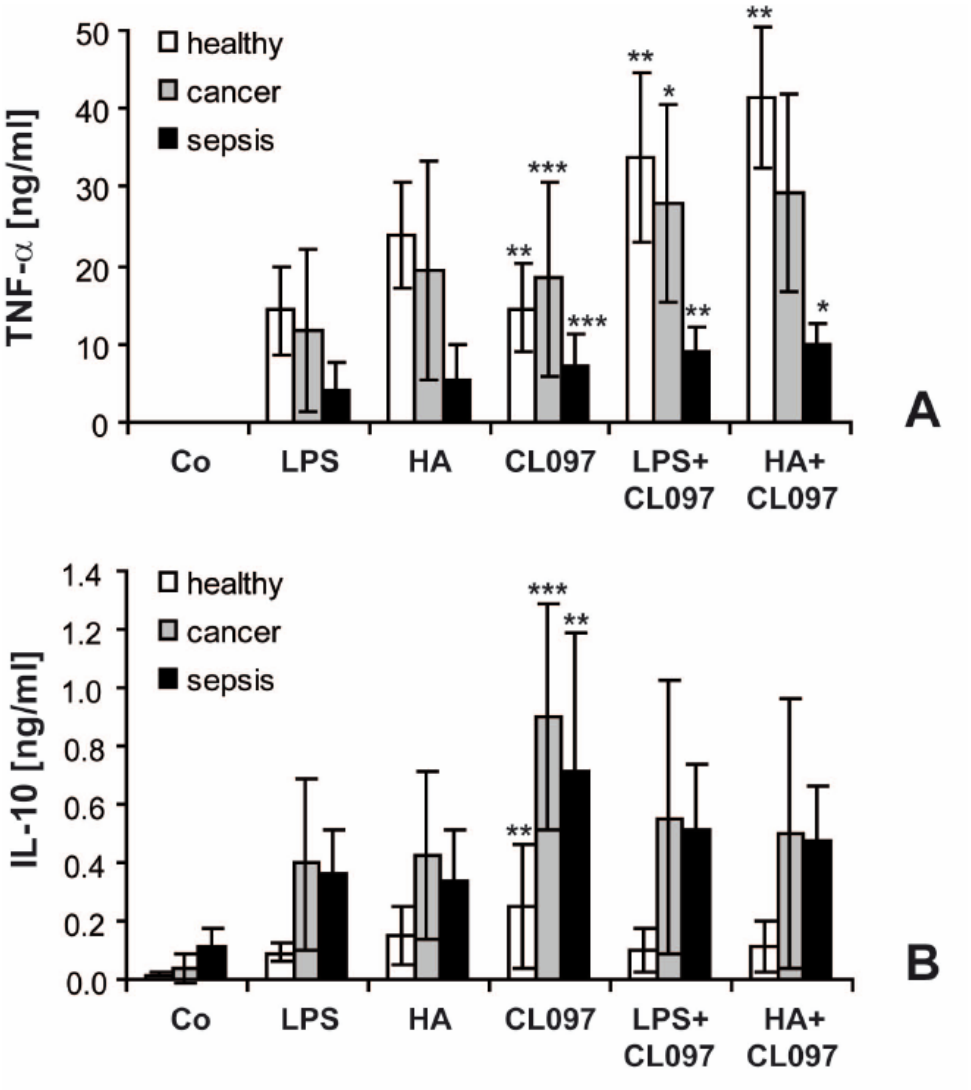
Analizom razine citokina iz plazme metodom ELISA, nakon stimulacije pune krvi pacijenata, dobiveni su sljedeći rezultati. Uzorak izmjerenog TNF-α nakon stimulacije TLR agonistima pune krvi pacijenata s malignomima odgovarao je onom zdravih dobrovoljaca. Pojačavajući učinak CL097 u kostimulaciji s TLR4 agonistima na sintezu TNF-α bio je statistički značajan samo za LPS i CL097 (Slika 22A). Kod pacijenata sa sepsom ukupna proizvodnja TNF-α bila je manja u odnosu na zdrave, kao što je već opisano. Međutim, kostimulacija CL097 i TLR4 agonista izazivala je značajno veću sintezu TNF-α u odnosu na mono-stimulaciju TLR4 agonistima.

Slično krvi zdravih dobrovoljaca, mono-stimulacija CL097 dovodila je do značajne indukcije IL-10 u punoj krvi pacijenata s malignomom i sepsom (Slika 22B). Zanimljivo, stimulacija CL097 izazvala je značajno veću sintezu IL-10 u krvi pacijenata u odnosu na zdrave. Sličan

uzorak reagiranja uočen je i kod stimulacije TLR4 agonistima (viši IL-10 kod pacijenata). Međutim nije nađen značajan porast IL-10 na kostimulaciju TLR4 i TLR7/8 agonistima u odnosu na mono-stimulaciju TLR 7/8 agonistom, već neznačajan pad u sintezi.

IL-12 induciran je samo u krvi zdravih dobrovoljaca kostimuliranih s LPS ili HA i CL097, dok nije bio mjerljiv u krvi pacijenata sa sepsom i malignomom. Stoga nije izračunata statistika za rezultate s IL-12.

Slika 22. Sinteza TNF-α i IL-10 u punoj krvi zdravih dobrovoljaca te pacijenata s malignom diseminiranom bolesti i sepsom ex vivo stimulirane s CL097 i/ili LPS-om i/ili HA. Zdravi dobrovoljci su prikazani bijelim stupcima (n=6), pacijenti s malignomom sivim (n=12), a septični pacijenti sa crnim (n=12). (A) Stvaranje TNF-α i (B) IL-10. Razine citokina izmjerene su ELISA-om. Statistički značajne razlike između skupina pacijenti/zdravi i grupa s različitim tretmanom određene su koristeći 3 (grupa) x 2 (CL097) miješani model ANOVA s Bonferoni post hoc testom, a prikazane su razlike između CL097– tretiranih i netretiranih grupa: P<0,05, * P<0,01, * P<0,001.*



5. RASPRAVA

Istraživanjem je potvrđena hipoteza da se primjenom TLR7/8 agonista CL097 u kulturi hiporeaktivnih makrofaga može smanjiti ekspresija dvije molekule važne za imunosupresiju uzrokovanu protrahiranom sepsom i tumorom, IRAK-M i Bcl-3. Navedeni hiporeaktivitet makrofaga u kulturi postignut je protrahiranom (24 satnom) stimulacijom agonistima TLR4, lipopolisaharidom (LPS-om) i hijaluronskom kiselinom (HA), a očitovao se niskom produkcijom proinflamatornih citokina kao što je TNF-α odnosno izostankom sinteze IL-12, uz značajnu ekspresiju negativnih regulatora TLR4 signalnog puta IRAK-M i Bcl-3. Kao što je ranije navedeno dodavanjem sintetskog agonista TLR7/8 receptora, spoja CL097, u kulturu makrofaga istodobno s TLR4 agonistima poništen je njihov učinak na indukciju hiporeaktiviteta monocita, te su tako tretirani makrofazi stvarali visoke razine proinflamatornih citokina TNF-α i Il-12, a negativni regulatori, IRAK-M i Bcl-3, bili su suprimirani. Kako je do sada objavljeno u literaturi (253) izlaganje ljudskih monocita gram-negativnom endotoksinu, LPS-u, dovodi ih u prolazno stanje tijekom kojeg su refraktorni na daljnju stimulaciju LPS-om. Ova je pojava nazvana endotoksinkom tolerancijom, a obilježava je pad sinteze proinflamatornih citokina na daljnju stimulaciju LPS-om. Rad Escoll i sur. (253) je pokazao ključnu ulogu molekule IRAK-M u razvoju endotoksinske tolerancije na modelu ljudskih monocita prestimuliranih s LPS-om te monocita izoliranih iz periferne krvi pacijenata sa sepsom. U oba slučaja zabilježena je snažna ekspresija IRAK-M što je praćeno hiporeaktivitetom i vrlo niskom sintezom proinflamatornih citokina. Ove podatke odlično potkrepljuju i pokusi s IRAK-M-/- „knock-out“ životinjama, čiji makrofazi na stimulaciju LPS-om i drugim TLR agonistima odgovaraju trajno snažnom sintezom proinflamatornih citokina te ne mogu razviti endotoksinsku toleranciju (85). Endotoksinska tolerancija i deaktivirani fenotip monocita važan su mehanizam nastanka imunosupresije u sepsi te tako i podložnosti nastanku sekundarnih infekcija. U radu Deng i sur. (260) upravo je opisana uloga aktivnog fenotipa makrofaga u suzbijanju infekcije i postizanju dužeg preživljenja na modelu plućne sepse kod miševa. Kako alveolarni makrofazi imaju glavnu ulogu u odstranjivanju bakterijskih patogena u plućima, kada broj bakterija premaši njihovu baktericidnu sposobnost, daljnji učinkoviti antimikrobni odgovor ovisi o aktivaciji neutrofila posredovanoj citokinima. Međutim, upravo ovi alveolarni makrofazi izolirani iz eksperimentalnih životinja s modelom plućne sepse, pokazuju sniženu sposobnost fagocitoze, smanjenu baktericidnost i smanjenu sintezu proinflamatornih citokina na stimulaciju LPS-om. U njima je pronađena visoka

