

Magdalena Kakareko<sup>1(A,B,C,D,E,F,G)</sup>, Ewa Jabłońska<sup>1(A,D,G)</sup>, Jakub Jabłoński<sup>2(C,D)</sup>,  
Wioletta Ratajczak-Wrona<sup>1(D)</sup>

## Wpływ rhIL-17 na ekspresję TLR2 i białek apoptotycznych w ludzkich neutrofilach

### Effect of rhIL-17 on the expression of TLR2 and apoptotic proteins in human neutrophils

<sup>1</sup> Z Zakładu Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

<sup>2</sup> Z Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

#### STRESZCZENIE

**Wstęp.** Apoptoza neutrofilów (PMN) zachodzi z udziałem białek rodziny Bcl-2, które kontrolują przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej. Białka tej rodziny podlegają regulacji przez różne czynniki, m.in. cytokiny. Wcześniejsze obserwacje własne wskazują na relację między nasileniem apoptozy a ekspresją receptora TLR2 w komórkach stymulowanych IL-17.

**Celem** zaplanowanych badań było zbadanie wpływu rhIL-17 na wybrane białka rodziny Bcl-2 szlaku wewnątrzkomórkowego, takich jak: proapoptotyczne białko Bax i antyapoptotyczne białko Mcl-1 w relacji do ekspresji receptora TLR2. Odniesieniem do analizowanych wyników było zbadanie wpływu fMLP na oceniane parametry.

**Materiał i metoda.** Badania przeprowadzono na izolowanych z krwi obwodowej ludzkich PMN. Apoptozę oceniano metodą cytometrii przepływowej, natomiast ekspresję TLR2, Bax oraz Mcl-1 oznaczano metodą Western blot.

**Wyniki i wnioski.** Uzyskane wyniki wykazały, że nasiloną apoptozą neutrofilów zależy w sposób bezpośredni od wpływu rhIL-17 na badane białka szlaku wewnętrznego i prawdopodobnie w sposób zależny od receptora TLR2. Obserwowane zmiany ekspresji Bax zarówno pod wpływem fMLP, jak i rhIL-17 podkreślają istotną rolę tego białka w regulacji apoptozy neutrofilów.

**Słowa kluczowe:** PMN, rhIL-17, Bax, Mcl-1, TLR2

#### ABSTRACT

**Introduction.** Neutrophils (PMNs) apoptosis occurs involving proteins of the Bcl-2 family, which control the permeability of the outer mitochondrial membrane. Proteins of this family are regulated by various factors, among others cytokine. Early observations of their own show the relationship between increased apoptosis and expression of Toll-like receptor (TLR2) in these cells stimulated by IL-17.

**The aim** of the planned study was to investigate the effect of rhIL-17 on selected proteins of the Bcl-2 family, such as: the proapoptotic Bax protein and antiapoptotic Mcl-1 protein in relation to the expression of TLR2 receptor. Reference to the analysed results was to investigate the influence of fMLP on estimated parameters.

**Material and method.** The study was conducted on human PMN isolated from peripheral blood. Apoptosis was assessed by cytometry, and the expression of TLR2, Bax, and Mcl-1 was estimated by Western blot.

**The results and conclusions.** The results have shown that the enhancement of neutrophils intense apoptosis depends directly from the effect of rhIL-17 and probably indirectly on TLR2 receptor. The observed changes in the expression of Bax both under the influence of fMLP and rhIL-17 stress the important role of this protein in regulating neutrophils apoptosis.

**Keywords:** PMN, rhIL-17, Bax, Mcl-1, TLR2

## Wstęp

Apoptoza neutrofilów jest aktywnym, uporządkowanym procesem pozwalającym utrzymać prawidłową liczbę tych komórek w organizmie. Programowana śmierć neutrofilów może zachodzić na drodze zewnątrzkomórkowej zależnej od receptorów nadrodziny TNF lub wewnątrzkomórkowej, zależnej od mitochondrium [1]. Wewnątrzkomórkowy szlak apoptozy neutrofilów jest regulowany przez białka rodziny Bcl-2, działające antyapoptotycznie, takie jak Mcl-1, Bcl-xL i A1 oraz białka działające proapoptotycznie, takie jak Bax i Bad [1,2]. Równowaga pomiędzy nimi jest jednym z istotnych elementów homeostazy tych komórek.

