

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

Łukasz Pijanowski, Joanna Homa, Magdalena Chadzińska

Zakład Immunologii Ewolucyjnej Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytet Jagielloński Gronostajowa 9, 30-387 Kraków E-mail: magdalena.chadzinska@uj.edu.pl

SIECI ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE – POWSZECHNY W ŚWIECIE ZWIERZĄT (I ROŚLIN?) MECHANIZM UNIESZKODLIWIANIA PATOGENÓW*

ZEWNATRZKOMÓRKOWE SIECI WYRZUČANE PRZEZ LEUKOCYTY SSAKÓW

Zewnątrzkomórkowe sieci (ang. extracellular traps, ET) stanowią stosunkowo niedawno zidentyfikowany mechanizm odpowiedzi wrodzonej, który umożliwia unieruchomienie, zahamowanie wzrostu, a być może także zabicie niebezpiecznych mikroorganizmów. ET zwiększają efektywność rozkładu czynników wirulencji i/lub zabijania bakterii. Odbywa się to dzięki wysokiemu miejscowemu stężeniu substancji przeciwbakteryjnych zlokalizowanych na tych strukturach.

Chociaż ET mogą być wytwarzane przez różne typy leukocytów, np. makrofagi (np. AULIK i współaut. 2012, HELLENBRAND i współaut. 2013, BOE i współaut. 2015), monocyty (np. MUÑOZ-CARO i współaut. 2014, REICHEL i współaut. 2015), komórki tuczne (np. von Kockritz-Blickwede i współaut. 2008, LIN i współaut. 2011), eozynofile (np. YOUSEFI i współaut. 2008, DWORSKI i współaut. 2011, MUÑOZ-CARO i współaut. 2015) oraz bazofile (MORSHED i współaut. 2014), to obecnie najwięcej wiemy na temat tych struktur wytwarzanych przez zaktywowane neutrofile. Sieci te, określane skrótem NET (ang. neutrophil extracellular traps), po raz pierwszy zostały zaobserwowane w 2004 r. przez naukowców z zespołu Arturo Zychlinsky'ego, pracujących w Instytucie Maxa Plancka w Berlinie (BRINKMANN i współaut. 2004). Stwierdzili oni, że neutrofile człowieka pod wpływem stymulacji, np. interleukiną 8 (IL-8/CXCL8) czy lipopolisacharydem

bakterii Gram-ujemnych (LPS), wytwarzają charakterystyczne zewnątrzkomórkowe sieci. Ich szkielet stanowią włókna chromatyny o średnicy 15-17 nm, składające się z ułożonych równolegle cieńszych włókien, których średnica nie przekracza 2 nm (OBERMAYER i współaut. 2014). Dodatkowo, nici DNA zawierają kuliste domeny białkowe o średnicy ok. 10 nm, które tworzą większe agregaty osiągające 50 nm średnicy, zawierające histony i białka ziarnistości, takie jak: elastaza neutrofilowa (NE), defensyny czy mielo-peroksydaza (MPO) (BRINKMANN i współaut. 2004, OBERMAYER i współaut. 2014). Poszczególne nici łącząc się, prowadzą do powstania złożonych struktur trójwymiarowych o średnicy dochodzącej do 100 nm, trudnych do odróżnienia od sieci fibrynowych (KRAUTGARTNER i współaut. 2010). Jednak analiza przekrojów NET z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego potwierdziła, że włókna DNA nie są otoczone przez błony (BRINKMANN i współaut. 2004). NET przyjmują różne formy morfologiczne, mogą mieć postać skoncentrowaną (zbitą) (ang. aggregated, aggET) lub sa one bardziej rozłożyste (ang. spread, sprET; ang. diffused, diffET). Różnice w wyglądzie tych struktur wynikają prawdopodobnie z zaangażowania w proces ich tworzenia różnych szlaków molekularnych, aktywowanych w zależności od rodzaju czynnika stymulującego (SCHAUER i współaut. 2014, SILVA i współaut. 2016).

Najnowsze badania wskazują, że DNA, będący jednym z głównych składników NET, posiada silne właściwości przeciwbakteryjne.

*Praca finansowana ze źródeł Narodowego Centrum Nauki (grant nr 2013/09/N/NZ6/00649).

Słowa kluczowe: DNA, ET, histony, leukocyty, zewnątrzkomórkowe sieci

Z drugiej jednak strony, może on stanowić sygnał ostrzegawczy dla bakterii, np. *Pseu-domonas aeruginosa*, prowadzący do modyfikacji ich powierzchni, co w efekcie zabezpiecza te patogeny przed działaniem NET (HA-LVERSON i współaut. 2015).

Należy zaznaczyć, że poza jądrowym DNA, szkielet NET może także stanowić DNA pochodzący z mitochondriów (mtDNA). W tym przypadku, ze względu na odmienne źródło kwasu nukleinowego, powstałe sieci różnią się nieco strukturą od klasycznych NET (YOUSEFI i współaut. 2009) i nie zawierają niektórych komponentów jądrowych, takich jak: laminy typu B, histony czy polimeraza poli(ADP-rybozy) oraz markerów błonowych, np. CD15 i 16, β -aktyny, cytochromu c oraz kaspazy 3. Różnice te wskazują na odmienny rodzaj oddziaływań gospodarz-NET w przypadku, gdy źródłem DNA są mitochondria. Cechą wspólną NET zawierających DNA jądrowy lub mitochondrialny jest obecność NE i MPO. Trzeba jednak mieć świadomość, że neutrofile mają bardzo mało mitochondriów i dlatego też ilość NET, których szkielet stanowi mtDNA, jest 100 000 razy mniejsza niż tych, których elementem szkieletu jest DNA pochodzący z jądra komórkowego (BRINKMANN i ZYCHLINSKY 2012).

Niezwykle ważnym składnikiem NET są białka histonowe (H1, H2A, H2B, H3 i H4), stanowiące ok. 70% wszystkich elementów budujących sieci (URBAN i współaut. 2009). Co ciekawe, białka te cechują się mniejszą o 2-5 kDa masą molową, w stosunku do histonów obecnych w jądrze komórkowym. Okazuje się, że białka histonowe w obrębie NET występują w enzymatycznie zmienionej formie, a konkretnie dochodzi do ich cytrulinacji (URBAN i współaut. 2009). Wiadomo, że proces ten jest konieczny do dekondensacji DNA i wytworzenia NET (WANG i współaut. 2004, Li i współaut. 2010). Jednym z najważniejszych mechanizmów zapewniają-cych stabilność chromatyny jądrowej jest obecność metylowanej formy Lys 9 w histonie H3 (VERSCHURE i współaut. 2005, LESH-NER i współaut. 2012). Aktywacja enzymu PAD4 (ang. peptidylarginine deiminase 4) prowadzi do deiminacji (cytrulinacji) kilku arginin w pobliżu Lys 9, co skutkuje modyfikacją przestrzenną w miejscu wiążącym białko HP1 β (ang. heterochromatin protein 1 beta), które oddysocjowuje od Lys 9, prowadząc do niepełnej metylacji i dekondensacji chromatyny. Ważną rolę w tych procesach odgrywa elastaza neutrofilowa, która odpowiada za enzymatyczne cięcie histonu H3, w efekcie czego białko to ma niższą masę cząsteczkową. W histonie H3 dochodzi też do dodatkowych modyfikacji, które z kolei zwiększają jego masę cząsteczkową. Cytru-

linacja może też prowadzić do niezależnych od NE zmian w obrębie histonu H3, które występują wyłącznie w połączeniu z innymi modyfikacjami, gdyż deiminacja zwiększa mobilność tych białek. Wydaje się, że posttranslacyjne modyfikacje histonów mogą regulować wytwarzanie struktur NET poprzez zmianę zdolności NE do obróbki enzymatycznej histonów (PAPAYANNOPOULOS i współaut. 2010).

Jak wspomniano wcześniej, w obrębie włókien DNA tworzących sieci NET zlokalizowane są domeny zawierające białka ziarnistości. Obecne są tutaj składniki: (i) ziarnistości azurofilnych, np. NE, MPO, katepsyna G, czynnik bakteriobójczy zwiększający przepuszczalność (ang. bactericidal permeability--increasing protein, BPI), defensyny, (ii) ziarnistości specyficznych (laktoferyna, lizozym, katelicydyny, kolagenaza, alkaliczna fosfataza), (iii) ziarnistości trzeciorzędowych (żelatynaza B/MMP-9, ang. matrix metalloproteinase 9, białka rozpoznające peptydoglikan, PGRP) oraz (iv) peroksysomów (katalaza) (BRINKMANN i współaut. 2004, CHO i współaut. 2005, WARTHA i współaut. 2007, URBAN i współaut. 2009). W mniejszych ilościach w NET występują białka cytoplazmatyczne, jak chociażby kalprotektyna (URBAN i współaut. 2009). Poszczególne składniki agregatów białkowych charakteryzują się aktywnością przeciwbakteryjną, jednakże różnią się sposobem działania. Występująca w największym stężeniu NE (prawie 6% wszystkich białek NET) (URBAN i współaut. 2009), podobnie jak inne proteazy serynowe (np. katepsyna G, proteinaza 3), odpowiada za rozkład czynników wirulencji oraz degradację mikroorganizmów (BELAAOUAJ 2002, PAPAY-ANNOPOULOS i współaut. 2010, O'DONOGHUE i współaut. 2013). Analogiczny efekt wywiera MPO, która dodatkowo umożliwia syntezę kwasu podchlorawego, wyróżniającego się silnymi właściwościami bakteriobójczymi, choć otwartym pozostaje pytanie, czy jest też aktywny pozakomórkowo. Kalprotektyna, kalgranulina i laktoferyna mają natomiast zdolność do wiązania ze środowiska jonów, np. żelaza, które są niezbędne do rozwoju bakterii (URBAN i współaut. 2009, BIANCHI i współaut. 2011). Z kolei działanie katelicydyny LL-37, BPI, defensyn oraz histonów polega na zaburzeniu ciągłości błon komórkowych mikroorganizmów (CHO i współaut. 2009, MÉNDEZ-SAMPERIO 2010). Przeciwbakteryjna aktywność histonów związana jest m.in. z ich zdolnością do wiązania LPS, a co za tym idzie, do hamowania aktywności tej endotoksyny. Odbywa się to poprzez blokowanie zarówno części rdzeniowej, jak i lipidu A lipopolisacharydu (AUGUSTO i współaut 2003). Histony mogą też wiązać białka

wirusowe, takie jak np. glikoproteina gp120 otoczki wirusa HIV (ang. human immunodeficiency virus) (MAMIKONYAN i współaut 2008). Z kolei u suma zidentyfikowano białko podobne do histonu łącznikowego H1, które rozpoznaje bakteryjny DNA, oligodeoksynukleotydy i motywy poliguanozowe oraz odznacza się właściwościami bakteriobójczymi (CONNOR i współaut 2009). Być może histony pełnią funkcje przypominające działanie receptorów PRR (ang. pattern recognition receptors). Ciekawe zjawisko związane z przeciwbakteryjnym działaniem histonów zaobserwowano również u muszki owocowej. Stwierdzono mianowicie, że histony mają zdolność przyłączania się do kropli lipidowych obecnych w cytoplazmie komórek, a pod wpływem stymulacji/zakażenia dochodzi do uwolnienia takich kropli. Okazuje się, że osobniki Drosophila melanogaster pozbawione histonów są bardziej podatne na infekcje bakteryjne niż takie, u których krople lipidowe są połączone z tymi białkami (ANAND i współaut 2012).