ekspresija IRAK-M molekule, slično već opisanom slučaju monocita periferne krvi pacijenata sa sepsom. Također se i na opisanom eksperimentalnom modelu IRAK-M deficijentnih životinja potvrdila njezina imunosupresivna uloga. Naime, makrofazi IRAK-M -/- životinja stvarali su visoke koncentracije proinflamatornih citokina i izražavali višu razinu kostimulatornih molekula od onih divljeg tipa. IRAK-M -/- životinje su također imale značajno duže preživljenje i bolji klirens bakterija iz pluća, više razine citokina i kemokina te posljedično tome bolje privlačenje i aktivaciju neutrofila u područje upale. Ovi rezultati konačno potvrđuju ulogu IRAK-M u indukciji imunokompromitiranog stanja tijekom sepse. Sličnu ulogu IRAK-M u razvoju imunosupresije u tumoru pokazala je grupa del Fresno i sur. (263). Istraživali su što utječe i koji su signalni putevi uključeni u razvoj deaktiviranog odnosno alternativno aktiviranog fenotipa tumorskih makrofaga. Naime makrofazi koji infiltriraju tumorsko tkivo imaju smanjenu antitumorsku funkciju (293,294) što je posljedica učinka tumorskih stanica i strome (261,295). Mehanizmi kojim nastaje ova promjena fenotipa uključuju stvaranje određenih citokina (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β), prostaglandina i glikozaminoglikana (hijaluronska kiselina) porijekla tumorskih stanica i strome (273,296) što dovodi do smanjene sinteze TNF-α, IL-12, IFN-γ i drugih citotoksičnih i proinflamatornih citokina monocita (261,293,295,297) Ovim procesima tumor inducira specifičnu toleranciju monocita, a njihova antitumorska aktivnost je inhibirana. U alternativno aktiviranim makrofazima, slično kao i kod monocita s razvijenom endotoksinskom tolerancijom, značajno je eksprimirana signalna molekula IRAK-M. U radu del Fresno i sur. (263) jasno je pokazano da je upravo hjaluronska kiselina koju izlučuju tumorske stanice odgovorna za ekspresiju IRAK-M. Ona je kao i LPS također agonist TLR4 receptora te inducira kao i LPS u slučaju sepse, negativne regulatore TLR signalog puta kao što je IRAK-M i time suprimira sintezu proinflamatornih citokina. Da je upravo hijaluronska kiselina odgovorna za ekspresiju IRAK-M u tumorskim makrofazima pokazali su pokusi u kojima je IRAK-M izražena nakon kokultivacije monocita s različitim tumorskim staničnim linijama, supernatantom kulture tumorskih stanica ili samom hijaluronskom kiselinom iz supernatanta, a kada bi se isti uvjeti kultivacije ponovili s blokirajućim protutijelima za receptore hijaluronske kiseline, ekspresija IRAK-M bi izostala. Time hijaluronska kiselina u tumoru postaje korelat LPS-u u slučaju sepse kao induktor endotoksinske ili tumorske tolerancije. Tome u prilog govore i naši rezultati stimulacije periferene krvi *ex vivo* s hijaluronskom kiselinom koji daje sličan profil proupalnog citokina TNF-α kao i već ranije publicirani rezultati stimulacije LPS-om, gdje nakon početnog porasta TNFα, kod protrahirane stimulacije TLR4 agonistima dolazi do smanjene ili gotovo potpuno utišane proizvodnje istog citokina. Da je upravo IRAK-M

odgovorna za smanjenje proizvodnje proinflamatornih citokina pokazali su pokusi sa siRNA za IRAK-M u kojima se nije mogla izazvati tolerancija monocita te je proizvodnja citokina ostala visoka. Prethodno opisani mehanizam utišavanja prejake proinflamatorne reakcije „preuzeo“ je tumor i time, kao i drugim mehanizmima, omogućio prekid upalnog odgovora i olakšao svoju progresiju. Deaktivirani monociti s visokom ekspresijom IRAK-M ne nalaze se samo u tumorskom tkivu već su nađeni i u perifenoj krvi pacijenata s diseminiranim malignim tumorima te kroničnom mijeloičnom leukemijom (263). Njihovo značenje potvrdili su i brojni pokusi na životinjskim tumorskim modelima, a kasnije i analiza humanih uzoraka tumorskog tkiva, gdje je veći broj tumorskih makrofaga bio povezan s lošijom prognozom (298-300). Stoga se oni smatraju jednim od glavnih mehanizama odgovornih za tumorsku progresiju te su tako postali središtem brojnih istraživanja ciljanih terapijskih intervencija. Primjerice grupa istraživača prof. Reisfelda razvila je vakcine protiv tumorskih makrofaga na mišjem modelu karcinoma dojke, debelog crijeva i pluća. Primjenom ovog cjepiva 75% životinja preživjelo je injiciranje letalne tumorske doze, a 64% ih nije razvilo metastaze (301). Histološkom analizom tumorskog tkiva nađen je porast broja citotoksčnih CD8 T limfocita te značajna redukcija proanagiogenetskih čimbenika kao VEGF, TGF-β, MMP-9 i TNF-α. Time je smanjenje tumorskih makrofaga učinkovito promijenilo tumorski mikrookoliš te tako smanjilo angiogenezu, tumorsku progresiju i metastaziranje, kao i imunosupresiju u tumoru.

Kao što je navedeno monociti izolirani iz periferne krvi pacijenata sa sepsom kao i makrofazi koji infiltriraju tumorsko tkivo obilježeni su ekspresijom IRAK-M i posljedično tome deaktiviranim fenotipom, te su stoga neučinkoviti u antimikrobnom i antitumorskom odgovoru. Sniženje ekspresije IRAK-M i reaktivacija takvih monocita/makrofaga mogla bi biti jedna od potencijalnih terapijskih strategija u svladavanju imunosupresije u sepsi te kod pacijenata s malignim tumorima. Stoga bi naši rezultati kojima se u *in vitro* experimentima na hiporeaktivnim monocitima uspjeva sniziti razina IRAK-M primjenom TLR7/8 agonista CL097 te posljedično tome postići visoka razina TNF-α i IL-12, mogli doprinjeti sličnim terapijskim strategijama. Naše je istraživanje prošireno i na *ex vivo* eksperimente kojima se istražio utjecaj agonista CL097 i izravno na krvi pacijenata s protrahiranom sepsom te onih s diseminiranim malignim tumorima gdje su se također dobili pozitivni rezultati njegovog imunostimulatornog učinka. Prije detaljnijeg prikaza navedenih rezultata, slijedi osvrt na još jedan važan učinak CL097, supresiju još jedne značajne molekule u negativnoj regulaciji TLR signalnog puta - Bcl-3, te također prikaz zašto je upravo TLR7/8 agonist izabran za pokuse reaktivacije.

CL097 suprimira ekspresiju još jedne molekule – negativnog regulatora TLR signalnog puta Bcl-3 (B cell leukemia-3), čime se dodatno razjašnjava njegov imunostimulacijski učinak. Bcl-3 blokira ubikvitinaciju p50, člana obitelji transkripcijskih faktora NF-κB, te tako stabilizira kompleks p50 koji inhibira transkripciju gena proinflamatornih citokina. U skladu s tim, Bcl-3 „knock-out" životinje i stanice (makrofazi, dendritične stanice i B limfociti) hipersenzitivni su na stimulaciju TLR-om te ne mogu ograničiti reakciju na lipopolisaharid (266). Ekspresija Bcl-3 tako ima ulogu u ograničavanju upalnog i imunološkog odgovora posljedično stimulaciji TLR receptora. Bcl-3 posreduje još jedan važan mehanizam imunosupresije. U radu Grundsrom i sur. (267) opisana je njegova uloga u transkripcijskoj represiji sinteze IL-2 CD4+ T limfocita te posljedično tome u indukciji njihove tolerancije.

TLR 7/8 agonist CL097 izabran je za eksperimente istraživanja upravo zbog njegovih već opisanih imunoreaktivirajućih učinaka. Tako je poznato da TLR7/8 agonisti suprimiraju funkciju T regulatornih limfocita i time posredno potiču aktivaciju T citotoksičnih limfocita važnih za specifični imunološki odgovor na maligno promijenjene stanice (302). Oni su također nužni za indukciju sinteze IL-12 i poticanje TH1 odgovora, ključnog za antitumorski i antivirusni imunitet. Stoga je i pretpostavljeno da bi upravo CL097 mogao imati reaktivirajući učinak na hiporeaktivne, deaktivirane monocite (289,303). Temeljem iznesenih svojstava agonisti TLR 7/8 receptora već se ispituju u kliničkim studijama za liječenje kronične infekcije virusom hepatitisa C (272).

Pokusi su započeti na izoliranim humanim monocitima deaktiviranog hiporeaktivnog fenotipa s ciljem njihove reaktivacije primjenom CL097. Kao što je već ranije rastumačeno njihova hiporeaktivnost odnosno tolerancija postignuta je produženom stimulacijom TLR4 agonistima, lipopolisaharidom ili hijaluronskom kiseliom, induktorima endotoksinske tolerancije u sepsi te tolerancije monocita u tumorskom tkivu. Kao što je prikazano u rezultatima, dodatak TLR7/8 agonista CL097 u kulturu monocita istodobno s TLR4 agonistima umanjio je njihov suprimirajući učinak na sintezu TNF-α i IL-12, te smanjio ekspresiju negativnih regultora TLR signalnog puta IRAK-M i Bcl-3, značajnih molekula za indukciju tolerancije monocita. Ovi rezultati dijelom odgovaraju već objavljenim istraživanjima koja su pokazala aditivni i sinergistički učinak stimulacije monocita različitim kombinacijama TLR agonista na sintezu citokina (270,286-291) te posebno onima koja su pokazala učinak stimulacije TLR7/8 i TLR4 receptora na stvaranje IL-12 i TNF-α kod

monocita (289) i dendritičkih stanica podrijetla monocita (288). Ono što do sada nije bilo poznato je upravo učinak TLR7/8 agonista na ekspresiju IRAK-M i Bcl-3.