Białka rodziny Bcl-2 kontrolują przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrium, m.in. przez wpływ na otwieranie lub zamykanie kanału VDAC (kanał anionowy zależny od napięcia). Sygnał indukujący przepuszczalność błony mitochondrialnej powoduje zarówno cytozolowy Bax, jak i Bax znajdujący się przy błonie mitochondrialnej. Białko to ulega homooligomeryzacji i jako multimer zostaje wprowadzone w zewnętrzną błonę mitochondrialną. Oligomeryzację Bax wywołuje inne proapoptotyczne białko Bid, które wcześniej zostaje rozszczepione przez kaspazę 8 lub kaspazę 10 do postaci „skróconej” (t-Bid). Po interakcji z t-Bid, Bax zmienia potencjał błonowy mitochondrium, powodując uwalnianie cytochromu c oraz innych białek apoptogennych, takich jak: Smac/DIABLO, proteaza serynowa HtrA2/Omi oraz prowadzi do aktywacji kaspazy 9 i kolejnych kaspaz efektorowych [2,3].

Badania wielu autorów wykazały w neutrofilach silną ekspresję białka Bax oraz niską Mcl-1 ocenianych w warunkach fizjologii. Zróżnicowana ekspresja tych białek, jak również długi okres półtrwania proapoptotycznego białka Bax i krótki antyapoptotycznego białka Mcl-1 mogą być przyczyną krótkiego czasu życia tych komórek [4]. Ponadto, obecność w mikrokrążeniu czynników wewnętrznych, takich jak cytokiny może wpływać na stan równowagi między białkami pro- i antyapoptotycznymi rodziny Bcl-2, a tym samym regulować apoptozę neutrofilów. Większość cytokin powoduje opóźnienie apoptozy neutrofilów, natomiast prozapalnie działająca IL-17 nasila ich apoptozę [5,6]. Wcześniejsze badania własne również wykazały, że cytokina ta zwiększa liczbę neutrofilów apoptotycznych [7]. Jednocześnie zaobserwowano związek pomiędzy zwiększoną apoptozą tych komórek a nasiloną ekspresją receptora Toll like typu 2 (TLR2). Receptor ten pełni niezwykle ważną rolę w rozpoznaniu bakteryjnych lipoprotein (BLPs), po związaniu których prowadzi do pobudzenia neutrofilów poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych [8]. Ponadto wykazano, że TLR2 posiada domenę śmierci FADD, która uczestniczy w procesie pobudzenia apoptozy komórek na drodze zewnętrznej [7,8].

Biorąc pod uwagę fakt, iż rhIL-17 odgrywa ważną rolę w regulacji apoptozy neutrofilów celem podjętych

## Introduction

Neutrophil apoptosis is an active, orderly process allowing to maintain a proper number of cells in an organism. Neutrophils' programmed death may occur in an extracellular way dependent on the superfamily TNF receptors, or in an intracellular mitochondrion - dependent way [1]. Intracellular neutrophil apoptosis pathway is regulated by the Bcl-2 family of proteins which have an antiapoptotic activity, such as Mcl-1, Bcl-xL and A1, as well as by the proteins which have a proapoptotic activity, such as Bax and Bad [1,2]. The equilibrium between them is one of the essential elements of the cell homeostasis.

The Bcl-2 family of proteins control the mitochondrial outer membrane permeability by, among others, influencing the opening and closing of VDAC channel (voltage-dependent anion channel). The signal which induces the mitochondrial membrane permeability is caused both by cytosol Bax and by the mitochondrial membrane Bax. The protein undergoes homooligomerization and as a multimer it is inserted into the mitochondrial outer membrane. Bax oligomerization is induced by another proapoptotic protein, such as Bid, which is earlier cleaved by caspase-8 or caspase-10 into its "shortened" form (t-Bid). After its interaction with t-Bid, Bax changes mitochondrial membrane potential, causing the release of cytochrome c and other apoptogenic proteins, such as: Smac/DIABLO, serine protease HtrA2/Omi and results in the activation of caspase-9 and successive effector caspases [2,3].

The research of many authors has revealed that there is a strong expression of Bax and a low of Mcl-1 proteins in neutrophils, estimated in the conditions of physiology.