Przedstawione różne strategie tu, działania poszczególnych składników czynią NET bardzo efektywnym mechanizmem, który zapewnia skuteczną odpowiedź przeciwko wiekszości niebezpiecznych mikroorganizmów. Poczatkowo wykazano, że struktury te umożliwiają eliminację bakterii Escherichia coli, Shigella flexneri, Salmonella typhimurium oraz Staphylococus aureus (BRINKMANN i współaut. 2004, GRINBERG i współaut. 2008). Wyniki badań sugerują, że NET degradują czynniki wirulencji oraz zabijają patogeny zanim zostaną one pochłonięte i zfagocytowane przez inne neutrofile. Dalsze analizy pozwoliły stwierdzić, że wydzielane przez neutrofile sieci stanowią istotny element odpowiedzi przeciwwirusowej i przeciwpasożytniczej (DRESCHER i BAI 2013, HERMOSILLA i współaut. 2014). Na przykład SAITOH i współaut. (2012) udowodnili, że NET tworzą się pod wpływem ludzkiego wirusa niedoboru odporności 1 (ang. human immunodeficiency virus 1, HIV-1). W procesie tym prawdopodobnie uczestniczą receptory endosomalne TLR7 i TLR8 (ang. Toll--like receptors), które rozpoznają wirusowy RNA. Okazało się, że w warunkach in vitro wiriony HIV-1 przyłączają się do NET i są inaktywowane, a zastosowanie DNazy hamuje ten proces oraz powoduje rozkład powstałych sieci.

Produkcja sieci jest niezmiernie ważna w odniesieniu do kontroli właściwego i efektywnego przebiegu reakcji odpornościowej. Prawdopodobnie NET umożliwiają neutrofilom unieszkodliwienie patogenów oraz zabicie unieruchomionych bakterii. Ponadto, powstałe sieci regulują sam napływ neutrofili zarówno w sposób bezpośredni, poprzez podwyższenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych takich jak MAC-1 (ang. macrophage-1 antigen), jak i pośrednio, przy udziale chemokiny CXCL2/MIP-2 [ang. (C-X-C motif) ligand 2/macrophage inflammatory protein 2]. Pod wpływem NET dochodzi także do zwiększenia syntezy czynników zapalnych przez neutrofile, np. IL-6 (interleukina 6) czy reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) (MERZA i współaut. 2015), a także do spotęgowania odpowiedzi zapalnej poprzez aktywację inflamasomu (KAHLENBERG i współaut. 2013). Struktury te wywierają niewątpliwie korzystny efekt w walce z różnymi patogenami, co potwierdzają liczne ba-dania kliniczne. NET funkcjonują jako czynniki o silnej aktywności przeciwbakteryjnej, a dodatkowo, umożliwiają napływ większej liczby neutrofili do ogniska zapalenia. Trzeba jednak pamiętać, że liczne badania wskazują także na negatywne oddziaływania NET. Stwierdzono, że nadmierna produkcja tych struktur oraz brak wystarczającej ilości czy efektywności działania DNaz, które byłyby w stanie rozłożyć powstałe sieci, mogą prowadzić do rozwoju lub zaostrzenia przebiegu wielu chorób zapalnych i autoimmunologicznych. Wynika to z faktu, że mimo przeprowadzanego przez DNazy rozkładu szkieletu sieci, nie dochodzi do zahamowania działania przyłączonych do NET, białek (np. NE) (SAFFARZADEH i PREISSNER 2013, KOŁACZ-KOWSKA i współaut. 2015, NEL i współaut. 2016). Więcej na temat negatywnego oblicza NET można przeczytać w pracy SANTOCKIEGO i współaut., zamieszczonej w tym zeszycie KOSMOSU.

CZYNNIKI REGULUJĄCE POWSTAWANIE ET

Powstające podczas wybuchu tlenowego ROS są ważnym czynnikiem regulującym produkcję NET. Okazało się bowiem, że zahamowanie aktywności oksydazy NADPH (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase), a co za tym idzie, zaburzenie równowagi pomiędzy procesami utleniania i redukcji, obniża zdolność neutrofili do wydzielania tych struktur po stymulacji estrem forbolu (PMA) oraz zymosanem w warunkach in vitro (FUCHS i współaut. 2007, PIJANOWSKI i współaut. 2013). Z drugiej jednak strony odnotowano, że produkcja ROS przez mitochondria, przy braku funkcjonalnej oksydazy NADPH, jest wystarczająca do tego, aby doszło do pojawienia się NET (Do-UDA i współaut. 2015). Uważa się, iż ROS przyczyniają się w sposób bezpośredni do obserwowanych w trakcie wytwarzania NET zmian morfologicznych w obrębie neutrofi706

li, poprzez uszkodzenie błony komórkowej w przypadku, gdy powstawanie NET łączy się ze śmiercią neutrofili (tzw. NETozą) (PA-PAYANNOPOULOS i współaut. 2010). Powstałe ROS wpływają również w sposób bezpośredni lub pośredni (poprzez aktywację NF-kB, ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) na kaspazy, prowadząc do ich inaktywacji (FADEEL i współaut. 1998, HAMPTON i współaut. 2002, SADIKOT i współaut. 2004, WILKIE i współaut. 2007), a jednocześnie mogą nasilać zdolność komórek do autofagii (REMIJSEN i współaut. 2011a). Dzięki temu komórki zawracają z drogi apoptotycznej śmierci komórkowej. Niektóre badania wskazują, że w procesie wytwarzania zewnątrzkomórkowych sieci ROS inicjują zdarzenia prowadzące do dekondensacji chromatyny. Mianowicie, według jednej z grup badawczych, czynniki te przekazują wewnątrzkomórkowy sygnał, który prowadzi do uwolnienia NE z ziarnistości azurofilnych do cytoplazmy (Papayannopoulos i współaut. 2010). NE ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie degraduje histony, na skutek czego dochodzi do dekondensacji DNA. W dalszym etapie MPO opuszcza ziarnistości i wnika do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z chromatyną, działając synergistycznie z NE i stabilizując DNA, aby nie doszło do ponownej jego kondensacji (PAPAYANNOPOULOS i współaut. 2010). O znaczeniu MPO w produkcji NET świadczyć może fakt, że w warunkach in vitro neutrofile pozbawione tego białka nie są zdolne do tworzenia sieci po stymulacji PMA i C. albicans (METZLER i współaut. 2011).

Pomimo przedstawionych powyżej przykładów sądzi się obecnie, że ROS nie zawsze są niezbędne do tego, aby doszło do pojawienia się NET. Potwierdzeniem tego faktu jest bardzo szybkie uwalnianie sieci przez neutrofile pod wpływem bakterii Staphylococcus aureus, przebiegające bez udziału utleniaczy. Poza tym, zdolność do wytwarzania tych struktur w sposób niezależny od ROS wykazują neutrofile stymulowane jonomycyną (PARKER i współaut. 2012, NE-ELI i współaut. 2008). Warto tu wspomnieć, że większość badań wskazujących ROS jako niezbędny czynnik inicjujący tworzenie NET, została przeprowadzona in vitro, przy użyciu wyizolowanych neutrofili i niefizjologicznych stymulantów, np. PMA. Natomiast badania in vivo wskazują, że NET powstają niezależnie od obecności ROS/aktywności oksydazy NADPH. Przykładowo, podczas wywołanej gronkowcem złocistym sepsy nie stwierdzono różnic w tworzeniu NET pomiędzy myszami dzikimi (WT) a tymi, które nie posiadały funkcjonalnej oksydazy NADPH (KOŁACZKOW-SKA i współaut. 2015).

Przypuszcza się, że ważną funkcję w formowaniu ET na drodze niezależnej od ROS odgrywa czynnik NF-ĸB (ARAI i współaut. 2014). Sądzi się zatem, że to rodzaj patogenu determinuje, czy ROS są konieczne do wytwarzania NET (PARKER i współaut. 2012).

W przypadku niektórych stymulantów, istotne znaczenie dla procesu formowania i wyrzutu NET ma szlak sygnałowy Raf-MEK--ERK, który umożliwia produkcję NET poprzez aktywację oksydazy NADPH i regulację ekspresji białek anty-apoptotycznych Mcl-1 (ang. myeloid cell leukemia 1). Może to prowadzić do zahamowania apoptozy oraz skierowania komórki na produkcję zewnątrzkomórkowych sieci (HAKKIM i współaut. 2011). Stymulacia komórek unieruchomionymi kompleksami immunologicznymi (ang. immobilized immune complexes, iICs) potwierdziła udział w tym procesie receptorów powierzchniowych neutrofili FcyIIIB (ang. Fc gamma receptor type IIIb). W tym wypadku związanie receptora z przeciwciałami powodowało wytwarzanie sieci (ALEMAN i współaut. 2016). W mechanizmie tym duże znaczenie mogą mieć elementy cytoszkieletu, które prawdopodobnie umożliwiają przeniesienie sygnału z powierzchni komórki do jądra. Świadczy o tym fakt, że zahamowanie szlaku powierzchniowego receptora integrynowego Mac1-cytohesin1 uniemożliwia aktywację PAD4 oraz wytworzenie NET (NEELI i współaut. 2009). Innymi czynnikami zaangażowanymi w powstawanie NET są Mac-1 oraz kinazy: Syk (ang. spleen tyrosine kinase), PI3K/Akt (ang. phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B) i p38 MAPK (ang. mitogen-activated protein kinase) (BEHNEN i współaut. 2014).

Najnowsze badania wskazują, że także kinazy białkowe C (ang. protein kinases C, PKC) mogą być zaangażowane w regulację pojawiania się sieci. W tym miejscu warto wspomnieć, że rodzina PKC zawiera przynajmniej dwie izoformy tego enzymu (PKCa i PKC(), które mają istotne znaczenie w regulacji cytrulinacji (deiminacji) histonów. Proces ten pełni bardzo ważną funkcję podczas tworzenia NET, co związane jest z redukcją dodatniego ładunku tych białek. Powoduje to osłabienie wiązania histonów do DNA i w efekcie rozluźnienie/dekondensację zwartej struktury chromatyny jądrowej, która dzięki temu może tworzyć NET (LI i współaut. 2010, WANG i współaut. 2009). PKCa hamuje deiminację histonów, podczas gdy PKCζ wywiera przeciwstawne działanie prowadząc do aktywacji czynnika PAD4 (NEELI i RADIC 2013). Dodatkowo ważne zadanie podczas produkcji NET pełni izoforma PKCB. Zastosowanie specyficznego inhibitora tego czynnika skutkuje obniżeniem aktywności związanej z wybuchem tlenowym i produkcją NET (GRAY i współaut. 2013).

W kontekście wydzielania struktur NET należy pamiętać o zjawisku autofagii. Badania, w których wykorzystano inhibitor tego procesu, wortmaninę, sugerują, że, przynajmniej w przypadku wyizolowanych neutrofili człowieka, produkcja NET może być zależna od autofagii. Zastosowany inhibitor nie miał wprawdzie wpływu na aktywność oksydazy NADPH i produkcję ROS w neutrofilach stymulowanych PMA, ale zahamował intensywną wakuolizację badanych komórek i dekondensację chromatyny (REMIJSEN i współaut. 2011b, BRANZK i PAPAYANNOPOULOS 2013). Interpretując te wyniki pamiętać jednak trzeba, że wortmanina jest także inhibitorem kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) zaangażowanej w inne procesy komórkowe, np. wzrost komórki, jej proliferację, różnicowanie czy prze-mieszczanie się (HAZEKI i współaut. 1996, DE CICCO i współaut. 2015).