U našim rezultatima dalje je zanimljiv istodobni porast citokina TNF-α i IL-12, kao i IL-10, tijekom kostimulacije TLR4 i TLR7/8 receptora monocita. Hartmann i sur. su naime pokazali da stimulacijom monocita kombinacijom TLR4 i TLR7/8 receptora dolazi do pada proizvodnje IL-10 te su time tumačili porast proinflamatornih citokina (289). Navedeni rezultati dobro koreliraju s našim rezultatima kostimulacije pune krvi agonistima TLR-a i sniženog stvaranja IL-10. No za razliku od toga, u našem istraživanju kostimulacija makrofaga u kulturi, agonistima TLR4 i TLR7/8 rezultirala je porastom IL-10. Rezultate slične našima objavile su i druge istraživačke grupe (288) gdje je također zabilježen porast mRNA IL-10 kod dendritičkih stanica porijekla monocita u sličnim uvjetima kultivacije i stimulacije. Stoga se može zaključiti da je razlika u stvaranju IL-10 nakon stimulacije TLR7/8 receptora, posljedica različitog stupnja diferencijacije monocita. Slično je objavljeno i za sintezu drugih citokina (304). Za razliku od do sada objavljenih rezultata Hartmanna i sur., u našem je istraživanju detektirana različita reaktivnost monocita i stvaranje IL-10, što se može povezati s različitim uvjetima kultivacije monocita. Naime, u našim pokusima monociti su najprije ostavljeni u kulturi tijekom 24 sata te su tek tada stimulirani TLR agonistima. Također tumačenje Hartmanna (289), koji navodi da kostimulacija TLR4 i TLR7/8 receptora upravo inhibicijom sinteze IL-10, izaziva porast IL-12 i TNF-α, dijelom je u kontradikciji s našim rezultatima. Naime u pokusima s blokirajućim protutijelima za IL-10, koji poništavaju njegov učinak, pokazano je da IL-10 samo djelomično suprimira sintezu TNF-α. Stoga se za izmjerene vrlo visoke vrijednosti TNF-α i IL-12 nakon kostimulacije TLR7/8 i TLR4 agonistima moraju potražiti i drugi uzroci, a ne samo inhibicija sinteze IL-10, kao što je do sada objavljeno (289).

Aktivacija signalnih puteva nakon kostimulacije TLR također je do sada opisana u vrlo malo publikacija (257). Kao što je već pokazano u rezultatima, CL097 koči indukciju Bcl-3 i IRAK-M, imunosupresivnih molekula koje inducira stimulacija TLR4. Stimulacija samo CL097-om ne izaziva masivni porast sinteze citokina unatoč niskim razinama Bcl-3 i IRAK-M. Moguće objašnjenje je da nedostaje dodatni proinflamatorni stimulus koji nalazimo kod kostimulacije TLR4 i TLR7/8. Pri istodobnoj stimulaciji TLR4 i TLR7/8 čini se kako CL097 koči negativnu povratnu spregu induciranu s TLR4, koja obično rezultira pojačanom ekspresijom IRAK-M (253,258,263). Na temelju naših podataka može se zaključiti da CL097

dovodi do protrahirane sinteze citokina inhibicijom navedene negativne povratne sprege. Uspoređujući dobivene bazalne razine IRAK-M (u kulturi makrofaga bez stimulacije) za razliku od rezultata del Fresna i sur. (263) detektirana je povišena ekspresija IRAK-M. Ova razlika mogla bi biti posljedica razlike u diferencijaciji monocita, budući da je del Fresno koristio svježe izolirane monocite u eksperimentima, dok su u našim pokusima bili prethodno kultivirani tijekom 24 sata. U našim je pokusima opaženo da kultivacija monocita do makrofaga dovodi do vremenski ovisnog porasta razine IRAK-M, što može biti znak nespecifične aktivacije i diferencijacije.

Kada se promotri problem istodobne sinteze proinflamatornih (TNF-α i IL-12) i antiinflamatornih citokina (IL-10) nakon kostimulacije TLR4 i TLR7/8 agonistima, a uzimajući u obzir ekspresiju signalnih molekula Bcl-3 i IRAK-M, također se može naći pojašnjenje ove pojave. Tako kod Bcl-3 „knock-out“ miševa stimulacija LPS-om izaziva porast oba citokina TNF-α i IL-10 (266). Slično tomu, u našim pokusima kostimulacijom TLR4 i TLR7/8 suprimirana je ekspresija Bcl-3 te je dobiven sličan uzorak sinteze pro- i antiiinflamatornih citokina. S druge strane, niska razina IRAK-M mogla bi biti odgovorna za pojačanu ekspresiju citokina nakon kostimulacije TLR4 i TLR7/8, budući se kod IRAK-M -/- miševa nalazi izrazito povećana ekspresija TNF-α i IL-12 nakon *ex vivo* LPS stimulacije (260). Ono što se također zapazilo u navedenom radu je da se kod ovog modela miševa (IRAK-M -/-) također nalazi porast sinteze IL-10 u makrofazima nakon izlaganja bakterijskom stimulusu (LPS-u). Ovi rezultati dobro koreliraju s porastom IL-10 zabilježenim nakon kostimulacije TLR-om u našim *ex vivo* eksperimentima.

Kako bi se testirao učinak TLR7/8 na stanicama karakteriziranim imuno-paralizom, učinjeni su eksperimenti *ex vivo* stimulacije pune krvi pacijenata s protrahiranom sepsom i diseminiranim malignim tumorima. Ranije je pokazano kako je karakteristika imunosupresije izazvana sepsom polarizacija stanica periferne krvi prema većoj sintezi IL-10, te je to potvrđeno u serumu pacijenata sa sepsom (305). Ovi rezultati odgovaraju ranije učinjenim pokusima koji su rezultirali pojačanom proizvodnjom IL-10 (292) te sniženom TNF-α nakon *ex vivo* stimulacije pune krvi pacijenata s LPS-om (248). Našim je istraživanjem pokazano slično stanje imunosupresije kod *ex vivo* stimulacije pune krvi pacijenata s diseminiranim malignim tumorima. Te stanice dodatno je karakterizirala i pojačana proizvodnja IL-10 nakon stimulacije LPS-om. Uspoređujući rezultate kostimulacije TLR4 i TLR7/8 pune krvi zdravih dobrovoljaca i kulture njihovih makrofaga, pronađena je razlika u njihovom odgovoru, ne

potpuno neočekivano, budući da i druge krvne stanice pojačavaju sinergistički učinak koji je nađen u kulturi makrofaga. Tako kostimulacija TLR4 i TLR7/8 pune krvi zdravih dobrovoljaca dovodi do znatno više razine TNF-α od one nađene u kulturi. U pokusima *ex vivo* stimulacije krvi pacijenata sa sepsom i tumorima nađena je pojačana ekspresija TNF-α kada se TLR4 agonistu dodao TLR7/8 agonist, a uzorak proizvodnje ovog citokina nakon stimulacije različitim kombinacijama TLR agonista zadržan je u istom omjeru kao i u monocitnoj kulturi. Ovi rezultati upućuju na potencijalni stimulirajući učinak primjene TLR7/8 agonista na stvaranje citokina u krvi pacijenata. Oni su također značajni budući da bi se deaktivirani fenotip stanica periferne krvi navedenih bolesnika (251) i neodgovarajuća reaktivnost TLR signalnog puta u krvi septičnih pacijenata (254) teoretski mogla dokinuti primjenom TLR7/8 agonista. Navedeno korelira i s istraživanjem (199) koje je pokazalo da TLR8 agonisti učinkovito aktiviraju antigen prezentirajuće stanice kod neonatusa. Na značaj ovih rezultata ukazuju i raniji radovi u kojima je jasno pokazano da je hiporeaktivnost periferne krvi septičnih pacijenata nakon stimulacije LPS-om znak izrazito loše prognoze (250).

U istraživanju je uočen još jedan zanimljiv rezultat, koji do sada nije opisan u literaturi. Naime pokazano je da je hijaluronska kiselina snažniji induktor sinteze proinflamatornih citokina nakon *ex vivo* stimulacije pune krvi zdravih dobrovoljaca u odnosu na LPS, dok su u pokusima stimulacije krvi pacijenata sa sepsom i malignim tumorima hijaluronska kiselina i LPS imali sličan učinak na sintezu citokina. Budući da su povišene vrijednosti hijaluronske kiseline nađene u serumu pacijenata s nizom malignih tumora (306-309) postavlja se pitanje njezinog potencijalnog učinka na imunitet na sistemskoj razini te tako i na prognozu pacijenata. Smatra se da je izvor povišene razine hijaluronske kiseline u serum pacijenata upravo u lokalnom tkivu tumora, gdje ona ima deaktivirajući učinak na makrofage te vrlo vjerojatno doprinosi inavaziji i metastaziranju tumora (263,310,311). Međutim još nije potpuno razjašnjen učinak njezine povišene koncentracije u serumu. Studije koje su pokušale povezati serumsku razinu hijaluronske kiseline i prognozu pacijenata s malignim tumorima, dale su oprečne rezultate. Tako je studija s pacijentima koji boluju od multiplog mijeloma pokazala da je i znatno povišena kao i snižena koncentracija hijaluronske kiseline u serumu povezana s lošijom prognozom ovih pacijenata (306). Uzimajući u obzir da su pacijenti s diseminiranim malignim bolestima u stanju imunosupresije (312-314), te imunosupresivne učinke hijaluronske kiseline na stanice imuniteta lokalno u tumorskom tkivu, ipak će biti

potrebna daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti rasvijetlila uloga hijaluronske kiseline u indukciji sistemske imunosupresije ovih pacijenata.