The differentiated expression of these proteins, as well as a long period of semi-duration of Bax – a proapoptotic protein, and a short one of Mcl-1 an antiapoptotic protein, may be the cause of a short lifespan of these cells [4]. Moreover, the occurrence of intrinsic factors in microcirculation, such as cytokines, may influence the state of balance between proapoptotic and antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family, and thus regulate neutrophil apoptosis. The majority of cytokines result in a delay of neutrophils' apoptosis, whereas IL-17 with its proinflammatory activity intensifies their apoptosis [5,6]. The previous research of the authors of the study has also shown that this cytokine increases the number of apoptotic neutrophils [7]. And simultaneously, a relationship between the cells' increased apoptosis and an intensified expression of Toll-like receptor 2 (TLR2) has been observed. This receptor plays an extremely important role in the bacterial lipoproteins' recognition (BLPs), and after their binding it results in neutrophils' stimulation by the activation of transcription factors [8]. Moreover, it has been shown that TLR2 possesses FADD death domain, which participates in the cell apoptosis stimulation process in an external way [7,8].

badania była ocena wpływu tej cytokiny na wybrane białka rodziny Bcl-2 szlaku wewnątrzkomórkowego, takich jak: proapoptyczne białko Bax i antyapoptyczne białko Mcl-1 w relacji do ekspresji receptora TLR2.

### **Materiał i metoda**

Badaniem objęto 20 zdrowych osób dobrowolnych dawców krwi w wieku od 22 do 40 lat (średnia 34 lat). PMN były izolowane z krwi obwodowej przy użyciu Gradisolu G – 1,115g/ml wg Zemana i wsp. [9]. Zawiesina granulocytów zawierała średnio ok. 95% neutrofilów, co oceniano w preparatach barwionych metodą May-Grünwalda-Giemsy. Żywotność komórek była oceniana błękitem trypanu i wynosiła średnio 98%. Komórki o stężeniu  $5 \times 10^6$  kom/ml zawieszano w podłożu hodowlanym (RPMI-1640, 10% surowica własna, 10 U/ml penicylina, 50 ng/ml streptomycyna) i inkubowano w mikropłytkach w temperaturze 37°C, w inkubatorze z przepływem 5% CO<sub>2</sub> (NUAIRE™) przez 4 i 20 godzin. Do stymulacji komórek zastosowano: fMLP (N-formylo-metionylo-leucylofenyloalanina) (50 ng/ml), rhIL-17 (50 ng/ml) oraz anti-IL-17A (1:1000).

### **Apoptoza**

Apoptozę neutrofilów oceniano metodą cytometrii przepływowej z użyciem Annexyny V i jodku propidyny (PI) bezpośrednio po izolacji, jak i po 4 i 20 godzinach. Neutrofile zawieszono w buforze (10 mM HEPES/NaOH, pH7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) i dodano 5 µl Annexin-V FITC i 10 µl Propidium Iodide Buffer. Komórki inkubowano przez 15 minut w ciemności w temp. pokojowej i poddano analizie fluorymetrycznej na cytometrze przepływowym Coulter Elite FACSCAN (Francja) zaopatrzonego w filtry (488 nm ekscytacji i 530 nm emisji) dla stosowanych barwników. Wyniki przedstawiono jako odsetek komórek o cechach apoptotycznych.

Annexyna V (Annexin V-FITC) związana chemicznie z tioizocyjaninem wiąże się specyficznie z fosfatydyloseryną i umożliwia detekcję wczesnych etapów apoptozy. Dodanie do mieszaniny inkubacyjnej jodku propidyny (PI) pozwala jednocześnie badać integralność błony komórkowej. PI wnika do wnętrza komórki, wiąże się z kwasami nukleinowymi i po wzbudzeniu w świetle niebieskim ( $\lambda = 420$  nm) świeci na czerwono-pomarańczowo.