Dodatkowe dowody na zaangażowanie autofagii w tworzenie NET przyniosły prace Itakura i McCarty (2013) oraz Remijsen i współaut. (2011b). Pokazali oni, że indukcja autofagii u pacjentów pozbawionych oksydazy NADPH nie jest wystarczająca do tego, żeby doszło do dekondensacji chromatyny i produkcji NET, dlatego też wydaje się, że oba te procesy są istotne dla wytwarzania sieci. Wykazano też, że zahamowanie autofagii zakłóca dekondensację chromatyny, ale nie cały proces śmierci neutrofili, gdyż w takich warunkach komórki wchodzą na drogę apoptozy. Jednym z najważniejszych regulatorów autofagii w wielu komórkach, w tym w neutrofilach, jest kinaza mTOR (ang. mammalian target of rapamycin) (REMIJSEN i współaut. 2011a, ITAKURA i MCCARTY 2013). Zahamowanie jej aktywności przy użyciu rapamycyny zwiększa intensywność autofagii oraz przyspiesza produkcję NET po stymulacji formylowanymi peptydami bakteryjnymi (ang. formyl-Met-Leu-Phe, fMLP). Wynika to z szybszego wytwarzania autofagosomów (ITAKU-RA i MCCARTY 2013). Natomiast MCINTURFF i współaut. (2012) wykazali, że mTOR reguluje tworzenie sieci poprzez posttranskrypcyjną kontrolę ekspresji czynnika HIF-1a (ang. hypoxia-inducible factor 1a), będącego ważnym modulatorem odpowiedzi przeciwbakteryjnej. Brak tego czynnika, jak również zahamowanie kinazy mTOR obniża zdolność ludzkich neutrofili do wydzielania NET i zewnątrzkomórkowego zabijania bakterii.

ET U INNYCH KRĘGOWCÓW

Sieci zewnątrzkomórkowe mogą być produkowane nie tylko przez komórki ssaków,

ale także przez leukocyty innych kręgowców. Badania przeprowadzone na komórkach kurcząt potwierdziły zdolność heterofili, będących odpowiednikami neutrofili ssaków, do wytwarzania tzw. struktur HET (ang. heterophil extracellular traps) po stymulacji PMA i H_2O_2 . Sugeruje to, iż w mechanizm związany z powstawaniem HET zaangażowane są produkty metabolizmu tlenowego, podobnie jak to może mieć miejsce w przypadku NET ssaków (CHUAMMITRI i współaut. 2009). Należy jednak zaznaczyć, że w odniesieniu do heterofili, PMA w mniejszym stopniu pobudza wybuch tlenowy niż u ssaków (HE i współaut. 2003). Co ciekawe, komórki te wydzielają sieci pomimo braku MPO. Być może funkcje tego enzymu pełnią inne białka występujące licznie w ziarnistościach heterofili. Na skutek braku MPO w heterofilach nie dochodzi do reakcji z udziałem nadtlenku wodoru i utleniania halogenków (GIAMBELLUCA i GENDE 2008), co może prowadzić do nagromadzenia się $\rm H_2O_2$ i za-inicjowania tworzenia HET. O istotnej roli nadtlenku wodoru w tym procesie świadczy wyraźny wzrost produkcji sieci w odpowiedzi na H₂O₂, intensywniejszy nawet niż po stymulacji PMA (CHUAMMITRI i współaut. 2009). HET przypominają swoją budową sieci ET wytwarzane przez leukocyty ssaków. Podobnie jak NET zawierają one kompleksy DNA--histony oraz elastazę (CHUAMMITRI i współaut. 2009).

Struktury ET stwierdzono też w obrębie tchawicy kurcząt zakażonych wirusem zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy (ang. infectious laryngotracheitis virus, ILTV) (REDDY i współaut. 2017). Przypadłość ta cechuje się występowaniem w tchawicy charakterystycznych struktur (ang. trachea-mucoid plugs/ casts), które, jak się powszechnie uważa, są efektem nadmiernego wydzielania śluzu (BA-GUST i współaut. 2000, GARCIA i współaut. 2013). Okazuje się jednak, że główne mucyny układu oddechowego, jakimi są MU-C5AC i MUC5B, występują bardzo nielicznie w błonie śluzowej krtani, tchawicy, oskrzeli oraz w obrębie tych struktur u zainfekowanych ptaków. Zaobserwowano natomiast, że struktury te zawierają włókniste sieci o właściwościach lepko-sprężystych utworzone z DNA, przypominające HET (REDDY i współaut. 2017). Były one obecne w przypadku 10% komórek na obszarze wspomnianych struktur tchawicy.

Podczas ostrego zakażenia wirusem ILTV sieci HET wydzielane są przez różne typy komórek, zarówno przez heterofile, jak i inne komórki, np. nabłonek błony śluzowej dróg oddechowych (REDDY i współaut. 2017, BAGUST i współaut. 2000). HET pozwalają na kontrolę replikacji wirusa ILTV i jego eliminację w błonie śluzowej dróg oddechowych. Poza tym, umożliwiają usuwanie szczątków komórkowych, białek, lipidów, kationów oraz innych składników niebędących mucynami, których obecność może być następstwem krwotoków i martwicy śluzówki towarzyszących ostremu zakażeniu wirusem ILTV. HET wywierają także działanie niepożądane. W tchawicy zainfekowanych zwierząt sieci HET wraz z przyczepionymi do nich cząsteczkami tworzą charakterystyczne struktury o żelowej konsystencji, które zaburzają normalne oddychanie kurcząt i prowadzą do spowodowanej niedoborem tlenu zamartwicy, czyli asfiksji (REDDY i współaut. 2017, GARCIA i współaut. 2013). Być może pomocne w złagodzeniu objawów występujących podczas zakażenia wirusem ILTV byłoby podanie chorym zwierzętom aerozolowanej DNazy I. Takie podejście zastosowano w przypadku pacjentów cierpiących na mukowiscydozę, których plwociny i śluz zawierały podobne, włókniste struktury zbudowane z DNA. Zastosowanie w leczeniu tych pacjentów DNazy I przyniosło pozytywny skutek (ROGERS 2007). Enzym ten był też pomocny w leczeniu chorych po ukąszeniu węża efy piaskowej (Echis carinatus). Interesujące jest to, że jad tego węża indukuje powstawanie NET. Powstałe sieci blokują naczynia krwionośne zabezpieczając przed dostaniem się jadu do krążenia. W efekcie dochodzi do nagromadzenia toksyn jadu w miejscu wstrzyknięcia, a następnie do uszkodzenia tkanek. NET są stabilne dzięki temu, że jad nie zawiera DNaz, natomiast te, które są obecne w surowicy nie są w stanie zdegradować tak dużej ilości zgromadzonych sieci. Wykazano, że zastosowanie DNazy I poprawiło stan zniszczonych pod wpływem jadu tkanek (KATKAR i współaut. 2016).

W dostępnej literaturze nie ma prac potwierdzających wytwarzanie ET przez leukocyty gadów i płazów. Biorąc pod uwagę rozpowszechnienie tego typu sposobu walki z patogenami w świecie zwierząt, wydaje się mało prawdopodobne, aby akurat leukocyty tych zwierząt nie miały takiej zdolności. W przypadku kręgowców zmiennocieplnych występowanie ET potwierdzono u ryb: danio pręgowanego (Danio rerio) (PALIĆ i współaut. 2007a), strzebli grubogłowej (Pimephales promelas) (PALIĆ i współaut. 2007b), karpia (Cyprinus carpio L.) (BROGDEN i współaut. 2014; PIJANOWSKI i współaut. 2013, 2015a, b) oraz turbota (Scophthalmus maximus) (CHI i SUN 2016). U danio i strzebli grubogłowej NET powstają po pobudzeniu neutrofili jonoforem wapnia, PMA, a w przypadku strzebli również pod wpływem LPS (PALIĆ i współaut. 2007a, b). Tak jak u innych zwierząt, mają one postać sieci otaczających pojedyncze komórki lub łączących kilka komórek. Struktury te utworzone są przez włókna DNA, z którymi połączone są białkowe składniki pochodzące wyłącznie z ziarnistości neutrofili, takie jak MPO czy NE. W odróżnieniu od ssaków, brak wśród tych białek elementów cytoszkieletu. Wykazano, że już po 10 min stymulacji jonoforem wapnia dochodzi do produkcji NET, a u danio dodatkowo do degranulacji prowadzącej do zwiększonego uwalniania MPO z ziarnistości. Wydaje się jednak, że obydwa procesy (produkcja NET i degranulacja ziarnistości) są niezależne od siebie. Ponadto potwierdzono, że niezbędne do wytwarzania NET są jony Ca2+, natomiast stres jest czynnikiem, który hamuje zdolność neutrofili tych ryb do produkcji sieci (PALIĆ i współaut. 2007a, b).

Podobne struktury są wytwarzane przez neutrofile karpia. Tak jak w przypadku innych ryb, NET karpia zawierają DNA, histony H3 i białka pochodzące z ziarnistości, takie jak NE. Co więcej, pobudzone neutrofile zwiększają produkcję i uwalnianie MPO i MMP-9, co sugeruje, iż również te białka są składnikami NET karpia (PIJANOW-SKI i współaut. 2013, 2015b). Struktury te są wydzielane przez neutrofile w odpowiedzi na wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen associated molecular patterns, PAMP), typowe dla bakterii (LPS), wirusów (poli I:C, kwas poliinozyno-policytydylowy), grzybów (zymosan, β-glukan), oraz pod wpływem PMA (PIJANOWSKI i współaut. 2013, BROGDEN i współaut. 2014). Sieci nie są natomiast uwalniane przez neutrofile pobudzone wysoko oczyszczonym (metodą chromatografii jonowymiennej) LPS i/lub rekombinowanym interferonem gamma karpia (rcIFN-y2). Co ciekawe, nie tylko neutrofile, ale i makrofagi karpia produkują podobne struktury po stymulacji LPS. Oprócz DNA, w ich skład wchodzą między innymi histony (PIJANOWSKI i współaut. 2015a).

Warto zaznaczyć, że poszczególne stymulanty z różną intensywnością indukują tworzenie NET przez neutrofile karpia. Komórki te wydzielają najwięcej zewnątrzkomórkowego DNA po stymulacji zymosanem, natomiast najmniej, pod wpływem PMA. W powstawanie tych struktur mogą być zaangażowane różne mechanizmy, które są aktywowane w zależności od zastosowanego czynnika stymulującego. Ważną rolę odgrywa tu oksydaza NADPH. Stwierdzono m.in., że u karpia NET powstają w sposób zależny od ROS (pod wpływem PMA i poli I:C), częściowo zależny (po stymulacji zymosanem) oraz niezależny od ROS (w odpowiedzi na LPS) (PIJANOWSKI i współaut. 2013). Z kolei działanie na neutrofile β-glukanu, będącego głównym PAMP drożdży, związane jest z efektywniejszym wychwytywaniem, ale nie zabijaniem bakterii *Aeromonas hydrophila* (BROGDEN i współaut. 2014).

Nie tylko struktury PAMP oraz inne czynniki działające stymulująco na układ odpornościowy prowadzą do wytwarzania NET przez neutrofile ryb. U turbota komórki te w obecności bakterii E. coli i P. fluorescens również wydzielają sieci zbudowane z DNA i histonów, które unieruchamiają i zabijają bakterie E. coli lub utrudniają namnażanie się bakterii P. fluorescens. Badania in vivo pokazały, że unieruchomione bakterie mają wyraźne trudności w rozprzestrzenianiu się w obrębie tkanek i ich kolonizacji (CHI i SUN 2016). Wyniki te po raz kolejny są dowodem na to, że sieci produkowane przez leukocyty ryb nie tylko cechują się podobieństwem strukturalnym, ale mają zbliżone znaczenie funkcjonalne co NET ssaków. W obu przypadkach struktury te charakteryzują się aktywnością przeciwbakteryjną, zarówno w warunkach in vitro, jak i in vivo.

