

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAP - DEFINITION, MOLECULAR MECHANISMS

Sheniz Yuzeir-Salieva

Clinic of Hematology, Medical University in Varna, Bulgaria, shenizyuzeir@abv.bg

Abstract: Innate immunity constitutes the body's primary defense against invading pathogens and plays a crucial role in guiding adaptive immunity during persistent infections. Neutrophils employ three primary mechanisms to directly combat microorganisms: phagocytosis, degranulation, and the generation of neutrophil extracellular traps (NETs). Neutrophil extracellular traps (NETs) are intricate fibrous structures released by neutrophils in response to specific stimuli. These structures are composed of depolymerized chromatin adorned with histones, neutrophil granule proteins, including primary granules (neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), cathepsin G), secondary granules (lactoferrin and pentraxin 3), tertiary granules (matrix metalloproteinase - MMP), cytoplasmic components (calprotectin, catalase) and other enzymatically active proteases and peptides that have procoagulant properties. NETs are formed via two distinct pathways known as suicidal NETosis, which involves NADPH oxidase (NOX), and vital NETosis, which is independent of NOX. Three primary forms of NET release have been identified: suicidal NETosis, vital NETosis, and mitochondrial NETosis. Certain proteins found within NETs exhibit strong cytotoxic effects against both pathogens and nearby host cells. While NETs play a vital role in trapping and eliminating pathogens, pathogens have developed strategies to evade immune responses, prompting neutrophils to initiate more aggressive reactions. The excessive activation of NETs and the consequent pro-inflammatory response can result in severe tissue damage. The extremely important role of NETs in tumor biology, carcinogenesis and metastasis processes has been proven. Conclusion: This review summarises the current knowledge of neutrophils and NETs, the mechanisms that lead to the formation of NETs and significant implications in a wide range of diseases. The identification of NETs and the characterization of their role in disease have revived the overlooked role of neutrophils in disease pathogenesis..

Keywords: NETs, neutrophils, proteins

НЕУТРОФИЛНИ ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНИ КАПАНИ- ДЕФИНИЦИЯ, МОЛЕКУЛЯРНИ МЕХАНИЗМИ

Шениз Юзеир-Салиева

Клиника по Хематология, УМБАЛ “Света Марина“, Медицински университет, Варна, България, shenizyuzeir@abv.bg

Резюме: Вроденият имунитет представлява основната защитна реакция на организма срещу нахлуващите патогени и играе ключова роля в насочването на адаптивния имунитет по време на персистиращи инфекции. Неутрофилите използват три основни механизма за директна борба с микроорганизмите: фагоцитоза, дегранулация и генериране на неутрофилни извънклетъчни капани (NETs). Неутрофилните извънклетъчни капани (NETs) са сложни влакнести структури, освобождавани от неутрофилите в отговор на специфични стимули. Тези структури са съставени от деполимеризиран хроматин, с хистони, неутрофилни гранулни протеини, включващи първични гранули (неутрофилна еластаза (NE), миелопероксидаза (MPO), катепсин G), вторични гранули (лактоферин и пентраксин 3), третични гранули (матрична металлопротеиназа - MMP), цитоплазмени компоненти (калпротектин, каталаза) и други ензимно- активни протеази и пептиди, които имат прокоагулантни свойства. Идентифицирани са три основни форми на освобождаване на NETs:суицидна NETosis, която включва NADPH оксидаза (NOX), витална NETosis, която е независима от NOX и митохондриална форма. Някои протеини, описани в образуването на NETs, проявяват силни цитотоксични ефекти както срещу патогени, така и срещу близките клетки гостоприемници. Въпреки че неутрофилните екстрацелуларни капани (NET) играят жизненоважна роля в улавянето и елиминирането на патогените, те са разработили стратегии за избягване на имунните отговори, което иницира по-агресивни реакции на възпаление. Прекомерното активиране на NETs и последващият възпалителен отговор могат да доведат до тежко увреждане на тъкани. Доказана е изключително важната роля на NETs в туморната биология, канцерогенеза и процесите на метастазирание.