### **Western blot**

Po usunięciu nadsączy z hodowli PMN zawiesiny komórkowe płukano schłodzonym PBS-em, zawieszano w TRIS-Cl pH 7,5 a następnie poddawano lizie przez sonifikację. W homogenatach komórkowych oznaczano białko metodą Lowry'ego. Uzyskany materiał zawieszano w buforze Laemli'ego. Cytoplazmatyczną frakcję białek poddawano elektroforezie w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE). Miejsca niespecyficzenie wiążące blokowano

Taking into account the fact that rhIL-17 plays a key role in neutrophil apoptosis regulation, the purpose of the conducted study was to assess the influence of this cytokine on the selected proteins of the Bcl-2 family of the intracellular pathway, such as: Bax – a proapoptotic protein and Mcl-1 an antiapoptotic protein in relation to the expression of TLR2 receptor.

### **Material and method**

The studies were carried out on 20 healthy subjects, voluntary blood donors, from 20 to 40 years of age (the mean age 34). PMNs were isolated from peripheral blood using Gradisol G – 1,115g/ml according to Zeman and co-authors [9]. The granulocyte suspension contained about 95% of neutrophils, which was assessed in preparations stained according to May Grünwald-Giemsa method. The cell viability was assessed by trypan blue staining and it amounted to 98% on average. The cells with the concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml were suspended in the culture medium (RPMI-1640, 10% own serum, 10U/ml penicillin, 50 ng/ml streptomycin) and were incubated in microplaques at 37°C, in an incubator with the flow of 5% CO<sub>2</sub> (NUAIRE™) for 4 to 20 hours. To stimulate the cells fMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine) (50 ng/ml), rhIL-17 (50 ng/ml) and anti-IL-17A (1:1000) were applied.

### **Apoptosis**

Neutrophils' apoptosis was assessed by the flow cytometry method using Annexin V and Propidium Iodide (PI) directly after isolation, as well as after 4 to 20 hours. Neutrophils were suspended in the buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) and 5 µl Annexin-V FITC and 10 µl Propidium Iodide Buffer were added.

The cells were incubated for 15 minutes in the darkness at room temperature, and fluorometric analysis was applied using the Coulter Elite FACSCAN flow cytometer (France) equipped with the filters (excitation 488 nm and emission 530) for the used dyes.

The results were shown as the percentage of cells with apoptotic features.

Annexin V – FITC chemically bound with thioisocyanate, binds specifically with phosphatidylserine and enables the detection of early stages of apoptosis. The addition of Propidium Iodide (PI) to the incubation mixture allows at the same time to examine the integrity of the cell membrane. PI penetrates the cell's interior, binds with nucleic acids, and after excitation in the blue light ( $\lambda = 420$  nm) it shines red and orange.

### **Western blot**

After removal of the supernatant from the PMN culture, the cell suspensions were rinsed with refrigerated PBS, suspended in TRIS-CL pH 7,5; and next they were subject

przez 1 godzinę buforem zawierającym kaseinę (TBS/Caseine-Tween 20), a następnie trzykrotnie płukano roztworem TBS-Tween 20. Rozdzielone białka przeniesiono na nitrocelulozę (0,45  $\mu\text{m}$ ) i inkubowano przez 20 godzin z pierwszorzędnymi monoklonalnymi przeciwciałami anti-Bax, anti-Mcl-1 i anti-TLR2. Następnie membranę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę z mysimi przeciwciałami anti-IgG znakowanymi fosfatazą alkaliczną. Immunoreaktywne prążki białek Bax, Mcl-1 i TLR2 były wybarwiane przy użyciu substratu BCIP/NBT, a następnie analizowane z wykorzystaniem oprogramowania LabImage 1 Gel, natężenie prążków zostało przedstawione w jednostkach umownych.

### Statystyka

Analizę statystyczną przedstawiono jako średnie arytmetyczne ( $\bar{x}$ ) i odchylenia standardowe ( $\pm\text{SD}$ , standard deviation) poprzedzone oceną statystyczną za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa. Dokonano obliczeń testem U'Manna-Withneya przy użyciu pakietu statystycznego Statistica 6.0 PL. Znamienność statystyczną przyjęto na poziomie istotności przy  $p < 0,05$ . Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

### Wyniki

Apoptoza neutrofilów oceniana metodą cytometrii przepływowej

Zaobserwowano istotny wzrost odsetka neutrofilów apoptotycznych oceniany po 4 godzinach inkubacji. Wydłużenie czasu inkubacji do 20 godzin zwiększyło liczbę neutrofilów apoptotycznych w porównaniu do wartości uzyskanych po 4 godzinach inkubacji (Ryc. 1).