SIECI ZEWNATRZKOMÓRKOWE W ŚWIECIE ORGANIZMÓW BEZKRĘGOWYCH

W odporności bezkręgowców kluczową rolę pełnią komórki immunokompetentne i czynniki humoralne. Zwierzęta te w walce z patogenami stosują mechanizmy obronne bardzo podobne do tych, obserwowanych w odpowiedzi wrodzonej kręgowców. U bezkręgowców posiadających układ krwionośny otwarty, takich jak stawonogi (owady, skorupiaki) i mięczaki, komórkami odpowiedzialnymi za fagocytozę i cytotoksyczność są hemocyty, które dzieli się na podtypy, np. hemocyty hialinowe i granulocyty. Komórki te, wraz z licznymi składnikami humoralnymi (np. cekropiny, defensyny, proteazy), zawieszone są w hemolimfie (SÖDERHÄL 2010). Z kolei u bezkręgowców posiadających wtórną jamę ciała, celomę (np. pierścienice), występujący w niej płyn celomatyczny jest bogaty w liczne białka odpornościowe (lizozvm, fetydyny, lizyny, proteazy) oraz charakterystyczne komórki, celomocyty, wśród których wyróżnia się amebocyty i eleocyty (BILEJ i współaut. 2010). Bez względu na przyjęte nazewnictwo komórek, ich działania i uruchamiane mechanizmy są do siebie podobne. U bezkręgowców zabijanie patogenów, podobnie jak u kręgowców, może się odbywać na drodze fagocytozy lub zależne jest od enzymów (np. lizozym), ROS i białek przeciwbakteryjnych (np. defensyn) (SÖDER-HÄL 2010). Coraz więcej ośrodków badawczych potwierdza także możliwość wytwarzania przez fagocyty bezkręgowców sieci ET.

Pierwszymi doniesieniami na temat zewnątrzkomórkowych sieci u bezkręgowców były prace na owadach. Pokazano w nich, że larwy motylicy (Galleria mellonella) po zainfekowaniu Gram-ujemną enterobakterią, Photorhabdus luminescens, przeżywają dłużej, gdy dochodzi do wyrzucenia zewnątrzkomórkowego DNA lub RNA w hemocelu gospodarza. Ponadto stwierdzono, że odpowiedź na ten patogen wiąże się ze wzrostem ekspresji białek przeciwbakteryjnych i aktywności hemocytów (ALTINCICEK i współaut. 2008). Dodatkowo, CHAGAS i współaut. (2014) zauważyli, że u muszki piaskowej (Lutzomyia longipalpis) sieci zewnątrzkomórkowe, powstałe po zakażeniu pasożytami z rodzaju Leischmania, są rozkładane przez produkowane w śliniankach endogenne nukleazy, co sprzyja rozprzestrzenianiu się infekcji. Pomimo wykazania obecności zewnątrzkomórkowego DNA, wyniki tych prac nie zademonstrowały szeregu cech, którymi powinny charakteryzować się ET. W późniejszych badaniach struktury ET analizowane były już pod kątem składu i mechanizmów związanych z produkcją sieci. Pierwszym przedstawicielem skorupiaków, u którego wykryto tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci była krewetka biała (Litopenaeus vannamei) (NG i współaut. 2013). Po potraktowaniu jej hemocytów klasycznymi immunostymulantami, takimi jak PMA czy LPS, oraz bakteriami E. coli, komórki te wyrzucały sieci ET, a powstałe struktury miały budowę zbliżoną do sieci wyrzucanych przez neutrofile ssaków. Składały się one z gładkich włókien zbudowanych z jądrowego DNA oraz ziarnistości zawierających m.in. histon H1. W ET krewetki nie było natomiast żadnych białek przeciwbakteryjnych, jak MPO czy elastazy, co najprawdopodobniej związane jest z trudnościami metodycznymi w oznaczaniu tego typu białek u bezkręgowców. Nie wyklucza to z kolei obecności innych białek pochodzących z ziarnistości i cytoplazmy hemocytów. Wykazano, że ET wytwarzane przez hemocyty krewetek zawierają lizozym typu C (KOIWAI i współaut. 2016). Co więcej, dowiedziono, że indukcja sieci jest silniejsza po stymulacji żywymi bakteriami E. coli, a powstałe ET mają właściwości przeciwbakteryjne. Wychwytują, unieruchamiają i zabijają bakterie, co potwierdzono obserwując w elektronowym mikroskopie skaningowym zniszczoną strukture bakterii złapanych w sieć (NG i współaut. 2013, 2015). Tym samym pokazano, że ten mechanizm obrony przed patogenami może być potencjalnie skuteczniejszy niż fagocytoza (NG i współaut. 2013). Okazało się, że podanie DNazy I, w celu degradacji DNA wchodzącego w skład ET, oraz cytochalazyny D (CYT D), hamującej fagocytozę,

zwiększyło przeżywalność bakterii. Co ciekawe, działanie bakteriobójcze zależne od wyrzutu sieci ET było znacznie silniejsze przy większym stężeniu bakterii (10⁵ CFU), podczas gdy niższe stężenia (10² i 10³ CFU) nie wpływały istotnie na efektywność bójczą sieci (NG i współaut. 2015). Dodatkowo zespół Ng potwierdził, że po stymulacji PMA wyrzut ET przez hemocyty związany jest z aktywacją szlaku sygnałowego kinazy białkowej C.

Również ROBB i współaut. (2014) udowodnili, że hemocyty hialinowe kraba, raczyńca jadalnego (Carcinus maenas), stymulowane PMA, LPS, nadtlenkiem wodoru (H2O2) i bakteriami Gram-ujemnymi (Listonella anguillarum), wytwarzają ET. Z badań wynika, że wyrzucone sieci mają podobną morfologie do neutrofilowych sieci NET, a w ich składzie obecna jest peroksynektyna (ang. peroxinectin, PXN), białko homologiczne do MPO, oraz przeciwbakteryjne białka jądrowe i histony H2A (SCHMIDT i współaut. 2010). Zdolność do wyrzutu ET posiada-ją też komórki ziarniste (ang. semi-granular cel, SGC) raczyńca. Wyraźnie widać, że komórki te po stymulacji wydzielają sieci, co koreluje ze spadkiem ich żywotności. Wyrzut ET z komórek tego skorupiaka uzależniony jest od aktywności oksydazy NADPH i produkcji ROS (ROBB i współaut. 2014). Co więcej, zespół Robba pokazał zdolność do produkcji sieci przez komórki innych grup bezkręgowców, w tym małży (omułek jadalny, Mytilus edulis) i ukwiałów (ukwiał koński, Actinia equina). Z wcześniejszych prac wiadomo, że komórki immunokompetentne tych organizmów cechują się silnymi właściwościami fagocytarnymi i zaangażowane są w wybuch tlenowy (HUTTON i SMITH 1996, ARUMUGAM i współaut. 2000). Podobnie, w przypadku omułka i ukwiała po stymulacji PMA, tworzenie ET zależne jest od aktywności oksydazy NADPH (ROBB i współaut. 2014).

W badaniach na celomocytach dżdżownic (Eisenia andrei) struktury podobne do ET pojawiały się po stymulacji komórek LPS, zymosanem, PMA, a także bakteriami M. lysodeikus i Xenorhabdus bovienii (symbiotyczne bakterie pochodzące z nicieni) (HOMA i współaut. 2016). W skład celomatycznych sieci zewnątrzkomórkowych wchodzi jądrowe DNA, histony H3 (Ryc. 1) i białka pochodzenia cytoplazmatycznego, np. białka szoku cieplnego HSP27 (ang. heat shock protein 27). U dżdżownic, tak jak u skorupiaków, nie dostrzeżono obecności klasycznych składników sieci, tj. MPO i elastazy. Znaczenie tych czynników w wytwarzaniu sieci potwierdzono natomiast w eksperymentach z użyciem odpowiednich inhibitorów. Do zahamowania produkcji ET w celomocytach dżdżownic dochodzi po zastosowaniu inhibitorów proteaz, w tym dla proteaz serynowych i elastazy, ale nie pod wpływem inhibitorów autofagii i kaspaz, które biorą udział w procesie apoptozy. Dodatkowo, DPI (inhibitor oksydazy NADPH) hamuje pojawianie się sieci w przypadku komórek stymulowanych PMA. Podobnego efektu nie zaobserwowano w odpowiedzi na bakterie (HOMA i współaut. 2016). Wyniki te sugerują, że u bezkręgowców, podobnie jak u kręgowców, produkcja sieci nie zawsze jest zależna od ROS.

W skład ET wytwarzanych przez celomocyty dżdżownic wchodzą histony. Ciekawe jest to, że część z nich to histony cytrulinowane. Jak wspomniano wcześniej, dekondensacja chromatyny jądrowej jest zależna od odpowiedniej modyfikacji tych białek, w tym właśnie cytrulinacji histonów. U kręgowców za cytrulinację histonów odpowiada enzym PAD4 (ROHRBACH i współaut. 2012). Czynnik ten nie został jednak do tej pory wykryty u niższych organizmów, a zatem mechanizm cytrulinacji histonów wchodzących w skład ET nie jest do końca jasny. W prowadzonych przez nas badaniach na celomocytach dżdżownic wykazaliśmy hamujący wpływ znanego inhibitora PAD4 (Cl-amidine) na tworzenie sieci oraz na obecność cytrulinowanych histonów H3 w obrębie ET i ich brak po zastosowaniu inhibitora (HOMA i współaut. 2016). Wyniki te wyraźnie wskazują na występowanie u dżdżownic cytrulinacji histonów H3 oraz na przypuszczalną obecność enzymu o podobnej roli (specyfice, aktywności), a podatnego na działanie klasycznego inhibitora PAD4.

W najnowszych badaniach stwierdzono zdolność do produkcji zewnątrzkomórkowych sieci przez hemocyty mięczaków (nagich śli-



Ryc. 1. Reprezentatywne zdjęcia sieci ET wyrzucanych przez celomocyty dżdżownic *Eisenia andrei* po stymulacji bakteriami (*Xenorhabdus bovienii*).

Komórki znakowano: i) Sytox Orange (wybarwione na czerwono DNA w obrębie ET i bakterie), ii) przeciwciałami anty-H3 znakowanymi FITC (wybarwione na zielono białka histonowe H3). maków gatunków Arion lusitanicus i Limax maximus oraz ślimaków muszlowych, Achatina fulica) (LANGE i współaut. 2017). Ekspozycja hemocytów w warunkach in vitro oraz in vivo na pasożytnicze larwy nicieni (rząd Metastrongylus) indukuje pojawienie się zewnątrzkomórkowych sieci, określanych przez autorów jako zewnątrzkomórkowe sieci fagocytów bezkręgowców (ang. invertebrate extracellular phagocyte trap, InEPT). Sieci te składają się z DNA związanego z białkami histonowymi (H1, H2A/H2B, H3, H4) i MPO. Analogicznie do badań na ssakach, również w przypadku InEPT zauważono, iż mogą się one różnić formą morfologiczną, tzn. przyjmują zarówno postać skoncentrowaną (aggET), jak i występują w formie bardziej rozłożystej (sprET, diffET). Analizy przy użyciu mikroskopu skaningowego pokazały zdolność do wyłapywania i unieruchamiania zewnątrzkomórkowe nicieni przez DNA ślimaków, co zostało określone jako efekt "zakotwiczenia". Następnie dochodzi do otoczenia pasożytów przez hemocyty. Nie wykazano natomiast, aby sieci działały toksycznie na wychwycone nicienie. Autorzy sugerują, że takie zakotwiczenie pozwala uniknąć przemieszczania się pasożytów w organizmie ślimaka (LANGE i współaut. 2017).