Zaključno, razmatrajući naše rezultate može se reći da se istraživanjem potvrdila postavljena hipoteza radnje. Pronađena je strategija za inhibiciju ekspresije dvije molekule IRAK-M i Bcl-3 koje se povezuju s TLR-4 induciranim hiporeaktivitetom, molekulom CL097, agonistom TLR7/8 receptora. Budući da IRAK-M i Bcl-3 mogu doprinositi imunopatologiji sepse i malignih bolesti naši rezultati predstavljaju osnovu za potencijalnu terapijsku primjenu TLR7/8 agonista u navedenim stanjima imunosupresije. Ovaj bi se pristup mogao upotrijebiti i kod drugih vidova imunomodulirajućih liječenja.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata opisanog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Sintetski TLR7/8 agonist CL097 statistički značajno smanjuje ekspresiju proteina IRAK-M i Bcl-3, negativnih regulatora TLR4 signalnog puta, u kulturi hiporeaktivnih makrofaga čija je hiporeaktivnost postignuta protrahiranom stimulacijom lipopolisaharidom (LPS-om) ili hijaluronskom kiselinom (HA).
2. TLR7/8 agonist CL097 primijenjen istodobno s TLR4 agonistima lipopolisaharidom ili hijaluronskom kiselinom, statistički značajno pojačava sintezu citokina (TNF-α, IL-12, IL-10) odnosno postiže sinergistički učinak u odnosu na izoliranu stimulaciju TLR agonistima u kulturi makrofaga. Dakle, TLR7/8 agonist reaktivira sintezu TNF-α i IL-12 u hiporeaktivnim makrofazima, a sinteza TNF-α samo je djelomično inhibirana visokim razinama IL-10.
3. TLR7/8 agonist CL097 tijekom kostimulacije s TLR4 u kulturi hiporeaktivnih makrofaga ne izaziva statistički značajnu razliku u ekspresiji površinskih molekula povezanih s aktiviranim fenotipom makrofaga (TLR2, TLR4, CD40, CD80) i receptora za manozu (MR) te se može zaključiti da njegov učinak na sintezu citokina nije utemeljen na potpunoj promjeni fenotipa makrofaga iz M2 u M1.
4. Usporedbom imunoreaktivnosti (stvaranja citokina nakon *ex vivo* stimulacije TLR agonistima) pune krvi bolesnika sa sepsom i malignim diseminiranim tumorima s onom zdravih dobrovoljaca pokazana je statistički značajno nižu sintezu proinflamatornog citokina TNF-α kod pokusa na krvi septičnih pacijenata u odnosu na zdrave dobrovoljce, dok ta razlika nije uočena kod pokusa na krvi pacijenata s malignim bolestima. Sinteza IL-10 bila je statistički značajno veća kod eksperimenata na krvi pacijenata s malignomima i sepsom u odnosu na zdrave dobrovoljce. IL-12 je induciran samo u krvi zdravih dobrovoljaca, dok je bio nemjerljiv u krvi pacijenata sa sepsom i malignomima.
5. Pokušaj imunomodulacije/reaktivacije krvi bolesnika *ex vivo* stimulacijom TLR7/8 agonistom dao je sljedeće rezultate: pojačavajući učinak CL097 na sintezu TNF-α tijekom kostimulacije s TLR4 agonistima bio je statistički značajan samo u kombinaciji LPS i CL097 kod pacijenata s malignomima, dok je kod pacijenata sa sepsom njegov pojačavajući učinak bio značajan u kombinaciji s oba TLR4 agonista (LPS i HA).

7. KRATKI SARDŽAJ

Protrahirana ili ponovljena stimulacija Toll-like receptora 4 izaziva hiporeaktivitet monocita odnosno makrofaga koji tako promijenjenog fenotipa posreduju u razvoju imunosupresije u sepsi te kod malignih bolesti. Nalazimo ih u perifernoj krvi pacijenata sa sepsom te kao dio infiltrata tumorske strome, gdje njihova prisutnost označava lošiju prognozu bolesti. Dvije signalne molekule, IRAK-M (interleukin-1 receptor-associated kinase-M) i Bcl-3 (B-cell leukaemia-3), negativni regulatori signalnog puta Toll-like receptora 4, povezuju se s indukcijom hiporeaktiviteta u monocita/makrofaga. Ovo istraživanje je pokazalo da dodavanje agonista Toll-like receptora 7/8, spoja CL097, u kulturu hiporeaktivnih monocita koči ekspresiju oba negativna regulatora, unatoč protrahiranoj stimulaciji Toll-like receptora 4 lipopolisaharidom ili hijaluronskom kiselinom. Smanjena ekspresija IRAK-M i Bcl-3 u navedenim uvjetima kulture makrofaga bila je popraćena povećanom proizvodnjom citokina TNF-α, IL-10 i IL-12. Proširujući istraživanje na *ex vivo* stimulaciju periferne krvi pacijenata sa sepsom i malignim diseminiranim tumorima, pokazalo se da TLR7/8 agonist zadržava učinak reaktivacije oslabljene sinteze TNF-α. Zaključno, navedeni rezultati mogli bi doprinjeti razumijevanju patogeneze imunosupresije u sepsi te kod diseminiranih malignih tumora.

Ključne riječi: imunosupresija, lipopolisaharid, Toll-like receptori, IRAK-M, Bcl-3, citokini

8. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU

THE INFLUENCE OF TOLL-LIKE RECEPTOR 7/8 (CL097) AGONIST ON THE EXPRESSION OF SIGANLLING MOLECULES IRAK-M AND BCL-3, HALLMARKS OF IMMUNOSUPPRESSION IN PROLONGED SEPSIS AND CANCER

Prolonged or repeated stimulation of Toll-like receptor (TLR)-4 leads to hypo-responsiveness of monocyte derived macrophages which appears to be a hallmark of immunosuppression related to sepsis and cancer. Such hyporesponsive monocytes/macrophages are found in peripheral blood of septic patients and in tumor stroma, where their presence correlates with worse disease outcome. Two negative regulators of TLR-4 signalling are connected with the induction of hyporesponsive state of monocytes/macrophages, interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M and B-cell leukemia (Bcl)-3. Here we demonstrate that the expression of both proteins is inhibited when the TLR-7/8 agonist CL097 is added to monocyte cultures, despite co-stimulation with the TLR-4 agonist lipopolysaccharide (LPS) or hyaluronic acid. Reduction of IRAK-M and Bcl-3 was paralleled by a significant increased cytokine induction of TNF-α, IL-10 and IL-12 observed after intra- and extracellular TLR stimulation. In *ex vivo* stimulated whole blood of patients suffering from prolonged sepsis or metastatic cancer, TLR-7/8 agonists retained their ability of increased stimulation of TNF-α. These data might add to the understanding of sepsis and cancer-associated immune suppression in men.

Key Words: immunosuppression, lipopolysaccharide, Toll-like receptors, IRAK-M, Bcl-3, cytokines

9. POPIS LITERATURE

1. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol 2005;17:1–14.
2. Liew FY, Xu E, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat Rev Immunol 2005;5:446–458.
3. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004;4:499–511.
4. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. Semin Immunol 2004;16:3–9.
5. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. Nat Immunol 2004;5:975–979.
6. Chaudhuri N, Dower SK, Whyte MK, Sabroe I. Toll-like receptors and chronic lung disease. Clin Sci 2005;109:125–133.
7. Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, Kurrer MO, Oudit GY, Watts TH. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. Nat Med 2003;9:1484–1490.
8. Chen K, Iribarren P, Hu J, Chen J, Gong W, Cho EH. Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide. J Biol Chem 2006;281:3651–3659.
9. Cui H, Le Y, Gong W, Proost P, Van Damme J, Murphy WJ. Bacterial lipopolysaccharide selectively up-regulates the function of the chemotactic peptide receptor formyl peptide receptor 2 in murine microglial cells. J Immunol 2002;168:434–442.
10. Iribarren P, Chen K, Hu J, Gong W, Cho EH, Lockett S. CpG-containing oligodeoxynucleotide promotes microglial cell uptake of amyloid beta 1-42 peptide by up-regulating the expression of the G-protein-coupled receptor mFPR2. FASEB J 2005;19:2032–2034.
11. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. Science 2004;303:1522–1526.
12. Sabroe I, Read RC, Whyte MK, Dockrell DK, Vogel SN, Dower SK. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain. J Immunol 2003;171:1630–1635.

13. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. J Immunol 2000;165:618–622.
14. Finberg W, Re F, Popova L, Golenbock DT, Kurt-Jones EA. Cell activation by Toll-like receptors: role of LBP and CD14. J Endotoxin Res 2004;10:413–418.
15. Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. J Immunol 2001;166:574–581.
16. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:1966–1971.
17. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat Immunol 2000;1:398–401.
18. Knapp S, Wieland CW, van 't Veer C, Takeuchi O, Akira S Florquin S. Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. J Immunol 2004;172:3132–3138.
19. Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shurtleff BA, Smith JA, Keane J. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. J Immunol 2001;166:4074–4082.
20. Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM. Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli. J Immunol 2001;167:5278–5285.
21. Katz J, Zhang P, Martin M, Vogel SN, Michalek SM. Toll-like receptor 2 is required for inflammatory responses to Francisella tularensis LVS. Infect Immun 2006;74:2809–2816.
22. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature 2001;413:732–738.
23. Diebold S, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis C, Sousa E. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science 2004;303:1529–1531.

24. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science 2004;303:1526–1529.
25. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. Eur J Immunol 2003;33:2987–2997.
26. Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. Clin Exp Dermatol 2002;27:571–577.
27. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and- independent pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:11416–11421.
28. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med 2003;198:513–520.
29. Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli S. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. J Immunol 2004;173:7406–7415.
30. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:3516–3521.
31. Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. Immunity 2004;21:107–119.
32. Yarovinsky E, Zhang D, Andersen JF. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. Science 2005;308:1626–1629.
33. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. Science 2002;298:1025–1029.
34. Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. J Biol Chem 2001;267:5197–5203.
35. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim YJ, Strassheim D, Ishizaka A. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. J Biol Chem 2004;279:7370–7377.

36. Guillot J, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M, Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. J Immunol 2002;168:5989–5992.
37. Smiley T, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. J Immunol 2001;167:2887–2894.
38. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J Biol Chem 2001;276:10229–10233.
39. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. J Exp Med 2002;195:99–111.
40. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. Curr Opin Immunol 2005;17:359–365.
41. Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. J Leukoc Biol 2004;76:514–519.
42. McKimmie CS, Fazakerley JK. In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression. J Neuroimmunol 2005;169:116–125.
43. Kawai T, Akira S. TLR signaling, Semin Immunol 2007;19:24–32.
44. Akira S, Takeda K Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2001;2:675–680.
45. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. Immunity 1999;11:115–122.
46. Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. Int. Immunol 2000;12:113–117.
47. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the Mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. J Immunol 2000;164:554–557.
48. Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. J Exp Med 2000;192:595–600.

49. Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. Curr Biol 2000;10:1139–1142.
50. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo S, Hoshino K. Small antiviral compounds activate immune cells via TLR7 MyD88-dependent signalling pathway. Nat Immunol 2002;3:196–200.
51. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. Nature 2001;410:1099–1103.
52. Cao Z, Henzel WJ, Gao X. Irak: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. Science 1996;271:1128–1131.
53. Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. Mol Cell 2003;11:293–302.
54. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:5567–5572.
55. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. Cell 2002;110:191–202.
56. Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)—a family of adapter proteins that regulates life and death. Genes Dev 1998;12:2821–2830.
57. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You L. Activation of the IÉB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. Cell 2000;103:351–361.
58. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue JI, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature 2001;412:346–351.
59. Doyle E, Vaidya SA, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey PW, Wu TT. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. Immunity 2002;17:251–263.
60. Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-β-induced STAT1α/β-dependent gene expression in macrophages. Nat Immunol 2002;3:392–398.
61. Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. Differential involvement of IFN-β in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. Int Immunol 2002;4:1225–1231.

62. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT. IKKε and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. Nat Immunol 2003;4:491–496.
63. Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. Biochem Sic Trans 2003;31:637-642.
64. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. Nat Immunol 2001;2:835–841.
65. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies C, Mansell AS, Brady G. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature 2001;413:78–83.
66. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-β promoter in the Toll-like receptor signaling. J Immunol 2002;169:6668–6672.
67. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-β induction. Nat Immunol 2003;4:161–167.
68. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. Nature 2002;420:329–333.
69. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T. Essential role of TIRAP/Mal for activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature 2002;420:324–329.
70. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. Science 2003;301:640–643.
71. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. Nature 2003;424:743–748.
72. Wang J, Hu Y, Wen Deng W, Sun B. Negative regulation of Toll-like receptor signalling pathway. Microbes Infect 2009;11:321-327.
73. Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating toll-like receptors. Nat Immunol 2004;5:495–502.
74. Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray P, Fenner JE, Crack PJ, Nicholson SE, Hilton DJ, O'Neill LA,. Hertzog PJ. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. Nat Immunol 2006;7:148–155.

75. Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, Yamaoka S. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. Nat Immunol 2006;7:598–605.
76. Shi M, Deng W, Bi E, Mao K, Ji Y, Lin G, Wu X, Tao Z, Li Z, Cai X, Sun S, Xiang C, Sun B. TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. Nat Immunol 2008;9:369–377.
77. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C, Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of toll-like receptor responses. Nat Immunol 2004;5:1052–1060.
78. Yoshida H, Jono H, Kai H, Li JD. The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 and TRAF7. J Biol Chem 2005;280:41111–41121.
79. Kayagaki N, Phung Q, Chan S, Chaudhari R, Quan C, O'Rourke RM, Eby M, Pietras E, Cheng G, Bazan JF, Zhang, Arnott D, Dixit VM. Duba: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. Science 2007;318:1628–1632.
80. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent toll-like receptor signaling. Nat Immunol 2006;7:1074–1081.
81. Negishi N, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, Matsuyama T, Taniguchi T, Honda K. Negative regulation of toll-like-receptor signaling by IRF-4. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:15989–15994.
82. Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, Finberg RW, Tarakhovsky A, Vogel SN, Belkaid Y, Kurt-Jones EA, Karp CL, Negative regulation of toll-like receptor 4 signaling by the toll-like receptor homolog RP105. Nat Immunol 2005;6:571–578.
83. Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. Curr Biol 2002;12:467–471.
84. Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. J Exp Med 2003;197:263–268.

85. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of toll-like receptor signaling. Cell 2002;110:191–202.

86. Carmody RJ, Ruan Q, Palmer S, Hilliard B, Chen YH. Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. Science 2007:317:675–678.

87. Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, Kuang AA, Ho M, Morici LA, Lenz LL, Cado D, Riley LW, Winoto A. TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. Immunity 2004;21:877–889.

88. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikacharoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. J Immunol 2000;165:6682–6686.

89. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, Griffin GE, Ferrara G, Schiffrin EJ, Morgan BP, Labeta MO. Soluble forms of toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. J Immunol 2003;171:6680–6689.

90. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. J Immunol 2004;173:3916–3924.

91. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 2002;61:1013–1021.

92. Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W. Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor. FPR-like-1. J Neurosci 2001;21:RC123.

93. DiCarlo G, Wilcock D, Henderson D, Gordon M, Morgan D. Intrahippocampal LPS injections reduce Abeta load in APP+PS1 transgenic mice. Neurobiol Aging 2001;22:1007–1012.

94. Herber DL, Roth LM, Wilson D, Wilson N, Mason JE, Morgan D. Time-dependent reduction in Abeta levels after intracranial LPS administration in APP transgenic mice. Exp Neurol 2004;190:245–253.

95. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP. Microglia and multiple sclerosis. J Neurosci Res 2005;81:363–373.

96. Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Gutcher I, Wolter K. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. J Clin Invest 2006;116:456–464.

97. Sorensen TL, Trebst C, Kivisakk P, Klaege KL, Majmudar A,. Ravid R. Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. J Neuroimmunol 2002;127:59–68.

98. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. J Biol Chem 2005;280:5571–5580.

99. Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R, Prince A. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. J Clin Invest 2004;113:1482–1489.

100. Sukkar MB, Xie S, Khorasani NM, Kon OM, Stanbridge R, Issa R. Toll-like receptor 2, 3, and 4 expression and function in human airway smooth muscle. J Allergy Clin Immunol 2006;118:641–648.

101. Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. J Immunol 2003;171:417–425.

102. Morris GE, Whyte MK, Martin GF, Jose PJ, Dower SK, Sabroe I. Agonists of toll-like receptors 2 and 4 activate airway smooth muscle via mononuclear leukocytes. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:814–822.

103. Prince RL, Allen L, Jones EC, Hellewell PG, Dower SK, Whyte MK. The role of interleukin-1beta in direct and toll-like receptor 4-mediated neutrophil activation and survival. Am J Pathol 2004;165:1819–1826.

104. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. J Exp Med 2002;196:1645–1651.

105. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. J Exp Med 2003;197:403–411.

106. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. Science 2003;299:1033–1036.

107. Constant SL, Brogdon JL, Piggott DA, Herrick CA, Visintin I, Ruddle NH. Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation in situ. J Clin Invest 2002;110:1441–1448.

108. Schilling D, Thomas K, Nixdorff K, Vogel SN, Fenton MJ. Toll-like receptor 4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter-like (Mal) contribute to maximal IL-6 expression in macrophages. J Immunol 2002;169:5874–5880.
109. Patel M, Xu D, Kewin P, Choo-Kang B, McSharry C, Thomson NC. TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. J Immunol 2005;174:7558–7563.
110. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Droisophila adults. Cell 1996;86:973–983.
111. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. J Allergy Clin Immunol 2004;113:482–488.
112. Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. Curr Opin Immunol 2000;12:35–43.
113. Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur S, Alam R, Klinman DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol 1999;162:6284–6293.
114. Wild JS, Choudhury BK, Sur. S. CpG DNA modulation of allergic asthma. Isr Med Assoc J 2000;2:13–15 Suppl.
115. Lorenz E, Jones M, Wohlford-Lenane C, Meyer N, Frees KL, Arbour NC. Genes other than TLR4 are involved in the response to inhaled LPS. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;281:1106–1114.
116. Basu S, Fenton MJ. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;286:887–892.
117. Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:29–32.
118. SD Shapiro, Campbell EJ, Kobayashi DK, Welgus HG. Dexamethasone selectively modulates basal and lipopolysaccharide-induced metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production by human alveolar macrophages. J Immunol 1991;146:2724–2729.
119. Rodriguez N, Wantia N, Fend F, Durr S, Wagner H, Miethke T. Differential involvement of TLR2 and TLR4 in host survival during pulmonary infection with Chlamydia pneumoniae. Eur J Immunol 2006;36:1145–1155.

120. Tjarnlund A, Guirado E, Julian E, Cardona PJ, Fernandez C. Determinant role for Toll-like receptor signalling in acute mycobacterial infection in the respiratory tract. Microbes Infect 2006;8:1790–1800.
121. MB Drennan, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. Am J Pathol 2004;164:49–57.
122. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. J Exp Med 2005;202:1715–1724.
123. Archer KA, Roy CR. MyD88-dependent responses involving toll-like receptor 2 are important for protection and clearance of Legionella pneumophila in a mouse model of Legionnaires' disease. Infect Immun 2006;74:3325–3333.
124. Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB, Levitz SM. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen Cryptococcus neoformans in vivo. Infect Immun 2004;72:5373–5382.
125. Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, Alexopoulou L, Escriou N, Flavell R. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. PLOS Pathog 2006;2:53-63.
126. Fukui T, Nishio A, Okazaki K, Uza N, Ueno S, Kido M. Gastric mucosal hyperplasia via upregulation of gastrin induced by persistent activation of gastric innate immunity in major histocompatibility complex class II deficient mice. Gut 2006;55:607–615.
127. Ishihara S, Rumi MA, Kadowaki Y, Ortega-Cava CF, Yuki T, Yoshino N. Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during Helicobacter pylori-associated gastritis. J Immunol 2004;176:1406–1416.
128. Otte JM, Rosenberg IM, Podolsky DK. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. Gastroenterology 2003;124:1866–1878.
129. Gewirtz AT, Simon Jr. PO, Schmitt CK, Taylor LJ, Hagedorn CH, O'Brien AD. Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. J Clin Invest 2001;107:99–109.
130. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. Infect Immun 2000;68:7010–7017.
131. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor

(TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. Gut 2004;53:987–992.

132. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. Clin Immunol 2004;112:85–91.

133. Singh JC, Cruickshank SM, Newton DJ, Wakenshaw L, Graham A, Lan J. Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;288:514–524.

134. Sitaraman SV, Klapproth JM, Moore III DA, Landers C, Targan S, Williams IR. Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;288:403–406.

135. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. J Clin Invest 2004;113:1296–1306.

136. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:599–603.

137. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:603–606.

138. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. Eur J Immunol 2004;34:2052–2059.

139. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. Nat Immunol 2004;5:800–808.

140. Backhed F, Rokbi B, Torstensson E, Zhao Y, Nilsson C, Seguin D. Gastric mucosal recognition of Helicobacter pylori is independent of Toll-like receptor 4. J Infect Dis 2003;187:829–836.

141. Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG. Intact gram-negative Helicobacter pylori, Helicobacter felis, and Helicobacter hepaticus bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. Infect Immun 2004;72:6446–6454.

142. Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Muller-Hermelink HK, Eck M. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with Helicobacter pylori. Int J Med Microbiol 2005;295:179–185.
143. Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in chickens. Infect Immun 2003;71:1116–1124.
144. Lembo A, Kalis C, Kirschning CJ, Mitolo V, Jirillo E, Wagner H. Differential contribution of Toll-like receptors 4 and 2 to the cytokine response to Salmonella enterica serovar Typhimurium and Staphylococcus aureus in mice. Infect Immun 2003;71:6058–6062.
145. Khan MA, Kang J, Steiner TS. Enteroaggregative Escherichia coli flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. Immunology 2004;112:651–660.
146. Aliprantis AO, Weiss DS, Radolf JD, Zychlinsky A. Release of Toll-like receptor-2-activating bacterial lipoproteins in Shigella flexneri culture supernatants. Infect Immun 2001;69:6248–6255.
147. Maldonado-Bernal C, Kirschning CJ, Rosenstein Y, Rocha LM, Rios-Sarabia N, Espinosa-Cantellano M. The innate immune response to Entamoeba histolytica lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. Parasite Immunol 2005;27:127–137.
148. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y. Roles of toll-like receptors in C–C chemokine production by renal tubular epithelial cells. J Immunol 2002;169:2026–2033.
149. Lehmann J, Retz M, Harder J, Krams M, Kellner U, Hartmann J. Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. BMC Infect Dis 2002;2:20-30.
150. Cunningham PN, Wang Y, Guo R, He G, Quigg RJ. Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. J Immunol 2004;172:2629–2635.
151. Nitschke M, Wiehl S, Baer PC, Kreft B. Bactericidal activity of renal tubular cells: the putative role of human beta-defensins. Exp Nephrol 2002;10:332–337.
152. Anders HJ, Banas B, Schlondorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. J Am Soc Nephrol 2004;15:854–867.

153. Baker BS, Ovigne JM, Powles AW, Corcoran S, Fry L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. Br J Dermatol 2003;148:670–679.
154. Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, Szell M. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. Int Immunol 2003;15:721–730.
155. Mempel M, Voelcker V, Kollisch G, Plank C, Rad R, Gerhard M. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. J Invest Dermatol 2003;121:1389–1396.
156. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. Nat Med 2003;9:525–532.
157. Kim J, Ochoa MT, Krutzik SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. J Immunol 2002;169:1535–1541.
158. Curry JL, Qin JZ, Bonish B, Carrick R, Bacon P, Panella J. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. Arch Pathol Lab Med 2003;127:178–186.
159. McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. J Invest Dermatol 2005;125:1–8.
160. Bulut Y, Faure E, Thomas L, Equils O, Arditi M. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and Borrelia burgdorferi outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. J Immunol 2001:167:987–994.
161. Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen JT. Hyporesponsiveness to vaccination with Borrelia burgdorferi OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. Nat Med 2002;8:878–884.
162. Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ, Redmond HP. Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? Br J Cancer 2006;95:247–252.
163. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Sheu BS, Muta T, Inoue H. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by Helicobacter pylori involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. Mol Pharmacol 2004;66:1465–1477.
164. Harmey JH, Bucana CD, Lu W, Byrne AM, McDonnell S, Lynch C. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased

angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. Int J Cancer 2002;101:415–422.

165. Wang JH, Manning BJ, Wu QD, Blankson S, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF-kappa B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a beta 1 integrin-dependent mechanism. J Immunol 2003;170:795–804.
166. Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. Cancer Cell 2004;6:297–305.
167. Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. Cancer Res 2005;65:5009–5014.
168. Cheadle EJ, Jackson AM. Bugs as drugs for cancer. Immunology 2002;107:10–19.
169. Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette–Guerin: involvement of toll-like receptors. Infect Immun 2000;68:6883–6890.
170. Okamoto M, Oshikawa T, Tano T, Ohe G, Furuichi S, Nishikawa H. Involvement of Toll-like receptor 4 signaling in interferon-gamma production and antitumor effect by streptococcal agent OK-432. J Natl Cancer Inst 2003;95:316–326.
171. Whitmore MM, DeVeer MJ, Edling A, Oates RK, Simons B, Lindner D. Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. Cancer Res 2004;64:5850–5860.
172. Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poeck H, Hartmann E. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. Clin Cancer Res 2005;11:1490–1499.
173. Urosevic M, Dummer R, Conrad C, Beyeler M, Laine E, Burg G. Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment. J Natl Cancer Inst 2005;97:1143–1153.
174. El Andaloussi A, Sonabend AM, Han Y, Lesniak MS. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. Glia 2006;54:526–535.
175. Spaner DE, Masellis A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2007;21:53–60.

176. Hopkins PA, Sriskandan S. Toll-like receptors: to immunity and beyond. Clin Exp Immunol 2005;140:395–407.
177. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. J Immunol 2003;171:4984–4989.
178. Koski GK, Czerniecki BJ. Combining innate immunity with radiation therapy for cancer treatment. Clin Cancer Res 2005;11:7–11.
179. Sfondrini L, Rossini A, Besusso D, Merlo A, Tagliabue E, Menard S. Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer. J Immunol 2006;176:6624–6630.
180. Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. J Immunol 2006;176:4894–4901.
181. Szczepanski M, Stelmachowska M, Stryczynski L, Golusinski W, Samara H, Mozer-Lisewska I. Assessment of expression of toll-like receptors 2, 3 and 4 in laryngeal carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol 2007;264:525–530.
182. Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:9577–9578.
183. Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA. Molecular basis for immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:6646–6651.
184. Miggin SM, O'Neill LAJ. New insights into the regulation of TLR signaling. J Leukoc Biol 2006;80:220–226.
185. Nishiya T, DeFranco AL. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. J Biol Chem 2004;279:19008–19017.
186. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of single-stranded RNA. Science 2004;303:1529–1531.
187. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. Science 2004;303:1526–1529.
188. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:5598–5603.

189. Kariko K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. Immunity 2005;23:165–175.
190. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. Nat Immunol 2002;3:196–200.
191. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. Nat Immunol 2002;3:499-503.
192. Sidky YA, Borden EC, Weeks CE, Reiter MJ, Hatcher JF, Bryan GT. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinoline. Cancer Res 1992;52:3528–3533.
193. Wagner TL, Horton VL, Carlson GL. Induction of cytokines in Cynomolgus monkeys by the immune response modifiers, imiquimod, S-27609 and S-28463. Cytokine 1992;9:837–845.
194. Imbertson LM, Beaurline JM, Couture AM, Gibson SJ, Smith RMA, Miller RL. Cytokine induction in hairless mouse and rat skin after topical application of the immune response modifiers imiquimod and S-28463. J Invest Dermatol 1998;110:734–739.
195. Bernstein DI, Harrison CJ, Tomai MA, Miller RL. Daily or weekly therapy with resiquimod (R848) reduces genital recurrences in herpes simplex virus-infected guinea pigs during and after treatment. J Infect Dis 2000;183:844–849.
196. Burns R, Ferbel B, Tomai MA, Miller RL, Gaspari A. The imidazoquinolines, imiquimod and R-848, induce functional, but not phenotypic, maturation of human epidermal Langerhans cells. Clin Immunol 2000;94:13–23.
197. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. J Immunol 2005;174:1259–1268.
198. Gorski KS, Waller EL, Bjornton-Severson J, Hanten JA, Riter CL, Kieper WC. Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists. Int Immunol 2006;18:1115–1126.
199. Levy O, Suter EE, Miller RL, Wessels MR. Unique efficacy of Toll-like receptor 8 agonists in activating human neonatal antigen-presenting cells. Blood 2006;108:1284–1289.

200. Qin J, Yao J, Cui G, Xiao H, Kim TW, Fraczek J. TLR8-mediated NF-kappaB and JNK activation are TAK1-independent and MEKK3-dependent. J Biol Chem 2006;281:21013–21021.

201. Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K, Koup RA, Miles AP, Saul A. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. J Exp Med 2006:203:1249–1258.

202. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. Eur J Immunol 2003;33:2987–2997.

203. Pope BL, MacIntyre JP, Kimball E, Lee S, Zhou L, Taylor GR. The immunostimulatory compound 7-allyl-8-oxoguanosine (loxoribine) induces a distinct subset of murine cytokines. Cell Immunol 1995;162:333–339.

204. Reiter MJ, Testerman TL, Miller RL, Weeks CE, Tomai MA. Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. J Leukoc Biol 1994;55:234–240.

205. Gibson SJ, Imbertson LM, Wagner TL. Cellular requirements for cytokine production in response to the immunomodulators imiquimod and S-27609. J Interferon Cytokine Res 1995;15:537–545.

206. Megyeri K, Au W-C, Rosztoczy I. Stimulation of interferon and cytokine gene expression by imiquimod and stimulation by sendai virus utilize similar signal transduction pathways. Mol Cell Biol 1995;15:2207–2218.

207. Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. Clin Exp Dermatol 2002;27: 571–577.

208. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature 2006;441:431–436.

209. Buates S, Matlashewski G. Identification of genes induced by a macrophage activator, S-28463, using gene expression array analysis. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1137–1142.

210. Dummer R, Urosevic M, Kempf W, Hoek K, Hafner J, Burg G. Imiquimod in basal cell carcinoma: how does it work? Br J Dermatol 2003;149(Suppl. 66):57–58.

211. Weeks CE, Gibson SJ. Induction of interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite R-842 in human blood cells in vitro. J Interferon Cytokine Res 1994;14:81–85.