Заключение: Този обзор обобщава съвременните познания за неутрофилите и механизмите за образуване на неутрофилните екстрацелуларни капани (NETs), както и значимите им последици при широк спектър от

заболявания. Идентифицирането на NETs и характеризирането на тяхната роля в развитието на заболяванията определиха незаменимата роля на неутрофилите в патогенезата на заболяванията.

Ключови думи: NETs, неутрофили, протеини

1. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години вниманието на изследователските групи се акцентира върху новотритите функции на неутрофилите, потвърждаващи тяхната значима роля не само като участници във възпалителни процеси, но и при редица патологични състояния, включително неопластични заболявания и тромботични процеси.

Неутрофилите, като вродени медиатори на имунната защита, играят важна роля при различни възпалителни процеси (Amulic et al, 2012). Проучванията върху съдържанието на неутрофилните гранули разкриха богатството от ензими и макромолекули, функциониращи в различните клетъчни отнасяния на гранулоцитите (Mocsai, 2010). Богатото съдържание на ензими отразява активното участие на неутрофилните гранулоцити в защитните възпалителни реакции спрямо бактерии, фунги и в по-малка степен срещу други инфекции.

Неутрофилите използват както вътреклетъчни, така и извънклетъчни механизми за ограничаване на инфекциозните процеси. В допълнение към фагоцитозата и дегранулацията, наскоро беше установено, че неутрофилите използват допълнителна стратегия, за да ограничат инфекциозните процеси чрез осъществяване на неутрофилни екстрацелуларни капани (NETs) (Eichelberge et al, 2020).

През далечната 1996 г. Takei и сътрудници за първи описват този феномен, който по-късно детайлно е разработен и формулиран от Arturo Zychlinsky (Takei et al, 1996). През 2004 г. група учени под ръководството на Brinkman доказват, че стимулирането на неутрофилите с интерлевкин-8 (IL8), липополизахариди (LPS), интерферон- α и комплемент 5a води до образуването на неизвестни дотогава структури, които бяха наречени неутрофилни извънклетъчни капани (Brinkmann et al, 2004).

2. НЕУТРОФИЛНИ ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНИ КАПАНИ (NETs)

Неутрофилните екстрацелуларни капани са съставени от ДНК (дезоксирибонуклеинова киселина), в комплекс с хистони, неутрофилни гранулирани протеини, включващи първични гранули, (неутрофилна еластаза (NE), миелопероксидаза (MPO), катепсин G), вторични гранули (лактоферин и пентраксин 3), третични гранули (матрична металопроотеиназа - MMP), цитоплазмени компоненти (калпротектин, каталаза) и други ензимно активни протеази и пептиди, които имат прокоагулантни свойства (Mantovani et al, 2011). При наблюдение под електронен микроскоп последните наподобяват на линейарни структури с диаметър 15-17 nm, обвити от глобулирани елементи с диаметър до 25nm (Jorch et al, 2017).

Формирането на NETs може да се активира от различни патогени, като бактерии, гъбички, протозои, вируси, компоненти на бактериалната клетъчна стена – липополизахариди (LPS), антитела, имунни комплекси, цитокини, хемокини (IL 8, TNF), микрокристали и други физиологични стимули (Yousefi et al, 2020).

През последното десетилетие бяха разкрити все по-голям брой стимулиращи фактори, които предизвикат образуването на неутрофилни екстрацелуларни капани *in vivo* и *in vitro*. Значима роля като стимулиращи фактори *in vivo* имат микробиологични причинители - бактерии и гъбички, при които неутрофилите остават продължително време активни и функционални (Sollberger et al, 2018, Rada et al, 2019). При *in vitro* условия стимулиращи фактори, като IL-8, форбол-миристат ацетат, липополизахариди, вътреклетъчен поток от калциеви йони и активирани тромбоцити, водят до клетъчна смърт на неутрофилите (Gonzalez-Aparicio et al, 2019; Ravindran et al, 2019).