W badaniach mechanizmów powstawania zewnątrzkomórkowych sieci zaskakującymi doniesieniami są wyniki uzyskane w przypadku prostszych organizmów. W obrębie bezkręgowców najprostszym organizmem, u

AGREGACIA POJEDVNCZYCH AMEB AMEBA ZAKTYWNO SCIĄ RGOCYTARNĄ Vykl życiowy Dictyostelium discoldeum PCCHO WANIE ZARODNI ORMA ZARODNI KOWA

Ryc. 2. Schemat cyklu życiowego socjalnej ameby *Dictyostelium discoideum* (wg ZHANG i SOLDATI 2016, zmodyfikowana).

którego stwierdzono ET jest żyjąca w glebie, należąca do gromady Amoebozoa i grupy śluzowców, socjalna ameba Dictyostelium discoideum (ZHANG i SOLDATI 2016, ZHANG i współaut. 2016). Organizm ten, w ciągu życia przechodzi od formy jednokomórkowej do wielokomórkowego pełzaka, a następnie do wegetatywnej nibyśluźni zbudowanej z trzonu, na szczycie którego powstają zarodniki (ZHANG i SOLDATI 2016) (Ryc. 2). W warunkach fizjologicznych pojedyncze ameby żywią się fagocytowanymi bakteriami i dopiero bodziec zewnętrzny, np. głodzenie, inicjuje proces przemian prowadzący do agregacji pojedynczych ameb (około 100 tysięcy komórek), a następnie do ich różnicowania do formy zarodnikowej (ang. fruiting body). Możliwe jest mechaniczne rozdzielenie takiej wielokomórkowej formy na pojedyncze komórki, co ułatwia dokładną analizę aktywności poszczególnych komórek. Jak się okazuje, wielokomórkowa forma składa się z kilku typów komórek tworzących pseudoplazmodium, z których jedynymi, zdolnymi do przeprowadzenia fagocytozy, są wyspecjalizowane komórki S (ang. sentinel cells). Są one produkowane przez cały czas wewnątrz organizmu, w celu walki z patogenami, a w czasie przemieszczania się pełzaka są stopniowo "złuszczane" (CHEN i współaut. 2007, ZHANG i współaut. 2016).

Biorąc pod uwagę funkcjonalne podobieństwo komórek S do neutrofili i makrofagów, autorzy są zgodni, że komórki te od-

powiadają za proste funkcje odpowiedzi wrodzonej i pozwalają na przekształcenie się ameby w wolną od patogenów formę zarodnikową (ZHANG i współaut. 2016). Komórki S wytwarzają zewnątrzkomórkowe sieci ET, w skład których wchodzi mitochondrialne DNA, a proces ten jest zależny od ROS, со udowodniono stosujac katalazę, enzym przeprowadzający rozkład nadtlenku wodoru. Ponadto, komórki S wykazują ekspresję domeny TirA, podobnej do TIR (ang. Toll/IL-1R homology domain), związanej z rozpoznaniem patogenów, jak też homologiczne do ludzkich enzymy NOX, odpowiedzialne za generowanie ROS (ZHANG 2016). współaut. Obydwa te elementy okazały się być istotne w formowaniu sieci. Przemawia za tym fakt, że mutacja w obrębie genów

711

kodujących TirA i NOX prowadzi do obniżenia zdolności do usuwania bakterii z organizmu ameb w stosunku do typów dzikich (bez mutacji), co w efekcie prowadzi do powstania form zarodnikowych zakażonych patogenami (ZHANG i współaut. 2016).

Dotychczasowe badania na komórkach bezkręgowców wskazują na duże podobieństwa w wytwarzaniu i budowie sieci ET u przedstawicieli ameb, owadów, skorupiaków, dżdżownic i mięczaków, w stosunku do struktur NET produkowanych przez neutrofile kręgowców. Warto zaznaczyć, że wiele punktów związanych z zagadnieniem produkcji ET nie zostało jeszcze zweryfikowanych.

SIECI ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE W ŚWIECIE ROŚLIN

Wydaje się, że również rośliny są zdolne do tworzenia ET. W 2009 r. zespół Marthy Hawes z Uniwersytetu w Arizonie opisał występowanie takich struktur wytwarzanych przez znajdujące się w korzeniach roślin tzw. korzeniowe komórki graniczne (ang. root border cells, RBC) (WEN i współaut. 2009). Stwierdzili oni, że RBC wydzielają macierz zewnątrzkomórkową składającą się z wielocukrów, białek i DNA, zdolną do unieruchomienia patogenów. Struktury te, przez analogię do neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych, są przez autorów określane mianem NET, ale skrót ten jest rozwijany odmiennie, tzn. nucleic acid extracellular traps (TRAN i współaut. 2016) lub RET (ang. root extracellular traps) (DRIOUICH i współaut. 2013).

W tym miejscu należy przypomnieć, że RBC są żywymi komórkami uwalnianymi do gleby podczas wzrostu korzenia z najbardziej zewnętrznej warstwy czapeczki (JAROSZUK--ŚCISEŁ i KUREK 2007), a ich wytwarzanie przez korzeń porównywane jest do produkcji neutrofili w szpiku kostnym (CURLANGO-RI-VERA i współaut. 2014). Co ciekawe, liczba RBC produkowanych i uwalnianych z powierzchni czapeczki jest cechą gatunkowo specyficzną. W odpowiedzi na sygnały, takie jak obecność patogenów czy metali, w korzeniu dochodzi do inicjacji cyklu komórkowego i nowe RBC oddzielane są do środowiska. Po uwolnieniu, komórki te przez jakiś czas pozostają żywe (w strefie korzeniowej około 7 dni, a w warunkach in vitro około 3 miesiące). Znajdujące się w środowisku komórki przeżywają dzięki związkom organicznym wydzielin korzeniowych, głównie otaczającego je śluzu, bowiem ich własne zapasy tłuszczów i skrobi sa zbyt małe (HAWES i współaut. 2002). W pewnym sensie takie oddzielanie RBC przypomina opisane powyżej zjawisko złuszczania komórek S u socjalnych ameb.

Znamienny w kontekście zdolności RBC do wydzielania struktur podobnych do NET i ich potencjalnej funkcji w zwalczaniu patogenów jest fakt, że w strefie korzeniowej RBC konkurują z mikroorganizmami o składniki odżywcze pochodzące z wydzielin korzeniowych. Dodatkowo RBC uwalniają: (i) czynniki kontrolujące ekspresję genów (tak w roślinie, jak i w mikroorganizmach zasiedlających strefę korzeniową), (ii) chemoatraktanty lub repelenty mikroorganizmów oraz nicieni, a także (iii) antocyjany, antybiotyki i galaktozydazy (JAROSZUK-ŚCISEŁ i KU-REK 2007). Sądzi się, że komórki graniczne są zdolne do produkcji i wydzielania ponad 100 różnych białek, w tym przeciwbakteryjnych enzymów. Kompleks ten zawiera także histon H4 i opisywany jest skrótem RCS (ang. root cap secretome).

W swej pracy opublikowanej w 2009 r. zespół Hawes dowiódł (WEN i współaut. 2009), że RBC pozyskane z grochu zwyczajnego wydzielają DNA, który barwi się zarówno DAPI, jak i Sytox Green. Ponadto, równoczesne podanie do hodowli korzeni sporów grzyba Nectria haemotococca i DNazy I powoduje wzrost (od 3 do 100%) częstości infekcji, przejawiającej się nekrozą, całkowitym zahamowaniem wzrostu korzeni i wzrostem strzępków grzyba w regionie otaczającym korzeń. Hodowla niezainfekowanych korzeni w obecności DNazy pozwoliła stwierdzić, że w przypadku zdrowych korzeni sam enzym nie powoduje ani nekrozy ani zahamowania wzrostu. Podobnie jak w przypadku DNazy, również eksonukleaza BAL31 powoduje degradację wydzielanego przez RBC DNA, jednak proces ten wymaga znacznie więcej czasu, co z kolei wynika ze spowolnienia przebiegu infekcji grzybiczej. Autorzy udowodnili, że wydzielanie zewnątrzkomórkowego DNA nie jest połączone ze śmiercią komórek granicznych, ale jest on aktywnie syntetyzowany i wydzielany (WEN i współaut. 2009). W kolejnej pracy tego samego zespołu (HAWES i współaut. 2011) zaobserwowano, że zewnątrzkomórkowy DNA pochodzący z RBC ma zdolność zatrzymywania i agregowania bakterii Agrobacterium tumefaciens. Autorzy sugerują, że zewnątrzkomórkowy DNA wraz z białkami RCS tworzą rodzaj bariery oddzielającej korzeń od infekcji i wyłapującej patogeny, a potraktowanie DNazą lub proteazą powoduje przerwanie szczelności tej bariery, co pozwala na penetrację jej przez patogeny i umożliwia infekcję korzenia (Ryc. 3). Co więcej, patogeny roślin, takie jak Cochliobolus heterostrophus, Magnaporthe grisea czy A. tumefaciens, wykazują obecność enzymów o aktywności DNaz, co najprawdopodobniej zwiększa ich wirulencję.



Ryc. 3. Wpływ DNazy I i proteazy na NET/RET tworzone przez komórki graniczne korzenia (RBC) pod wpływem patogennych bakterii i grzybów. RCS (ang. *root cap secretome*) – białka wydzielane przez RBC, exDNA – zewnątrzkomórkowy DNA.

Ta ostatnia idea jest rozwijana w kolejnej, najpełniejszej i najbardziej zaawansowanej pod względem metodycznym, pracy zespołu Hawes, która została opublikowana na łamach prestiżowego Plos Pathogens (TRAN i współaut. 2016). Stwierdzono, że inokulacja zawiesiny RBC grochu patogennymi bakteriami *Ralstonia solanacearum* powoduje szybkie (30 min) pojawienie się w zawiesinie komórkowej zewnątrzkomórkowego DNA barwiącego się DAPI i Sytox Green. NET nie



Ryc. 4. Zdjęcia stymulowanych neutrofili karpia (*Cyprinus carpio* L.). Komórki znakowano: i) DAPI (wybarwione na niebiesko jadro komórki, słabo widoczne NET, ii) Sytox Orange (wybarwione na czerwono DNA w obrębie NET), iii) przeciwciałami anty-NE (elastaza neutrofilowa) znakowanymi FITC (wybarwiona na zielono NE).

pojawiały się natomiast pod wpływem niepatogennych bakterii, takich jak *E.coli* czy *Sinorhizobium meliloti.* Ciekawe jest też to, że do powstania NET w komórkach grochu dochodzi pod wpływem pochodzącego z flageliny peptydu Flg22, natomiast mutanty bakterii nieposiadające flageliny nie powodują wydzielania zewnątrzkomórkowego DNA z RBC.

Okazało się, że wydzielone przez korzeniowe komórki graniczne DNA jest zdolne do złapania i zatrzymania części, ale nie wszystkich patogennych bakterii. W celu wyjaśnienia, czy "złapane" w taką sieć bakterie są zabijane, przeprowadzono dwa eksperymenty. W pierwszym z nich bakterie Ralstonia solanacearum potraktowane zostały histonem H4 człowieka (w 97% identycznym do tego obecnego w RCS). W ciagu 3 godzin zaobserwowano śmierć około 50% bakterii, a zjawisko to było częściowo odwracane przez przeciwciała skierowane przeciwko histonowi H4. W drugim z eksperymentów bakterie inkubowano w obecności RBC, co powodowało spadek ich żywotności (śmierć około 25% bakterii). Podobnego zjawiska nie zauważono w przypadku podania do hodowli DNazy oraz zastosowania wspomnianych wcześniej przeciwciał. Autorzy konkludują, że przeciwciała albo zapobiegają połączeniu się bakterii

> z histonem, albo neutralizują jego przeciwbakteryjne działanie. Ponadto, zarówno zewnątrzkomórkowy DNA, jak i histon H4 są niezbędne do zabijania bakterii zatrzymanych przez NET (TRAN i współaut. 2016).