Inkubacja neutrofilów w obecności rhIL-17 nasiliła odsetek komórek apoptotycznych w porównaniu do komórek niestymulowanych, ocenianych po 4 i 20 godzinach (Ryc. 1). Ponadto zaobserwowano istotny spadek odsetka w komórkach inkubowanych jednocześnie z rhIL-17 oraz anti-IL-17A w porównaniu do komórek niestymulowanych ocenianych w tym samym czasie i był on porównywalny do odsetka komórek niestymulowanych ocenianych w tym samym czasie (Ryc. 1).

Natomiast inkubacja komórek z fMLP zmniejszyła odsetek neutrofilów apoptotycznych w porównaniu do komórek niestymulowanych w tym samym czasie (Ryc. 1).

Wykres punktowy „dot plot” oceniający cytometrycznie przeżywalność komórek (apoptoza, nekroza) barwiących się Annexin V (A) i/lub jodkiem propidyny (PI) (I). Diagram oceniający apoptozę PMN inkubowanych z rhIL-17 (a), diagram oceniający PMN wybarwione Annexin V (b) i jodkiem propidyny (c). Zidentyfikowano cztery populacje komórek: niebarwiące się żadnym odczynnikiem [żywe (A-/PI-) - numer 3]; barwiące się jedynie jodkiem propidyny [komórki nekrotyczne i/lub ciała apoptotyczne (A-/PI+) numer 1]; barwiące się

to lysis through sonication. The protein was estimated in the cell homogenates, with an application of Lowry's method. The obtained material was suspended in Laemli's buffer. The cytoplasmic proteins' fraction was subject to electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE). The sites binding in an unspecific way were blocked for 1 hour with the buffer containing caseine (TBS/Caseine-Tween 20), and next they were rinsed three times in the TBS-Tween 20 solution. The separated proteins were transferred on nitrocellulose (0,45  $\mu\text{m}$ ) and incubated for 20 hours with primary monoclonal antibodies such as anti-Bax, anti-Mcl-1 and anti-TLR-2. Next the membrane was incubated at room temperature for 1 hour with mouse antibodies anti-IgG marked by alkaline phosphatase. The immunoreactive striae of the proteins Bax, Mcl-1 and TLR2 were stained with an application of BCIP/NBT substrate, and then they were analysed with an application of LabImage 1Gel programme, the intensity of the striae was presented in conventional units.

### Statistics

The statistical analysis was presented as arithmetic means ( $\bar{x}$ ) and standard deviations ( $\pm\text{SD}$ ) were preceded by the statistical evaluation with an application of the Kołmogorow-Smirnov test. The calculations were made using the Mann-Whitney U test with an application of the statistical package Statistica 6.0 PL. Statistical significance was chosen on the level of significance  $p < 0,05$ . The approval to conduct the studies was given by the Bioethics Commission of the Medical University in Białystok.

### Results

Neutrophil apoptosis was evaluated by flow cytometry.