3. МОЛЕКУЛЯРНИ МЕХАНИЗМИ НА ОБРАЗУВАНЕ НА НЕУТРОФИЛНИ ИЗВЪНКЛЕТЪЧНИ КАПАНИ (NETs)

Молекулярните механизми, водещи до образуване на NETs все още не са напълно изяснени. Според последни литературни данни отделянето на NETs в извънклетъчното пространство зависи от генериране на реактивни кислородни видове по два механизма: ROS зависима NADPH оксидаза и митохондриална ROS (mROS), независима от NADPH оксидаза.

Първият молекулярен механизъм за образуване на NETs е производството на ROS от NADPH оксидазата. Този процес се осъществява чрез активиране на NADPH оксидазата, както и чрез включване на допълнителни сигнални пътища, които медиат различни форми на NETosis (Douda et al, 2015). Ключовият момент е активирането на пътя на протеин-киназа C (PKC), който води до сглобяване на NOX 2 комплекс във фагозомната мембрана, с последващ електронен транспорт и образуване на H₂O₂, който е мощен индуктор за генерирането на NETs (Brinkmann et al, 2007).

Вторият механизъм е свързан с генериране на реактивни кислородни видове от митохондриите, които са основни източници на ROS. Все още не е напълно изяснен точният начин за образуването на NETs, но продължават обстояните проучвания в тази област. Една от съществуващите хипотези включва активното участие на „Lup киназа“, спадаща към семейството на Src киназите, която стимулира РКС чрез фосфорилиране на тирозинови остатъци и стимулира генерирането на ROS (Steinberg, 2015). Друга хипотеза включва участието на дисулфид изомеразата протеин с р47 субединица, която води до транслокацията му към клетъчната мембрана, с последващо сглобяване на NADPH оксидазата (Trevelin et al, 2015).

Клетъчният метаболизъм има основен принос при активирането на неутрофилите (O'Neill et al, 2016). За своите метаболитни нужди те разчитат главно на гликолизата, което им позволява да се адаптират към силно хипоксемични условия (Rodríguez-Espinosa et al, 2015). Освен това е доказано, че пентозо-фосфат дехидрогеназният метаболитен път е важен за освобождаването на NETs, поради активното участие на един от метаболитите глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа в образуването на NADPH оксидаза-2 с NADPH, за да се произведе ефективно количество ROS и по този начин да се генерират повече NETs (Doolin et.al,2020). Процесът на генериране на неутрофилни екстрацелуларни капани (NETs) се нарича NETosis- нова програма за клетъчна смърт.

4. ФОРМИ НА NETOSIS

През 2012 г. за първи път понятието NETosis се включва в първата ревизирана стройна класификация за клетъчна смърт, където се приема като специфична нейна форма, различна от апоптозата, некроптозата, пироптоза, автофагия и вторична некроза.

През 2018 г. Комитетът по номенклатура на клетъчна смърт (NCCD) допълни класификацията от 2012г., като терминът „NETosis“ да бъде заменен с „NETs“ или „NETs образуване“, наблягайки по този начин върху патофизиологичната и молекулярната същност на ефекторните клетки (Raup-Konsavage et al,2018). Терминът NETosis се използва, когато тези екстрацелуларни капани (Ets) се произвеждат само от неутрофили (NETs).

Идентифицирани са три форми на нетоза: класическа, витална и митохондриална форма.

Класическата или суицидна NETosis е терминът, използван за освобождаването на NETs от мъртви клетки. Повечето публикации описват освобождаването на NETs като форма на индуцирана от патогени активна клетъчна смърт, даваща възможност за адекватен вътреклетъчен отговор на неутрофилите към различни инфекциозни агенти.