> Ten fakt wykorzystywany jest przez patogenne bakterie, które poprzez wydzielanie DNaz powodują rozkład NET, co zwiększa ich wirulencję. W przypadku R. solanacearum stwierdzono obecność dwóch enzymów o aktywności niespecyficznych endonukleaz: NucA i NucB. Enzymy te są zdolne do rozkładania zewnątrzkomórkowego DNA wydzielonego przez RBC. Z kolei mutanty AnucA, AnucB i podwójny mutant ∆nucA/B cechują się obniżoną wirulencją w stosunku do korzeni roślin. Wykazano, że bakterie posiadające wspomniane endonukleazy dość łatwo uwalniają się z NET, podczas gdy bakterie ∆nucA/B nie są w warunkach in vitro zdolne do "ucieczki" przed RBC. Okazało się, że zdolność bakterii do takiej ucieczki koreluje z ich skutecznym zakażaniem korzenia i hamowaniem jego wzrostu (TRAN i współaut. 2016).

Na inną ciekawą rolę NET/RET wskazują DRIOICH i współaut. (2013). Sugerują oni, że wydzielane przez RBC sieci mogą przyciągać i zatrzymywać w okolicy korzeniowej ryzobakterie, np. *Bacillus* spp., promujące wzrost roślin PGPR (ang. plant growth-promoting rhizobacteria) i ograniczające choroby infekcyjne.

Trzeba jednak zauważyć, że jak do tej pory możliwość tworzenia NET przez komórki roślin opisuje wyłącznie jeden zespół i informacje te nie zostały potwierdzone przez inne grupy badawcze zajmujące się odpornością roślin. Nie sposób również nie wspomnieć, że o ile u zwierząt do nazwania jakiejś struktury mianem ET niezbędna jest kolokalizacja zewnątrzkomórkowego DNA, histonów i innych białek bakteriobójczych, np. elastazy neutrofilowej, o tyle we wszystkich pracach dotyczących NET u roślin autorzy ograniczają się do barwienia zewnątrzkomórkowego DNA, nie pokazując jego bezpośredniego połączenia z innymi czynnikami bakteriobójczymi. W pracach tych dość enigmatycznie wspomina się, że substancje takie znajdują się w RCS. Pewne wątpliwości metodyczne budzi fakt barwienia zewnątrzkomórkowego DNA za pomocą DAPI.



Ryc. 5. Schematyczne drzewo filogenetyczne pokazujące pokrewieństwo organizmów, u których udowodniono występowanie sieci ET (wg LETUNIC i BORK 2016, zmodyfikowana).

W przypadku badań ET u zwierząt barwnik ten okazał się bowiem mało skuteczny (Kołaczkowska i współaut., informacja ustna, Ryc. 4).

PODSUMOWANIE

Wytwarzanie zewnątrzkomórkowych sieci stanowi złożony mechanizm, który jest jednym z elementów odpowiedzi wrodzonej, aktywowanej m.in. podczas różnego rodzaju infekcji. ET zapewniają organizmom przeżycie w niesprzyjających warunkach środowiskowych związanych z działalnością patogenów. Strategia związana z wydzielaniem sieci może też stwarzać zagrożenie dla organizmu gospodarza, co jest konsekwencją niekontrolowanej produkcji lub rozkładu powstałych struktur. Dlatego niezwykle istotne jest utrzymanie równowagi pomiędzy procesami tworzenia i rozkładu ET. Wykorzystywanie wyrzutu DNA jako narzędzia do wychwytywania i zabijania patogenów ma swoje ewolucyjne uzasadnienie. Podczas pojawienia się wielokomórkowych form życia, prymitywny wrodzony układ immunologiczny rozwinał postać układu wyspecjalizowanych komórek fagocytarnych. Ta profesjonalizacja odpor-ności pozwoliła na rozwój zaawansowanych mechanizmów obronnych w tym na "poświęcenie" części komórek poprzez uruchamianie mechanizmu związanego z formowaniem sieci. Produkcja ET przez tak proste organizmy jak socjalne ameby wyraźnie wskazuje na to, iż mechanizmy obronne oparte na wydzielanym DNA pojawiły się około 1,3 miliarda lat temu, znacznie wcześniej niż dotychczas sądzono (Ryc. 5) Można przewidywać, że w niedalekiej przyszłości strategia ta zostanie zidentyfikowana u innych wczesnych wielokomórkowych przodków, co da nam bardziej kompletny obraz ewolucji ET.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują dr hab. Elżbiecie Kołaczkowskiej i dr Krzysztofowi Rakusowi za cenne uwagi.

Streszczenie

Zewnątrzkomórkowe sieci (ET) stanowią ewolucyjnie stary mechanizm obronny, który funkcjonuje zarówno u wyższych kręgowców ze ssakami na czele, jak i u kręgowców zmiennocieplnych np. ryb, bezkręgowców i najprawdopodobniej u roślin. Struktury ET unieruchamiają patogeny, zabezpieczając organizm przed ich rozprzestrzenianiem się i prawdopodobnie prowadzą do śmierci przynajmniej niektórych z nich. W przypadku leukocytów ssaków stwierdzono, że w powstawanie sieci zaangażowane są różne szlaki molekularne i cząsteczki sygnałowe, np. wolne rodniki tlenowe, jony Ca2+ czy kinazy białkowe. Okazuje się, że formowanie sieci przez komórki immunokompetentne w innych grupach organizmów podlega podobnym regulacjom. W większości przypadków, zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców, ważną rolę w tym procesie odgrywa aktywność oksydazy NADPH oraz związana z nią zdolność do przeprowadzenia wybuchu tlenowego. Strategia obronna związana z produkcją ET bazuje na aktywności poszczególnych komponentów sieci. Występują wśród nich DNA, histony, jak również białka o silnych właściwościach bakteriobójczych np. różnego typu proteazy. Dokładny skład tych struktur może być nieco odmienny u organizmów należących do różnych taksonów, jak również w zależności od rodzaju komórek immunokompetentnych wytwarzających sieci.

LITERATURA

- ALEMÁN O. R., MORA N., CORTES-VIEYRA R., URIBE-QUEROL E., ROSALES C., 2016. Differential use of human neutrophil Fcy receptors for inducing neutrophil extracellular trap formation. J. Immunol. Res. 2016, 2908034.
- ALTINCICEK B., STÖTZEL S., WYGRECKA M., PREISS-NER K.T., VILCINSKAS A., 2008. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. J. Immunol. 181, 2705-2712.
 ANAND P., CERMELLI S., LI Z., KASSAN A., BOSCH
- ANAND P., CERMELLI S., LI Z., KASSAN A., BOSCH M., SIGUA R., HUANG L., OUELLETTE A. J., POL A., WELTE M. A., GROSS S. P., 2012. A novel role for lipid droplets in the organismal antibacterial response. Elife 1, e00003.
- role for lipid aroplets in the organismal antibacterial response. Elife 1, e00003.
 ARAI Y., NISHINAKA Y., ARAI T., MORITA M., MIZUGI-SHI K., ADACHI S., TAKAORI-KONDO A., WATA-NABE T., YAMASHITA K., 2014. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 443, 556-561.
- ARUMUGAM M., ROMESTAND B., TORREILLES J., ROCH P., 2000. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by Mytilus galloprovincialis haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. Eur. J. Cell Biol. 79, 513-519.
- AULIK N. A., HELLENBRAND K. M., CZUPRYNSKI C. J., 2012. Mannheimia haemolytica and its leukotoxin causemacrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. Infect. Immun. 80, 1923-1933.
- AUGUSTO L. A., DECOTTIGNIES P., SYNGUELAKIS M., NICAISE M., LE MARÉCHAL P., CHABY R., 2003. Histones: a novel class of lipopolysaccharide-binding molecules. Biochemistry 42, 3929-3938.
- BAGUST T. J., JONES R. C., GUY J. S., 2000. Avian infectious laryngotracheitis. Rev. Sci. Tech. 19, 483-492.
- BEHNEN M., LESCHCZYK C., MÖLLER S., BATEL T., KLINGER M., SOLBACH W., LASKAY T., 2014. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcyRIIIB and Mac-1. J. Immunol. 193, 1954-1965.
 BELAAOUAJ A., 2002. Neutrophil elastase-mediated
- BELAAOUAJ A., 2002. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. Microb. Infect. 4, 1259-1264.
- BIANCHI M., NIEMIEC M. J., SILER U., URBAN C. F., REICHENBACH J., 2011. Restoration of anti-Aspergillus defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. J. Allergy Clin. Immunol. 127, 1243-1252.
- BILEJ M., PROCHÁZKOVÁ P., ŠILEROVÁ M., JOSKOVÁ R., 2010. Earthworm immunity. [W:] Invertebrate immunity. SÖDERHÄLL K. (red.). Springer

Science+Business Media, LLC, New York, 66-79.

- BOE D. M., CURTIS B. J., CHEN M. M., IPPOLITO J. A., KOVACS E. J., 2015. Extracellular traps
- and macrophages: new roles for the versatile phagocyte. J. Leukoc. Biol. 97, 1023-1035. BRANZK N., PAPAYANNOPOULOS V., 2013. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. Semin. Immunopathol. 35, 513-530.
- BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A., 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second func-tion of chromatin? J. Cell Biol. 198,773-783.
- BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMANN C., FAUL-ER B., UHLEMANN Y., WEISS D. S., WEINRAUCH Y., ZYCHLINSKY A., 2004. Neutrophil extracel-lular traps kill bacteria. Science 303, 1532-1535.
- BROGDEN G., KRIMMLING T., ADAMEK M., NAIM H. Y., STEINHAGEN D., VON KÖCKRITZ- BLICKWEDE M., 2014. The effect of β-glucan on formation and functionality of neutrophil extracellular traverse for convinue service of the period. traps in carp (Cyprinus carpio L.). Dev. Comp. Immunol. 44, 280-285.
- CHAGAS A. C., OLIVEIRA F., DEBRABANT A., VALENZUELA J. G., RIBEIRO J. M., CALVO E., 2014. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases Leishmania parasite survival in neutrophils and inhibits XIIa contact activation in human plasma. PLoS Pathog. 10, e1003923.
- CHEN G., ZHUCHENKO O., KUSPA A., 2007. Im-mune-like phagocyte activity in the social amoeba. Science 317, 678-81.
- CHI H., SUN L., 2016. Neutrophils of Scophthal-mus maximus produce extracellular traps that capture bacteria and inhibit bacterial infection. Dev. Comp. Immunol. 56, 7-12.
- CHO J. H., FRASER I. P., FUKASE K., KUSUMOTO S., FUJIMOTO Y., STAHL G. L., EZEKOWITZ R. A, 2005. Human peptidoglycan recognition pro-tein S is an effector of neutrophil-mediated in*nate immunity.* Blood 106, 2551-2558. CHO J. H., SUNG B. H., KIM S. C., 2009. *Bufo*-
- rins: histone H2A-derived antimicrobial pep-tides from toad stomach. Biochim. Biophys. Acta 1788, 1564-1569.
- CHUAMMITRI P., OSTOJIĆ J., ANDREASEN C. B., REDMOND S. B., LAMONT S. J., PALIĆ D., 2009. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. Vet. Immunol. Immunopathol. 100-106-121 129, 126-131.
- CONNOR M. A., JASO-FRIEDMANN L., LEARY J. H. 3RD., EVANS D. L., 2009. Role of nonspecific cytotoxic cells in bacterial resistance: expression of a novel pattern recognition receptor with antimicrobial activity. Mol. Immunol. 46, 953-961.
- CURLANGO-RIVERA G., FLORES-LARA Y., CHO I., HUSKEY D. A., XIONG Z., HAWES M. C., 2014. Signals controlling extracellular trap formation in plant and animal immune responses. Clin. Microbiol. 3, 5.
- DE CICCO M., RAHIM M. S., DAMES S. A., 2015. Regulation of the target of rapamycin and other phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases by membrane targeting. Membranes 5, 553-575.
- DOUDA D. N., KHAN M. A., GRASEMANN H., PALA-NIYAR N., 2015. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112, 2817-2822. DRESCHER B., BAI F., 2013. Neutrophil in viral in-fections, friend or foe? Virus. Res. 171, 1-7.