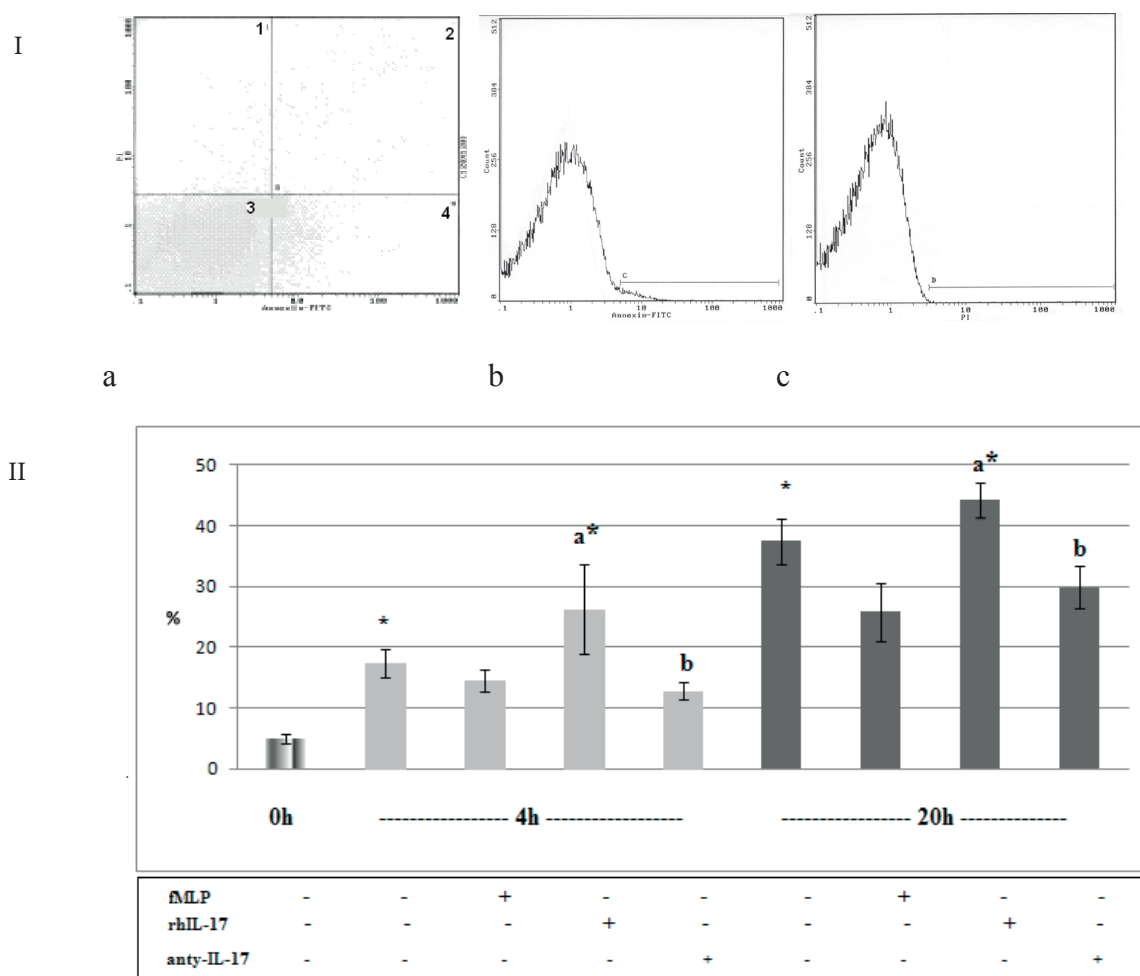
An essential increase in the percentage of apoptotic neutrophils, evaluated after 4 hours of incubation, was observed. The prolongation of the incubation time to 20 hours increased the number of apoptotic neutrophils, in comparison with the values obtained after 4 hours of incubation (Fig. 1).

Neutrophils' incubation in the presence of rhIL-17 intensified the percentage of apoptotic cells, in comparison with unstimulated cells, evaluated after 4 to 20 hours (Fig. 1). Moreover, an essential decrease in the percentage of the cells incubated simultaneously with rhIL-17 and anti-IL-17A was observed, in comparison with unstimulated cells evaluated in the same time, and it was comparable to the percentage of unstimulated cells evaluated in the same time (Fig. 1).

On the other hand, the cells' incubation with fMLP decreased the percentage of apoptotic neutrophils, in comparison with unstimulated cells in the same time (Fig. 1).

The dot plot assessing cytometrically the survival rate of cells (apoptosis, necrosis) staining with Annexin V (A) and/or Propidium Iodide (PI).





\* - różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN po bezpośredniej izolacji i PMN po inkubacji – statistically significant differences between PMNs directly after their isolation and PMNs after their incubation

a - różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN niestymulowanymi i stymulowanymi – statistically significant differences between stimulated and unstimulated PMNs

b - różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN stymulowanymi rhIL-17 a PMN inkubowanymi z rhIL-17+anti-IL-17A – statistically significant differences between PMNs stimulated by rhIL-17 and PMNs incubated with rhIL-17+ anti-IL-17A