212. Palamara F, Meindl S, Holcmann M, Luhrs P, Stingl G, Sibilia M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. J Immunol 2004;173:3051–3061.
213. Ambach A, Bonnekoh B, Nguyen M, Schön MP, Gollnick H. Imiquimod, a toll-like receptor-7 agonist, induces perforin in cytotoxic T lymphocytes in vitro. Mol Immunol 2004;40:1307–1314.
214. Navi D, Huntley A. Imiquimod 5% cream and the treatment of cutaneous malignancy. Dermatol Online J 2004;10:4-14.
215. Schwarz K, Storni T, Manolova V, Didierlaurent A, Sirard JC, Rothlisberger P. Role of toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. Eur J Immunol 2003;33:1465–1470.
216. Shackleton M, Davis ID, Hopkins W, Jackson H, Dimopoulos N, Tai T. The impact of imiquimod, a toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. Cancer Immun 2004;23:9-19.
217. Sullivan TP, Dearaujo T, Vincek V, Berman B. Evaluation of superficial basal cell carcinomas after treatment with imiquimod 5% cream or vehicle for apoptosis and lymphocyte phenotyping. Dermatol Surg 2003;29:1181–1186.
218. Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. J Exp Med 2007;204:1441–1451.
219. Chen M, Griffith BP, Lucia HL, Hsiung GD. Efficacy of S-26308 against guinea pig cytomegalovirus infection. Antimicrob Agents Chemother 1988;32:678–683.
220. Gerster JF, Lindstrom KJ, Miller RL, Tomai MA, Birmachu W, Bomersine SN. Synthesis and structure-activity-relationships of 1H-imidazo[4,5-c]quinolines that induce interferon production. J Med Chem 2005;48:3481–3491.
221. Harrison CJ, Jenski L, Voychehovski T, Bernstein DI. Modification of immunological responses and clinical disease during topical R-837 treatment of genital HSV-2 infection. Antiviral Res 1988;10:209–224.
222. Gollnick H, Barasso R, Jappe U, Ward K, Eul A, Carey-Yard M. Safety and efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment of penile genital warts in uncircumcised men when applied three times weekly or one per day. Int J STD AIDS 2001;12:22–28.
223. Bath-Hextall F, Bong F, Perkins W, Williams H. Interventions for basal cell carcinoma of the skin: systematic review. Br Med J 2004;329:705.

224. Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. J Am Acad Dermatol 2004;50:722–733.

225. Gollnick H, Barona CG, Frank RG, Ruzicka T, Megahed M, Tebbs V. Recurrence rate of superficial basal cell carcinoma following successful treatment with imiquimod 5% cream: interim 2-year results from an ongoing 5-year follow-up study in Europe. Eur J Dermatol 2005;15:374–381.

226. Schulze HJ, Cribier B, Requena L, Reifenberger J, Ferrandiz C, Garcia Diez A. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. Br J Dermatol 2005;152:939–947.

227. Sterry W, Ruzicka T, Herrera E, Takwale A, Bichel J, Andres K. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma: randomized studies comparing low-frequency dosing with and without occlusion. Br J Dermatol 2002;147:1227–1236.

228. Dendorfer M, Oppel T, Wollenberg A, Prinz JC. Topical treatment with imiquimod may induce regression of facial keratoacanthoma. Eur J Dermatol 2003;13:80–82.

229. Peris K, Micantonio T, Fargnoli MC. Successful treatment of keratoacanthoma and actinic keratoses with imiquimod 5% cream. Eur J Dermatol 2003;13:413–414.

230. Korman N, Moy R, Ling M, Matheson R, Smith S, McKane S. Dosing with 5% imiquimod cream 3 times per week for the treatment of actinic keratosis: results of two phase 3, randomized, double-blind, parallel-group, vehicle-controlled trials. Arch Dermatol 2005;141:467–473.

231. Lebwohl M, Dinehart S, Whiting D, Lee PK, Tawfik N, Jorizzo J. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from two phase III, randomized, double-blind, parallel group, vehicle-controlled trials. J Am Acad Dermatol 2004;50:714–721.

232. Stockfleth E, Meyer T, Benninghoff B, Christophers E. Successful treatment of actinic keratosis with imiquimod cream 5%: a report of six cases. Br J Dermatol 2001;144:1050–1053.

233. Stockfleth E, Meyer T, Benninghoff B, Salasche S, Papadopoulos L, Ulrich C. A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5% imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. Arch Dermatol 2002;138:1498–1502.

234. Szeimies RM, Gerritsen MJ, Gupta G, Ortonne JP, Serresi S, Bichel J. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from a phase III, randomized, double-blind, vehicle-controlled, clinical trial with histology. J Am Acad Dermatol 2004;51:547–555.

235. Patel K, Goodwin R, Chawla M, Laidler P, Price PE, Finlay AY. Imiquimod 5% cream monotherapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Am Acad Dermatol 2006;54:1025–1032.

236. Peris K, Micantonio T, Fargnoli MC, Lozzi GP, Chimenti S. Imiquimod 5% cream in the treatment of Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma. J Am Acad Dermatol 2006;55:324–327.

237. Bong AB, Bonnekoh B, Franke I, Schön MP, Ulrich J, Gollnick H. Imiquimod, a novel immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma. Dermatology 2002;205:135–138.

238. Steinmann A, Funk JO, Schuler G, von den Driesch P. Topical imiquimod treatment of a cutaneous melanoma metastasis. J Am Acad Dermatol 2002;43:555–556.

239. Ugurel S, Wagner A, Pföhler C, Tilgen W, Reinhold U. Topical imiquimod eradicates skin metastases of malignant melanoma but fails to prevent rapid lymphogenous metastatic spread. Br J Dermatol 2002;147:621–624.

240. Zeitouni NC, Dawson K, Cheney RT. Treatment of cutaneous metastatic melanoma with imiquimod 5% cream and the pulsed-dye laser. Br J Dermatol 2005;152:376–377.

241. Chong A, Loo WJ, Banney L, Grant JW, Norris PG. Imiquimod 5% cream in the treatment of mycosis fungoides—a pilot study. J Dermatolog Treat 2004;15:118–119.

242. Deeths MJ, Chapman JT, Dellavalle RP, Zeng C, Aeling JL. Treatment of patch and plaque stage mycosis fungoides with imiquimod 5% cream. J Am Acad Dermatol 2005;52:275–280.

243. Dummer R, Urosevic M, Kempf W, Kazakov D, Burg G. Imiquimod induces complete clearance of a PUVA-resistant plaque in mycosis fungoides. Dermatology 2003b;207:116–118.

244. Suchin KR, Junkins-Hopkins JM, Rook AH. Treatment of stage IA cutaneous T-cell lymphoma with topical application of the immune response modifier imiquimod. Arch Dermatol 2002;138:1137–1139.

245. Schön M, Bong AB, Drewniok C, Herz J, Geilen CC, Reifenberger. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. J Natl Cancer Inst 2002;95:1138–1149.
246. Miller RL, Tomai MA, Harrison CJ, Bernstein DI. Immunomodulation as a treatment strategy for genital herpes: review of the evidence. Int Immunopharmacol 2002;2:443–451.
247. Sauder DN, Smith MH, Senta-McMillian T, Soria I, Meng TC. Randomized, single-blind, placebo-controlled study of topical application of the immune response modulator resiquimod in healthy adults. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3846–3852.
248. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. Blood 1995;85:1341-1347.
249. van Till JW, van Veen SQ, van Ruler O, Lamme B, Gouma DJ, Boermeester MA. The innate immune response to secondary peritonitis. Shock 2007;28:504-517.
250. Ploder M, Pelinka L, Schmuckenschlager C, Wessner B, Ankersmit HJ, Fuerst W, Redl H, Roth E, Spittler A. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production and not monocyte human leukocyte antigen-DR expression is correlated with survival in septic trauma patients. Shock 2006;25:129-134.
251. Alomao R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O. TLR signaling pathway in patients with sepsis. Shock 2008;30:73-77.
252. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. J Clin Invest 1991;88:1747-1754.
253. Escoll P, del Fresno C, Garcia L, Valles G, Lendinez MJ, Arnalich F, Lopez-Collazo E. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. Biochem Biophys Res Commun 2003;311:465-472.
254. Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. Shock 2008;29:315-321.
255. Wiersinga WJ, Van't Veer C, van den Pangaart PS, Dondorp AM, Day NP, Peacock SJ, van der Poll T. Immunosuppression associated with interleukin-1R-associated-

kinase-M upregulation predicts mortality in Gram-negative sepsis (melioidosis). Crit Care Med, 2009;37:569-576.

256. van 't Veer C, van den Pangaart PS, van Zoelen MA, de Kruif M, Birjmohun RS, Stroes ES, de Vos AF, van der Poll T. Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. J Immunol 2007;179:7110-7120.

257. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA.Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat Rev Immunol 2005;5:446-458.

258. Liu ZJ, Yan LN, Li XH, Xu FL, Chen XF, You HB, Gong JP. Up-Regulation of IRAK-M is Essential for Endotoxin Tolerance Induced by a Low Dose of Lipopolysaccharide in Kupffer Cells. J Surg Res 2008;150:34-39.

259. Lin WJ, Yeh WC. Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. Shock 2005;24:206-209.

260. Deng JC, Cheng G, Newstead MW, Zeng X, Kobayashi K, Flavell RA, Standiford TJ. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. J Clin Invest 2006;116:2532-2542.

261. Mytar B, Woloszyn M, Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Ruggiero I, Wieckiewicz J, Zembala M. Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. J Leukoc Biol 2003;74:1094-1101.

262. Xie Q, Gan L, Wang J, Wilson I, Li L. Loss of the innate immunity negative regulator IRAK-M leads to enhanced host immune defense against tumor growth. Mol Immunol 2007;44:3453-3461.

263. del Fresno C, Otero K, Gomez-Garcia L, Gonzalez-Leon MC, Soler-Ranger L, Fuentes-Prior P, Escoll P, Baos R, Caveda L, Garcia F, Arnalich F, Lopez-Collazo E: Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. J Immunol 2005;174:3032-3040.

264. Mantovani A, Marchesi F, Porta C, Sicca A, Allavena P. Inflammation and cancer: breast cancer as a prototype. Breast 2007;2:27-33.

265. Wessells J, Baer M, Young HA, Claudio E, Brown K, Siebenlist V, Johnson PF. BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. J Biol Chem 2004;279:49995-50003.