Класическата NETosis често се иницира чрез свързване на лиганд с неутрофилни рецептори и рецептори за Fc на IgG, комплемент или цитокини (Munks et al, 2010). Активирането на тези рецептори стимулира освобождаването на калциеви йони от ендоплазмения ретикулум в цитоплазмата. Повишените нива на цитоплазмения калций увеличават активността на протеин киназа C и фосфорилирането на gp91phox (Kaplan et al, 2012). Това индуцира сглобяването на цитозолните и мембранно свързани субединици на NADPH оксидаза във функционални комплекси в цитоплазмените или фагозомните мембрани (наричани още фагоцитна оксидаза, PHOX) и последващото генериране на ROS. Под влияние на ROS се разрушава ядрената мембрана, смесват се ядрени и гранулирани компоненти, освобождават се компоненти от неутрофилните гранули в цитозола - NE и MPO, с последваща модификация на хистоните под влияние на PAD-4 и декондензация на хроматина (Pingxin et al, 2010). Разкъсването на плазмената мембрана води до освобождаването на NETs, с последваща клетъчна смърт и пълна загуба на жизнеспособни клетъчни функции като миграция и фагоцитоза (Papaannopoulos et al, 2010).

Освен описаната по-горе класическа NETosis, съществува и друга форма, при която неутрофилите запазват своята жизнеспособност и естествените си ефекторни функции, наречена Vital NETosis (Yousefi et al, 2008; Yousefi et al, 2009), така наречената витална нетоза.

Наблюдавано е, че човешките неутрофили освобождават митохондриална ДНК от NETs в рамките на 5 минути след среща със *S. aureus*, процес, който разчита на митохондриален комплекс II (Dunham-Snary et.al, 2022). Някои изследователи класифицират митохондриалната форма на освобождаване на NETs, като жизненоважна NETs, тъй като те се освобождават от живи клетки, без да предизвикват лизогенна клетъчна смърт. Освобождаването на митохондриални NETs, които съдържат митохондриални ДНК-свързващи гранулни протеини, се регулира от митохондриални ROS и калций-активирани калиеви канали с малка проводимост (Lood et.al, 2016). Освен това, наскоро беше доказано, че Сиртуин 1 (SIRT1), ензим, разположен предимно в клетъчното ядро, който деацетилира транскрипционни фактори, играе роля в тумор-асоцираните стареещи неутрофили, като насърчава отварянето на каналите на митохондриалните пори за освобождаване на митохондриални NETs (Yang et.al,2021).

NETs са в тясна връзка с туморните клетки *in vivo* и вътре в туморната васкулатура, но тяхната роля в туморната биология все още е обект на дискусии. Директното взаимодействие на раковите клетки с NETs потиска апоптозата и благоприятства процесите на клетъчна преживяемост, пролиферация и прогресия на туморната маса (Wculek et al, 2015; Tohme et al, 2016). Тези данни подкрепят потенциална про-метастатична роля на NETs, участващи в ранната клетъчна адхезия, пролиферация, туморна инвазия и ангиогенеза. От събраните литературни данни става ясно, че формирането на неутрофилни екстрацелуларни капани имат съществена роля в модулирането на различни взаимосвързани процеси, необходими за поддържане на вътреклетъчния баланс

5.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неоспорима е ролята на NETs в туморната биология, която те играят чрез модулиране процесите на клетъчна пролиферация, диференциация и метастазиране. Все още остават не докрай изяснени специфичните механизми на NETs и кръстосаните взаимодействия между NETs с други процеси, свързани с рака, включително инфламазоми и автофагия. Очаква се бъдещото внедряване на NETs в клиничната практика и превръщането му в потенциален терапевтичен таргет в борбата срещу малигнените заболявания.