Ryc. 1. Apoptoza neutrofilów oceniana metodą cytometrii przepływowej

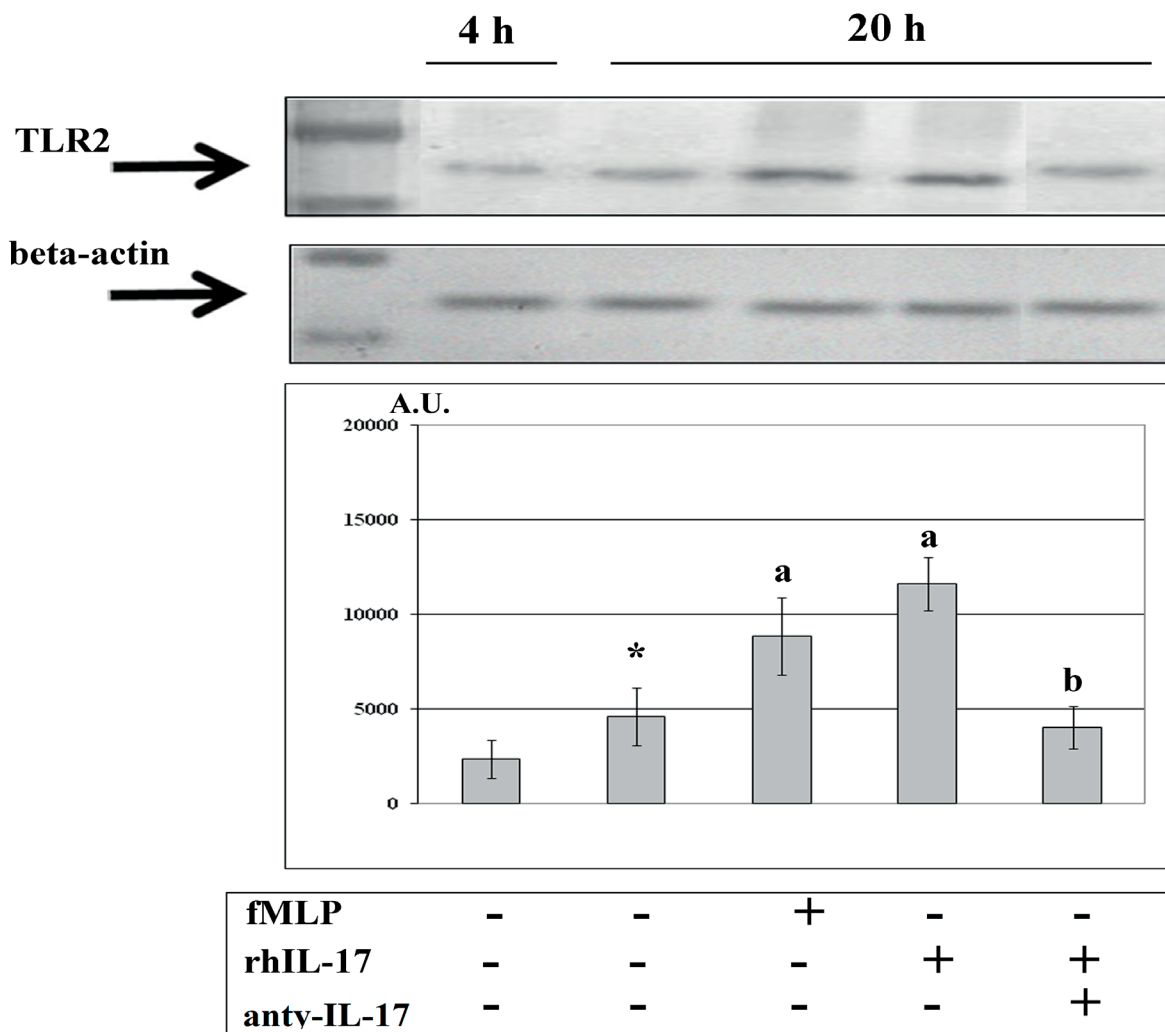
Fig. 1. Neutrophil apoptosis evaluated with an application of the flow cytometry method

w różnym stopniu aneksyną V [komórki apoptotyczne we wczesnym stadium apoptozy (A+/PI-)-numer 4]; komórki barwiące się jednocześnie oboma odczynnikami [komórki w stadium późnej apoptozy i/lub nekrozy (A+/PI+)-numer 2]. Wartości odsetka neutrofilów apoptotycznych w hodowli po 4 i 20 godzinach (II).