266. Carmody RJ, Ruan Q, Palmer S, Hilliard B, Chen YH. Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. Science 2007;317:675-678.

267. Grundstrom S, Anderson P, Scheipers P, Sundstedt A, Bcl-3 i NF-κB p50-p50 homodimers act as transcriptional repressors in tolerant CD4+ T cells, The Journal of Biological chemistry 2004;279(9):8460-8468.

268. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. J Exp Med 1992;176(1):287-292.

269. Goerdt S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. Immunity 1999;10(2):137-142.

270. Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, Borgeat P. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B4, prostaglandin E2 and platelet-activating factor biosynthesis. Faseb J 2007;21:1575-1585.

271. Brown JN, Kohler JJ, Coberley CR, Sleasman JW, Goodenow MM. HIV-1 activates macrophages independent of Toll-like receptors. PLoS ONE 2008;3:e3664.

272. Miller RL, Meng TC, Tomai MA. The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists. Drug News Perspect 2008;21:69-87.

273. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 2001;357(9255):539-545.

274. Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van Damme J, Mantovani A. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. J Immunol 2000;15;164(2):762-767.

275. Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. J Immunol 1995;154(7):3383-3390.

276. 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. J Immunol 1999;163(11):6251-6260.

277. Maeda H, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shiraishi A. TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. J Immunol 1995;155(10):4926-4932.

278. Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, Uyemura K. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. J Immunol 1995;155(4):2240-2247.

279. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, Berman T, Joyce JA. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. Genes Dev 2010. (Epub ahead of print).

280. Mancino A, Lawrence T. Nuclear Factor-{kappa}B and Tumor-Associated Macrophages. Clin Cancer Res 2010 (Epub ahead of print).

281. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol 2002;23(11):549-555.

282. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. Cell 2000;27;103(3):481-490.

283. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat Cell Biol 2000;2(10):737-744.

284. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. J Clin Invest 2007;117(5):1155-1166.

285. Kawai T, Akira S: TLR signaling. Cell Death Differ 2006;13:816-825.

286. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. Nat Rev Immunol 2007;7:179-190.

287. Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van Lieshout AW, Sprong T, van den Hoogen FH, van den Berg WB, Radstake TR. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. Arthritis Rheum 2005;52:2313-2322.

288. Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. Nat Immunol 2005;6:769-776.

289. Bekeredjian-Ding I, Roth SI, Gilles S, Giese T, Ablasser A, Hornung V, Endres S, Hartmann G. T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes. J Immunol 2006;176:7438-7446.

290. Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, Trigilio J, Shin HS, Valentine C, Hellman J. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. J Immunol 2007;178:1164-1171.

291. Morris GE, Parker LC, Ward JR, Jones EC, Whyte MK, Brightling CE, Bradding P, Dower SK, Sabroe I. Cooperative molecular and cellular networks regulate Toll-like receptor-dependent inflammatory responses. Faseb J 2006;20:2153-2155.

292. Bergmann M, Gornikiewicz A, Sautner T, Waldmann E, Weber T, Mittlbock M, Roth E, Fugger R. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. Shock 1999;12:421-427.

293. Mantovani G., Maccio A, Pisano M, Versace R, Lai P, Esu S, Massa E, Ghiani M, Dessi D, Melis GB, Del Giacco GS. Tumor-associated lympho-monocytes from neoplastic effusions are immunologically defective in comparison with patient autologous PBMCs but are capable of releasing high amounts of various cytokines. Int J Cancer 1997;71:724-731.

294. Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, Van Damme J, Mantovani A. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-κB activation in tumor-associated macrophages. J Immunol 2000;164:762-767.

295. Elgert K, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. J Leukocyte Biol 1998;64:275-290.

296. Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? Clin Exp Metastasis 2002;19:247-258.

297. Prehm P. Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells: characterization of the synthase. Biochem J 1983;211:181-189.

298. Sicca A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. Eur J Cancer 2006;42:717-727.

299. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. J Pathol 2002;196:254-265.

300. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumour-associated macrophages. Immunol Today 1992;13:265-270.

301. Luo Y, Zhou H, Krueger J, Kaplan C, Lee SH, Dolman C, Markowitz D, Wu W, Liu C, Reisfeld RA, Xiang R. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. J Clin Invest 2006;116(8):2132-2141.

302. Wang RF, Miyahara Y, Wang HY. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. Oncogene 2008;27:181-189.
303. Schön MP, Schön M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. Oncogene 2008;27(2):190-199.
304. Bergmann M, Sautner T. Immunomodulatory effects of vasoactive catecholamines. Wien Klin Wochenschr 2002;114:752-761.
305. Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M: Interleukin-10 production during septicaemia. Lancet 1994;343:707-708.
306. Dahl IM, Turesson I, Holmberg E, Lilja K. Serum hyaluronan in patients with multiple myeloma: correlation with survival and Ig concentration. Blood 1999;93:4144-4148.
307. Delpech B, Chevallier B, Reinhardt N. Serum hyaluronan (hyaluronic acid) in breast cancer patients. Int J Cancer 1990;15(46):388-390.
308. Hautmann SH, Schroeder GL, Civantos F. Hyaluronic acid and hyaluronidase. 2 new bladder carcinoma markers. Urologe A 2001;40:121-126.
309. Hiltunen EL, Anttila M, Kultti A. Elevated hyaluronan concentration without hyaluronidase activation in malignant epithelial ovarian tumors. Cancer Res 2002;62:6410-6413.
310. Knudson W, Biswas C, Li XQ, Nemec RE, Toole BP. The role and regulation of tumor-associated hyaluronan. Ciba Found Symp 1989;143:150-159.
311. Zhang L, Underhill CB, Chen L. Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. Cancer Res.1995;55:428-433.
312. Gajewski TF, Meng Y, Blank C. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. Immunol Rev 2006;213:131–145.
313. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. Nat Rev Cancer 2005;5:263–274.
314. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. Immunol Rev 2006;211:214–224.

10. ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja: 4.12.1977., Zagreb, Hrvatska

Adresa: Katedra za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Akademski stupanj:2002.: doktor medicine

Obrazovanje:
1996.-2002.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2003.- 2006.: Doktorski poslijedipolomski studij u području biomedicine i zdravstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu

Zaposlenja i stručno usavršavanje:
2002.-2003.: liječnički staž u Kliničkom bolničkom centru Zagreb
Od 2003. g. znanstveni novak-asistent pri Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, na projektu prof.dr.sc. Damira Vrbaneca „Karcinom dojke – molekularne i kliničke karakteristike“
2004.-2009.: specijalizacija iz interne medicine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb
2.6.2009.: položen specijalistički ispit iz interne medicine
2007.-2008.: znanstveno-istraživački rad u sklopu projekta „Karcinom dojke – molekularne i kliničke karakteristike“ u Istraživačkom laboratoriju Klinike za kirurgiju Medicinskog fakulteta u Beču

Članstvo:
Od 2003.g.: Hrvatski liječnički zbor
Od 2003.g.: Hrvatsko društvo za internističku onkologiju
Od 2004.g.: European Society for Medical Oncology

Nagrade:
1999.: Dekanova nagrada za uspjeh u studiju

Popis publikacija:

1. Etokebe GE, Knežević J, Petričević B, Pavelić J, Vrbanec D, Dembić Z. Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Encoding Toll-Like Receptor -2, -3, -4, and -9 in Case-Control Study with Breast Cancer. Genet Test Mol Biomarkers 2009;13(6):729-34.
2. Petricevic B, Wessner B, Sachet M, Vrbanec D, Spittler A, Bergmann M. CL097, a TLR7/8 ligand inhibits TLR4-dependent activation of IRAK-M and Bcl-3 expression. Shock 2009;32(5):484-90.
3. Vrbanec D, Petricevic B. Estrogen and progesterone receptor status in primary breast cancer - a study of 11 273 patients from the year 1990 to 2002. Coll Antropol 2007;31(2):535-40.
4. Belev B, Vrbanec D, Kralik M, Pleština S, Petričević B, Sirotković-Skerlev M. Gastrointestinal stromal tumors (GIST) - a paradigm of successful targeted therapy of solid tumors. Acta Med Croatica 2006;60(5):471-5.
5. Vrbanec D, Petričević B, Majerović M, Štern-Padovan R, Belev B, Škegro M, Herceg D, Pleština S, Dedić-Plavetić N, Jakić-Razumović J. Imatinib in gastrointestinal stromal tumor treatment - results from University Hospital Centre Zagreb. Lijec Vjesn 2006;128(5-6):161-6.
6. Vrbanec, D. Petricevic, B. Regression of brain metastases after adding oral cyclophosphamide to therapy in capecitabine pretreated breast cancer. Neurologia Croatica 2006;55:71-8.
7. Ćorušić A, Šprem M, Pavičić-Baldani D, Petričević B, Matković V. Hormone therapy in females and genital carcinoma. Gynaecologia et Perinatologia 2003;12(4):139-47.
8. Radman I, Petricevic B. Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas. Libri Oncol 2006;34(1-3):53-57.
9. Vrbanec D, Petricevic B. Application of molecular targeted therapy in patients with advanced colorectal carcinoma. Libri Oncol 2006;34(1-3):69-74.
10. Vrbanec D, Petričević B. Da li su nam potrebni bolji prognostički čimbenici raka dojke s negativnim limfnim čvorovima za odluku o adjuvantnom liječenju. Bolesti dojke: zbornik radova XV. znanstvenog sastanka "Bolesti dojke"; 2005., Zagreb, str. 159-67.

11. Labar B, Radman I, Kinda Bašić S, Petricevic B. Karcinom dojke – sekundarni zloćudni tumori nakon liječenja Hodgkinove bolesti. Bolesti dojke: zbornik radova XV. znanstvenog sastanka "Bolesti dojke", 2005., Zagreb, str. 113-22.
12. Vrbanec D, Petričević B, Belev B. Prognostički i prediktivni čimbenici i ciljevi za liječenje raka dojke. Bolesti dojke: zbornik radova XVI. znanstvenog sastanka "Bolesti dojke", 2006., Zagreb, str. 73-80.