- DRIOUICH A., FOLLET-GUEYE M. L., VICRÉ-GIBOUIN M., HAWES M., 2013. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. Curr. Opin. Plant Biol. 16, 489-495.
 DWORSKI R., SIMON H. U., HOSKINS A., YOUSEFI S., 2011. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA trans in human alloratic actimatic air
- DNA traps in human allergic asthmatic air-ways. J. Allergy Clin. Immunol. 127, 1260-1266.
- FADEEL B., AHLIN A., HENTER J. I., ORRENIUS S., HAMPTON M. B., 1998. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. Blood 92, 4808-4818.
 FUCHS T. A., ABED U., GOOSMANN C., HURWITZ R., SCHULZE I., WAHN V., WEINRAUCH Y., BRINK-MANN V., ZYCHLINSKY A., 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular
- death program leads to neutrophil extracellular
- traps. J. Cell Biol. 176, 231-241. GARCIA M., SPATZ S., GUY J. S., 2013. Infectious laryngotracheitis. [W:] Diseases of poultry. SWAYNE D. E. (red.). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 161-179.
- GIAMBELLUCA M., GENDE O., 2008. Hydrogen per-oxide activates calcium influx in human neu-trophils. Mol. Cell. Biochem. 309, 151-156.
 GRAY R. D., LUCAS C. D., MACKELLAR A., LI F., HIERSEMENZEL K., HASLETT C., DAVIDSON D. J., ROSSI A. G., 2013. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the gener-ation of human neutrophil extracellular trans. ation of human neutrophil extracellular traps. J. Inflamm. 10, 12.
- GRINBERG N., ELAZAR S., ROSENSHINE I., SHPIGEL N. Y., 2008. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic Escherichia coli. Infect. Im-mun. 76, 2802-2807.
- HAKKIM A., FUCHS T. A., MARTINEZ N. E., HESS S., PRINZ H., ZYCHLINSKY A., WALDMANN H., 2011. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is re-quired for neutrophil extracellular trap forma-
- quirea for heutrophil extracellular trap forma-tion. Nat. Chem. Biol. 7, 75-77.
 HALVERSON T. W., WILTON M., POON K. K., PETRI B., LEWENZA S., 2015. DNA is an antimicrobi-al component of neutrophil extracellular traps. PLoS Pathog. 11,e1004593.
 HAMPTON M. B., STAMENKOVIC I., WINTERBOURN C.
 C. 2002. Interaction with substants compilied
- C., 2002. Interaction with substrate sensitises caspase-3 to inactivation by hydrogen perox-ide. FEBS Lett. 517, 229-232.
- HAWES M. C., BENGOUGH G., CASSAB G., PONCE.,
- HAWES M. C., BENGOUGH G., CASSAB G., FONCE., 2002. Root caps and rhizosphere. J. Plant Growth Regul. 21, 352-367.
 HAWES M. C., CURLANGO-RIVERA G., WEN F., WHITE G. J., VANETTEN H. D., XIONG Z., 2011. Extracellular DNA: the tip of root defenses? Plant Sci 180, 741 745
- Extracellular DNA. the up of root defenses
 Plant Sci. 180, 741-745.
 HAZEKI O., HAZEKI K., KATADA T., UI M., 1996. In-hibitory effect of wortmannin on phosphatidy-linositol 3-kinase-mediated cellular events. J. Lipid Mediat. Cell Signal. 14, 259-261
- HE H., FARNELL M. B., KOGUT M. H., 2003. In-flammatory agonist stimulation and signal pathway of oxidative burst in neonatal chick*en heterophils.* Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 135, 177-184.
- HELLENBRAND K. M., FORSYTHE K. M., RIVERA-RI-VAS J. J., CZUPRYNSKI C. J., AULIK N. A., 2013. Histophilus somni causes extracellular
- Tratophates Soluti causes extracellular trap formation by bovine neutrophils and mac-rophages. Microb. Pathog. 54, 67-75.
 HERMOSILLA C., CARO T. M., SILVA L. M., RUIZ A., TAUBERT A., 2014. The intriguing host innate immune response: novel anti-parasitic defence hu neutrophil extracellular trans. Parasitology by neutrophil extracellular traps. Parasitology 141, 1489-1498.

- Homa J., Ortmann W., Kolaczkowska E., 2016. Conservative mechanisms of extracellular trap formation by Annelida Eisenia andrei: serine protease activity requirement. PLoS One 11, e0159031.
- HUTTON D. M. C., SMITH V. J., 1996. Antibacterial properties of isolated amoebocytes from the sea anemone Actinia equine. Biol. Bull. 191, 441-451.
- ITAKURA A., MCCARTY O. J., 2013. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neu-trophil extracellular traps via regulation of autophagy. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 305, C348-C354.
- JAROSZUK-ŚCISEŁ J., KUREK E., 2007. Komórki graniczne : strukturalny i funkcjonalny składnik systemu korzeniowego. Post. Biol. Kom. 34, 623-634.
- KAHLENBERG J. M., CARMONA-RIVERA C., SMITH C. K., KAPLAN M. J., 2013. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the
- Iular trap-associatea protein acuvation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. J. Immunol. 190, 1217-1226.
 KATKAR G. D., SUNDARAM M. S., NAVEENKUMAR S. K., SWETHAKUMAR B., SHARMA R. D., PAUL M., VISHALAKSHI G. J., DEVARAJA S., GIRISH K. S., KEMPARAJU K., 2016. NETosis and lack of DNace activity are key factors in Echis cari-DNase activity are key factors in Echis cari-natus venom-induced tissue destruction. Nat. Commun. 7, 11361. KOIWAI K., ALENTON R. R., KONDO H., HIRONO I.,
- 2016. Extracellular trap formation in kuruma shrimp (Marsupenaeus japonicus) hemocytes is
- Kolaczkowska E., Jenne C. N., Surewaard B. G., THANABALASURIAR A., LEE W. Y., SANZ M. J., MOWEN K., OPDENAKKER G., KUBES P., 2015. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. Nat. Commun. 6, 6673.
- KRAUTGARTNER W. D., KLAPPACHER M., HANNIG M., OBERMAYER A., HARTL D., MARCOS V., VITKOV L., 2010. Fibrin mimics neutrophil extracellular traps in SEM. Ultrastruct. Pathol. 34, 226-231
- LANGE M. K., PENAGOS-TABARES F., MUÑOZ-CARO T., GÄRTNER U., MEJER H., SCHAPER R., HER-MOSILLA C., TAUBERT A., 2017. Gastropod-derived haemocyte extracellular traps entrap metastrongyloid larval stages of Angiostrongylus vasorum, Aelurostrongylus abstrusus and Troglostrongylus brevior. Parasit. Vectors 10, 50.
- Leshner M., Wang S., Lewis C., Zheng H., Chen X. A., Santy L., Wang Y., 2012. PAD4 mediated histone hypercitrullination in- duces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-
- like structures. Front. Immunol. 3, 307. LETUNIC I., BORK P., 2016. Interactive tree of life (*iTOL*) *v3*: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. Nucleic Acids Res. 44, W242-W245.
- LI P., LI M., LINDBERG M. R., KENNETT M. J., XIONG N., WANG Y., 2010. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. J. Exp. Med. 207, 1853-1862.
- LIN A. M., RUBIN C. J., KHANDPUR R., WANG J. Y., RIBLETT M., YALAVARTHI S., VILLANUEVA E. C., SHAH P., KAPLAN M. J., BRUCE A. T., 2011. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoria-sis. J. Immunol. 187, 490-500.

- Mamikonyan G., Kiyatkin A., Movsesyan N., Mkrtichyan M., Ghochikyan A., Petrushina I., HWANG J., ICHIM T. E., KELEDJIAN H., AG-ADJANYAN M. G., 2008. Detection of the active components of calf thymus nuclear proteins (TNP), histones that are binding with high af-finity to UUL acculance proteins and CD4 med
- (INP), histones that are binding with high affinity to HIV-1 envelope proteins and CD4 molecules. Curr. HIV Res. 6, 318-326.
 MCINTURFF A. M., CODY M. J., ELLIOTT E. A., GLENN J. W., ROWLEY J. W., RONDINA M. T., YOST C. C., 2012. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 a. Blood 120, 3118-3125.
- MÉNDEZ-SAMPERIO P., 2010. The human cathelici-din hCAP18/LL-37: a multifunctional pep tide involved in mycobacterial infections. Peptides 31, 1791-1798.
- MERZA M., HARTMAN H., RAHMAN M., HWAIZ R., ZHANG E., RENSTRÖM E., LUO L., MÖRGELIN M., REGNER S., THORLACIUS H., 2015. Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice
- with severe acute pancreatitis. Gastroenterology 149, 1920-1931.
 METZLER K. D., FUCHS T. A., NAUSEEF W. M., RE-UMAUX D., ROESLER J., SCHULZE I., WAHN V., PAPAYANNOPOULOS V., ZYCHLINSKY A., 2011. Myeloperoxidase is required for neutrophil ex-tense linear trans. formations in contrast for the second tracellular trap formation: implications for in-nate immunity. Blood 117, 953-959.
- MORSHED M., HLUSHCHUK R., SIMON D., WALLS A.F., OBATA-NINOMIYA K., KARASUYAMA H., DJONOV V., EGGEL A., KAUFMANN T., SIMON H. U., YOUSEFI S., 2014. NADPH oxidase-in-dependent formation of extracellular DNA traps by base-files. Lowershel 100, 5214 5202 by basophils. J. Immunol. 192, 5314-5323.
- MUÑOZ-CARO T., SILVA L. M., RITTER C., TAUBERT A., HERMOSILLA C., 2014. Besnoitia besnoiti
- A., HERMOSILLA C., 2014. Destinute Destinute tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation. Parasitol. Res. 113, 4189-4197.
 MUÑOZ-CARO T., RUBIO R. M. C., SILVA L. M., MAGDOWSKI G., GÄRTNER U., MCNEILLY T. N., TAUBERT A., HERMOSILLA C., 2015. Leuco-cyte-derived extracellular trap formation sig-rificantly contributor to Hacmorphus contortuo. nificantly contributes to Haemonchus contortus
- larval entrapment. Parasit. Vectors 8, 607. NEELI I., RADIC M., 2013. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. Front. Immunol. 4, 38.
- NEELI I., KHAN S. N., RADIC M., 2008. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. J. Immunol. 180, 1895-1902.
- NEELI I., DWIVEDI N., KHAN S., RADIC M., 2009. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. J. Innate Immun. 1, 194-201.
- NEL J. G., THERON A. J., POOL R., DURANDT C., TINTINGER G. R., ANDERSON R., 2016. Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease. S. Afr. J. Sci. 112, 36-44. T. H., CHANG S. H., WU M. H., WANG H. C.,
- NG 2013. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. Dev. Comp. Immunol. 41, 644-651.
- NG T. H., WU M. H., CHANG S. H., AOKI T., WANG H. C., 2015. The DNA fibers of shrimp hemo-
- H. C., 2015. The DNA fibers of shrimp hemo-cyte extracellular traps are essential for the clearance of Escherichia coli. Dev. Comp. Im-munol. 48, 229-233.
 OBERMAYER A., STOIBER W., KRAUTGARTNER W. D., KLAPPACHER M., KOFLER B., STEINBACHER P., VITKOV L., GRABCANOVIC-MUSIJA F., STUDNIC-KA M., 2014. New aspects on the structure of