БИБЛИОГРАФИЯ:

- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, et al.(2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu RevImmunol.* 30:459-489
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al.(2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532–1535.
- Doolin T., Amir H.M., Duong L., Rosenzweig R., Urban L.A., Bosch M., Pol A., Gross S.P., Siryaporn A(2020). Mammalian histones facilitate antimicrobial synergy by disrupting the bacterial proton gradient and chromosome organization. *Nat. Commun.* 11:3888. doi: 10.1038/s41467-020-17699-z.
- Dunham-Snary K.J., Surewaard B.G., Mewburn J.D., Bentley R.E., Martin A.Y., Jones O., Al-Qazazi R., Lima P.A., Kubes P., Archer S.L.(2022). Mitochondria in human neutrophils mediate killing of *Staphylococcus aureus*. *Redox Biol.* 49:102225. doi: 10.1016/j.redox.2021.102225.
- Eichelberge K. R.and Goldman W. E.(2020). Manipulating Neutrophil Degranulation as a Bacterial Virulence Strategy. *Plos Pathog.*2020;16(12):e1009054. doi: 10.1371/journal.ppat.1009054.
- Gonzalez-Aparicio M and Alfaro C.(2019). Influence of Interleukin-8 and Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation in the Tumor Microenvironment: Is There a Pathogenic Role? *J Immunol Res.* 2019:6252138. doi: 10.1155/2019/6252138.
- Jorch SK, Kubes P. (2017).An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med.*23:279–87
- Kaplan MJ, Marko R.(2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* 189(6):2689–95. doi:10.4049/jimmunol.1201719
- Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C., De Ravin S.S., Smith C.K., Malech H.L., Ledbetter J.A., Elkon K.B., Kaplan M.J.(2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* 22:146–153. doi: 10.1038/nm.4027
- Mantovani, M. A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon (2011).“Neutrophils in the activation and regulation of innate andadaptive immunity,”*Nature Reviews Immunology* vol. 11, no. 8,pp.519–531.
- Mocsai A.(2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.*210(7): 1283-1299
- Munks MW, McKee AS, Macleod MK, Powell RL, Degen JL, Reisdorph NA, et al. (2010). Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps *in vivo*. *Blood.*116(24):5191–9. doi:10.1182/blood-2010-03-275529
- O’Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. (2016).A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol.* 16(9):553–65. doi:10.1038/nri.2016.70.
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A.(2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 191(3):677–91. doi:10.1083/jcb.201006052.
- Rada B.(2019). Neutrophil Extracellular Traps. *Methods Mol Biol.*1982:517–28. doi: 10.1007/978-1-4939-9424-3_31.
- Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N.(2019). Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules.* 9:365.

- Rodríguez-Espinosa O, Rojas-Espinosa O, Moreno-Altamirano MMB, López-Villegas EO, Sánchez-García FJ.(2015). Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology* . 145(2):213–24. doi:10.1111/imm.12437
- Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A.(2018). Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev Cell*. 44:542–53. doi: 10.1016/j.devcel.2018.01.019.
- Steinberg, S. F.(2015). Mechanisms for redox regulation of protein kinase C, *Front. Pharmacol.* 6, 128,doi: 10.3389/fphar.2015.00128.
- Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al(2016)..Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res.*76(6):1367–80. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1591.
- Trevelin S. C and Lopes L. R.(2015).Protein disulfide isomerase and Nox: new partners in redox signaling, *Curr. Pharm.Des.* 21: 5951-5963, doi:10.2174/1381612821666151029112523
- Wculek SK, Malanchi I. (2015).Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*. 528(7582):413–7. doi:10.1038/nature16140.
- Yang C., Wang Z., Li L., Zhang Z., Jin X., Wu P., Sun S., Pan J., Su K., Jia F., et al. (2021).Aged neutrophils form mitochondria-dependent vital NETs to promote breast cancer lung metastasis. *J. Immunother. Cancer.*;9:e002875. doi: 10.1136/jitc-2021-002875
- Yousefi S, Simon D, Stojkov D, Karsonova A, Karaulov A and Simon H. U.(2020). In vivo evidence for extracellular DNA trap formation, *Cell Death Dis.* 11, 300.
- Yousefi S, Gold J. A, Andina N, Lee J. J, Kelly A. M. et al.(2008).Catapultlike release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense, *Nat. Med.* 14: 949-953. doi: 10.1038/nm.1855.
- Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I and Simon H. U. (2009).Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps, *Cell Death Dis.* 16: 1438-1444. doi: 10.1038/cdd.2009.96.