

Agnieszka Seliga

„Udział kwasu palmitynowego w regulacji wytwarzania czynnika von Willebranda przez ludzkie komórki śródbłonna (HUVEC): rola TLR4 i NF-κB”

Streszczenie

Dysfunkcja śródbłonna jest jednym z początkowych etapów zaburzeń w działaniu układu sercowo-naczyniowego obserwowanym u osób otyłych. Zwiększone stężenie kwasów tłuszczowych towarzyszące otyłości, w tym kwasu palmitynowego (PA) występującego w największej ilości, może przyczyniać się do rozwoju zaburzeń śródbłonkowych. Czynnika von Willebranda (vWF) wytwarzany i wydzielany głównie przez komórki śródbłonna, pełni ważną rolę w regulacji krzepnięcia. Wzrost stężenia vWF w osoczu osób chorych na otyłość może przyczyniać się do zwiększenia ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu PA na wydzielanie vWF przez komórki HUVEC. Doświadczenia prowadzono w łagodnych warunkach stresu wywołanego obecnością kwasu tłuszczowego, to znaczy takich, które były wystarczające do spowodowania wzrostu ilości białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1, co jest znacznikiem odpowiedzi prozapalnej śródbłonna, ale nie obniżających przeżywalności komórek. Komórki inkubowano w obecności PA o stężeniu nieprzekraczającym 200 μM nie dłużej niż 48 h. Takie podejście umożliwia badanie zmian adaptacyjnych odpowiedzi na bodziec. Wykazano, że w łagodnych warunkach, wydzielanie vWF jest zwiększone po inkubacji w obecności PA, co jest skutkiem zwiększonej ekspresji genu *VWF* oraz stymulacji dojrzewania tego białka. Podjęto próby identyfikacji mechanizmów regulacyjnego wpływu PA na dojrzewanie i wydzielanie vWF, ale nie uzyskano rozstrzygających wyników.

Potwierdzono, że PA aktywuje czynnik transkrypcyjny NF-κB, biorący udział w regulacji odpowiedzi zapalnej. Ponadto wykazano, że PA wpływa na zawartość białek receptorowych TLR2, TLR4, TLR6. W celu identyfikacji szlaku sygnałowego aktywowanego przez PA stosowano inhibitory NF-κB oraz TLR2 i TLR4, czyli odpowiednio kardamoninę, C29 i TAK-242. Wykazano, że zwiększona w obecności PA ekspresja genu *VWF* wynika z aktywacji NF-κB. Ponadto potwierdzono udział receptora TLR4 w aktywowanej przez PA odpowiedzi komórek śródbłonna.

W obecności inhibitora TLR4 i PA, który jest jego ligandem, wykazano zwiększenie ekspresji genów *CD36*, *TIRAP*, *TLR6*, kodujących białka uczestniczące w przekazywaniu sygnału pochodzącego od receptorów TLR.

W obecności inhibitora TLR2 obserwowano zwiększenie aktywności TLR4. Co więcej, wyciszenie ekspresji genu *TLR2* spowodowało zwiększenie ilości białka TLR4. Z kolei wyciszenie ekspresji genu *TLR4* spowodowało zwiększenie ilości białka TLR2, co zaobserwowano nawet wtedy, gdy na skutek wyciszenia obniżeniu ulegał jedynie poziom transkryptu *TLR4*.

Podsumowując, wykazano, że PA reguluje w komórkach śródbłonna wydzielanie vWF poprzez zwiększoną ekspresję genu *VWF* oraz nasilone dojrzewanie tego białka. Zidentyfikowano udział receptora TLR4 oraz NF- κ B w odpowiedzi komórek na PA. Ponadto wykazano, że pomiędzy receptorami TLR2 i TLR4 występuje efekt kompensacyjny, obserwowany na poziomie zarówno aktywności receptorów, jak i mRNA oraz białka.

Uzyskane wyniki sugerują, że już stosunkowo niewielki wzrost stężenia kwasów tłuszczowych do poziomu, który aktywuje odpowiedź prozapalną, może być wystarczający do zwiększenia stężenia vWF pozakomórkowego, co potencjalnie powoduje zaburzenia krzepliwości krwi. Udział PA w regulacji wydzielania vWF częściowo tłumaczy zwiększenie stężenia vWF obserwowane w osoczu osób otyłych.

Abstract

Endothelial dysfunction is the earliest symptom of the cardiovascular system dysfunction observed in obesity. Increased concentration of fatty acids associated with obesity, including the most abundant palmitic acid (PA), may contribute to the development of endothelial dysfunction.

von Willebrand factor (vWF), produced and secreted mainly by endothelial cells, plays an important role in the regulation of coagulation. Increased vWF concentration in the plasma of obese patients is associated with an increased risk of developing cardiovascular diseases caused by increased thrombosis.

The aim of this thesis was to investigate the effect of PA on the vWF secretion by HUVEC cells. The experiments were carried out under mild fatty acid stress conditions that were sufficient to increase the amount of ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules, which is a marker of the pro-inflammatory response of the endothelium, without affecting cell survival. The cells were incubated in the presence of PA at a concentration not exceeding 200 μ M for no longer than 48 h. This approach enables the study of adaptive changes in response to a stimulus. It has been shown that under relatively mild conditions vWF secretion is increased after incubation in the presence of PA, as a result of the increased *VWF* gene expression and stimulated maturation of this protein. Attempts have been made to identify the mechanisms of PA's regulatory influence on vWF maturation and secretion, but no conclusive results have been obtained.

The results presented in this study confirmed that PA activates NF- κ B, a transcription factor involved in the regulation of the inflammatory response. Moreover, it has been shown that PA affects the content of TLR2, TLR4 and TLR6 receptor proteins. To identify the signaling pathway activated by PA, inhibitors of NF- κ B and TLR2 and TLR4 receptors were used, that is cardamonin, C29 and TAK-242, respectively. It has been shown that *VWF* gene expression increased by PA is the result of NF- κ B activation. Moreover, the involvement of the TLR4 receptor in the PA-activated endothelial cells response was confirmed.

Additionally, in the presence of a TLR4 inhibitor and PA, which is its ligand, the expression of *CD36*, *TIRAP*, *TLR6* genes, encoding proteins involved in TLR receptor signal transduction, was increased.

In the presence of a TLR2 inhibitor, TLR4 activity was increased. Moreover, *TLR2* gene silencing increased TLR4 protein level. *TLR4* gene silencing increased TLR2 level, which was observed even when only mRNA level of *TLR4* was decreased. This suggests a compensatory effect between TLR2 and TLR4 receptors.

To conclude, this thesis shows that PA regulates the vWF secretion from endothelial cells by increased expression of the *VWF* gene and maturation of this protein. The involvement of the TLR4 receptor and the NF- κ B signaling pathway in the cell response to PA was identified. Moreover, it has been shown that there is a compensatory effect between TLR2 and TLR4 receptors, observed at the receptor activity as well as mRNA and protein level.

The obtained results suggest that a relatively small increase in the concentration of fatty acids to a level that activates the pro-inflammatory response may be sufficient to increase concentration of the extracellular vWF, potentially resulting in thrombotic complications. The involvement of PA in the regulation of the vWF secretion partially explains the increased vWF concentration observed in the plasma of obese patients.