neutrophil extracellular traps from chronic ob-

- orbital curve curve curve of the service of structive pulmonary disease and in vitro generation. PLoS One 9, 1-9.
 O'DONOGHUE A. J., JIN Y., KNUDSEN G. M., PERERA N. C., JENNE D. E., MURPHY J. E., CRAIK C. S., HERMISTON T. W., 2013. Global substrate profiling of protegoes in human neutron strate profiling of proteases in human neutrophil extracellular traps reveals consensus motif predominantly contributed by elastase. PLoŠ One 8, e75141.
- PALIĆ D., ANDREASEN C, B., OSTOJIĆ J., TELL R. M., ROTH J. A., 2007a. Zebrafish (Danio rerio) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. J. Immunol. Meth. 319,87-97.
- Palić D., Ostojić J., Andreasen C. B., Roth J. A., 2007b. Fish cast NETs: neutrophil extracel-India traps are released from fish neutrophils. Dev. Comp. Immunol. 31, 805-816.
 PAPAYANNOPOULOS V., METZLER K. D., HAKKIM A., ZYCHLINSKY A., 2010b. Neutrophil elastase
- and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol. 191,677-691.
- PARKER H., DRAGUNOW M., HAMPTON M. B., KET-TLE A. J., WINTERBOURN C. C., 2012. Require-ments for NADPH oxidase and myeloperoxi-dase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. I bulkes differ depending on the stimulus. J. Leukoc. Biol. 92, 841-849.
- BIOL 92, 041-049.
 PIJANOWSKI L., GOLBACH L., KOLACZKOWSKA E., SCHEER M., VERBURG-VAN KEMENADE B. M., CHADZINSKA M., 2013. Carp neutrophilic gran-ulocytes form extracellular traps via ROS-de-pendent and independent pathways. Fish Shellfish Immunol. 34, 1244-1252.
- PIJANOWSKI L., SCHEER M., VERBURG-VAN KEME-NADE B. M., CHADZINSKA M., 2015a. Production of inflammatory mediators and extracellular traps by carp macrophages and neutrophils in response to lipopolysaccharide and/ or interferon-γ2. Fish Shellfish Immunol. 42, 473-48Ž.
- PIJANOWSKI L., VERBURG-VAN KEMENADE B. M., IR-NAZAROW I., CHADZINSKA M., 2015b. Stress- induced adaptation of neutrophilic granulocyte activity in K and R3 carp lines. Fish Shellfish Immunol. 47, 886-892.
- REDDY V. R., TRUS I., NAUWYNCK H. J., 2017. Presence of DNA extracellular traps but not MUC5AC and MUC5B mucin in mucoid plugs/ casts of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) infected tracheas of chickens. Virus Res. 227,135-142.
- REICHEL M., MUÑOZ-CARO T., SANCHEZ CONTRERAS G., RUBIO GARCÍA A., MAGDOWSKI G., GÄRTNER U., TAUBERT A., HERMOSILLA C., 2015. Har-bour seal (Phoca vitulina)PMN and monocytes release extracellular traps to capture the api-complexan parasite Toxoplasma gonidii. Dev.
- Comp. Immunol. 50, 106-115. REMIJSEN Q., KUIJPERS T. W., WIRAWAN E., LIP-PENS S., VANDENABEELE P., VANDEN BERGHE T., 2011a. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death mo-
- dality. Cell Death Differ. 18, 581-588.
 REMIJSEN Q., VANDEN BERGHE T., WIRAWAN E., ASSELBERGH B., PARTHOENS E., DE RYCKE R., NOPPEN S., DELFORGE M., WILLEMS J., VAN-DENABEELE P., 2011b. Neutrophil extracellular traps cell death requires both autophagy and
- ROBB C. T., DYRYNDA E. A., GRAY R. D., ROSSI A. G., SMITH V. J., 2014. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin

is an ancient defence weapon. Nat. Comm. 5, 4627

- ROGERS D. F., 2007. Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases. Respir. Care 52, 11761193.
- Care 52, 11761193.
 ROHRBACH A. S., SLADE D. J., THOMPSON P. R., MOWEN K. A., 2012. Activation of PAD4 in NET formation. Front Immunol. 3, 360.
 SADIKOT R. T., ZENG H., YULL F. E., LI B., CHENG D. S., KERNODLE D. S., JANSEN E. D., CONTAG C. H., SEGAL B. H., HOLLAND S. M., BLACK-WELL T. S., CHRISTMAN J. W., 2004. p47phox deficiency impairs NF-kappa B activation and host defense in Pseudomonas pneumonia. J. Immunol 172, 1801-1808 Immunol. 172, 1801-1808.
- SAFFARZADEH M., PREISSNER K. T., 2013. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host pro-tection. Curr. Opin. Hematol. 20, 3-9. SAITOH T., KOMANO J., SAITOH Y., MISAWA T.,
- TAKAHAMA M., KOZAKI T., UEHATA T., IWASA-KI H., OMORI H., YAMAOKA S., YAMAMOTO N., AKIRA S., 2012. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. Cell Host Microbe 12, 109-116.
- SCHAUER C., JANKO C., MUNOZ L. E., ZHAO Y., KIENHÖFER D., FREY B., LELL M., MANGER B., RECH J., NASCHBERGER E., HOLMDAHL R., KRENN V., HARRER T., JEREMIC I., BILYY R., SCHETT G., HOFFMANN M., HERRMANN M., 2014. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and
- chemokines. Nat. Med. 20, 511-517. SCHMIDT O., SÖDERHÄLL K., THEOPOLD U., FAYE I., 2010. Role of adhesion in arthropod immune recognition. Annu. Rev. Entomol. 55, 485-504.
- SÖDERHÄLL K., 2010. Invertebrate immunity. Advances in experimental medicine and biology. Springer Science+Business Media, LLC, New York.
- SILVA L. M., MUÑOZ-CARO T., BURGOS R. A., HI-DALGO M. A., TAUBERT A., HERMOSILLA C., 2016. Far beyond phagocytosis: phagocyte-de-rived extracellular traps act efficiently against protozoan parasites in vitro and in vivo. Mediators Inflamm. 2016, 5898074.
- TRAN T. M., MACINTYRE A., HAWES M., ALLEN C., 2016. Escaping underground NETs: extracellular DNases degrade plant extracellular traps and contribute to virulence of the plant patho-
- ana contribute to virulence of the plant patho-genic bacterium Ralstonia solanacearum. PLoS Pathog. 12, e1005686. URBAN C. F., ERMERT D., SCHMID M., ABU-ABED U., GOOSMANN C., NACKEN W., BRINKMANN V., JUNGBLUT P. R., ZYCHLINSKY A., 2009. Neutro-phil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host de-fense against Candida albicans. PLoS Pathog fense against Candida albicans. PLoS Pathog. 5,e1000639.
- VERSCHURE P. J., VAN DER KRAAN I., DE LEEUW W., VAN DER VLAG J., CARPENTER A. E., BEL-MONT A. S., VAN DRIEL R., 2005. In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation. Mol. Cell Biol. 25, 4552-4564.
- VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE M., GOLDMANN O., THU-LIN P., HEINEMANN K., NORRBY-TEGLUND A., ROHDE M., MEDINA E., 2008. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. Blood 111, 3070-3080.
- WANG Y., WYSOCKA J., SAYEGH J., LEE Y. H., PER-LIN J. R., LEONELLI L., SONBUCHNER L. S., MC-DONALD C. H., COOK R. G., DOU Y., ROEDER

R. G., Clarke S., Stallcup M. R., Allis C. D., Coonrod S. A., 2004. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination. Science 306, 279-283.

- WANG Y., LI M., STADLER S., CORRELL S., LI P., WANG D., HAYAMA R., LEONELLI L., HAN H., GRIGORYEV S. A., ALLIS C. D., COONROD S. A., 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. J. Cell Biol. 184, 205-213.
- RTHA F., BEITER K., NORMARK S., HEN-RIQUES-NORMARK B., 2007. Neutrophil extracel-lular traps: casting the NET over pathogenesis. WARTHA F.,
- Curr. Opin. Microbiol. 10, 52-56. Wen F., White G. J., VANETTEN H. D., XIONG Z., WEN F., WHITE G. J., VANETTEN H. D., XIONG Z., HAWES M. C., 2009. Extracellular DNA is re-quired for root tip resistance to fungal infec-tion. Plant Physiol. 151, 820-829.
 WILKIE R. P., VISSERS M. C., DRAGUNOW M., HAMP-TON M. B., 2007. A functional NADPH oxidase

prevents caspase involvement in the clearance of phagocytic neutrophils. Infect. Immun. 75, 3256-3263.

- Yousefi S., Gold J. A., Andinaetal N., 2008. Catapult-like release of mitochondria DNA by eosinophils contributes to antibacterial de-
- fense. Nat. Med. 14, 949-953. YOUSEFI S., MIHALACHE C., KOZLOWSKI E., SCHMID I., SIMON H. U., 2009. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil ex-tracellular traps. Cell Death Differ. 16,1438-1444.
- ZHANG X., SOLDATI T., 2016. Of amoebae and men: extracellular DNA traps as an ancient cell-intrinsic defense mechanism. Front. Immunol. 7, 269.
- ZHANG X., ZHUCHENKO O., KUSPA A., SOLDATI T., 2016. Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. Nat. Comm. 7, 10938.

KOSMOS Vol. 66, 4, 703-719, 2017

ŁUKASZ PIJANOWSKI, JOANNA HOMA, MAGDALENA CHADZIŃSKA

Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Kraków, E-mail: magdalena.chadzinska@uj.edu.pl

EXTRACELLULAR TRAPS - GENERAL MECHANISMS OF PATHOGEN ELIMINATION IN ANIMAL (AND PLANT ?) KINGDOM

Summary

Extracellular traps (ETs) are an evolutionary old mechanism of defense that functions both in higher vertebrates including mammals, lower vertebrates such as fish, in invertebrates and most probably in plants. ET structures immobilize pathogens, protect the body from their spread and possibly lead to the death of some of them. Traps formation in mammalian leukocytes is a complex process involving several molecular pathways and signaling molecules, such as reactive oxygen species (ROS), Ca2+, or protein kinases. Most probably ET formation in immunocompetent cells of non-mamalian species is subjected to similar regulations. In most cases, both in vertebrates and invertebrates, NADPH oxidase activity and consequently ROS production play an important role in this process. ET defense strategy is based on the activity of their specific components such as DNA, histones and bactericidal proteins e.g. different types of proteases. The exact composition of these structures may be slightly different in organisms belonging to different taxa, as well as depends on the type of immunocompetent cells producing the traps.

Key words: DNA, ET, extracellular traps, histones, leukocytes