### Ekspresja TLR2 w lizatach neutrofilów

W lizatach neutrofilów inkubowanych przez 4 i 20 godzin wykazano metodą western blot ekspresję białka TLR2 o masie cząsteczkowej około 90 kDa. Zaobserwowano, że ekspresja tego białka w niestymulowanych neutrofilach inkubowanych przez 20 godzin była wyższa w porównaniu do ekspresji w neutrofilach inkubowanych przez

The diagram evaluating the apoptosis of PMNs incubated with rhIL-17 (a) The diagram evaluating PMNs stained with Annexin V (b) and with Propidium Iodide (c) Four cell populations were identified: those which do not stain with any reagent [living (A-/PI-)-number 3]; stained only with Propidium Iodide [necrotic cells and/or apoptotic bodies (A-/PI+) number 1]; stained in a different degree with Annexin V [apoptotic cells in the stage of early apoptosis (A+/PI-)-number 4], cells stained simultaneously with both reagents [cells in the stage of late apoptosis and/or necrosis (A+/PI+)-number 2]. The percentage values of the apoptotic neutrophils in the culture after 4 and 20 hours (II).



\* – różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN po 4 i 20 godz. inkubacji – statistically significant differences between PMNs after 4 and 20 hours of their incubation

a – różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN niestymulowanymi a PMN stymulowanymi – statistically significant differences between unstimulated PMNs and stimulated PMNs

b – różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN stymulowanymi rh-IL17 i inkubowanymi z rhIL-17+anty-IL-17A – statistically significant differences between PMNs stimulated by rh-IL17 and incubated with rhIL-17+anti-IL-17 A

Ryc. 2. Analiza Western blot dla TLR2 w PMN po 4 i 20 godzinach hodowli PMN

Fig. 2. The Western blot analysis for TLR2 in PMNs after 4 and 20 hours of PMNs culture

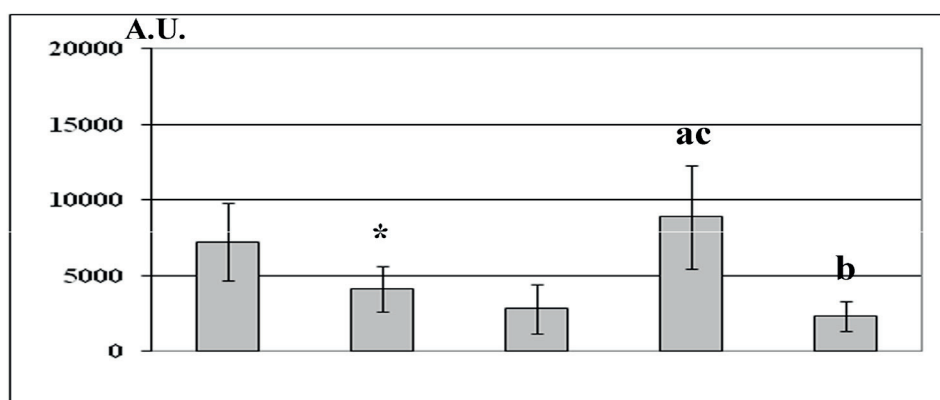
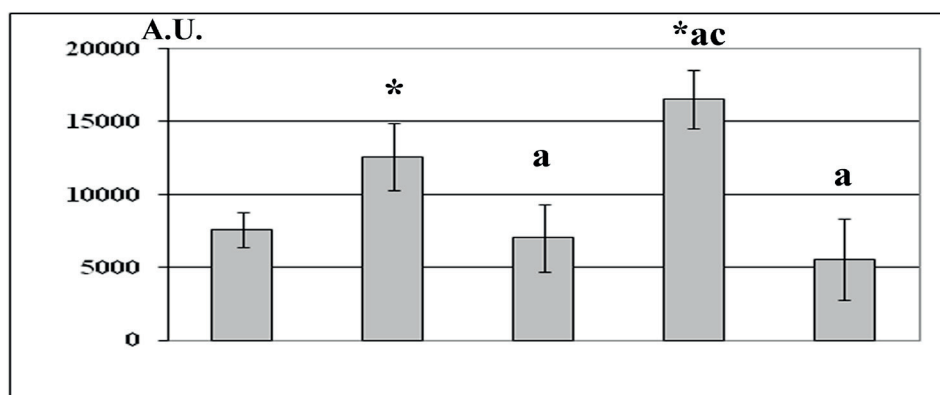
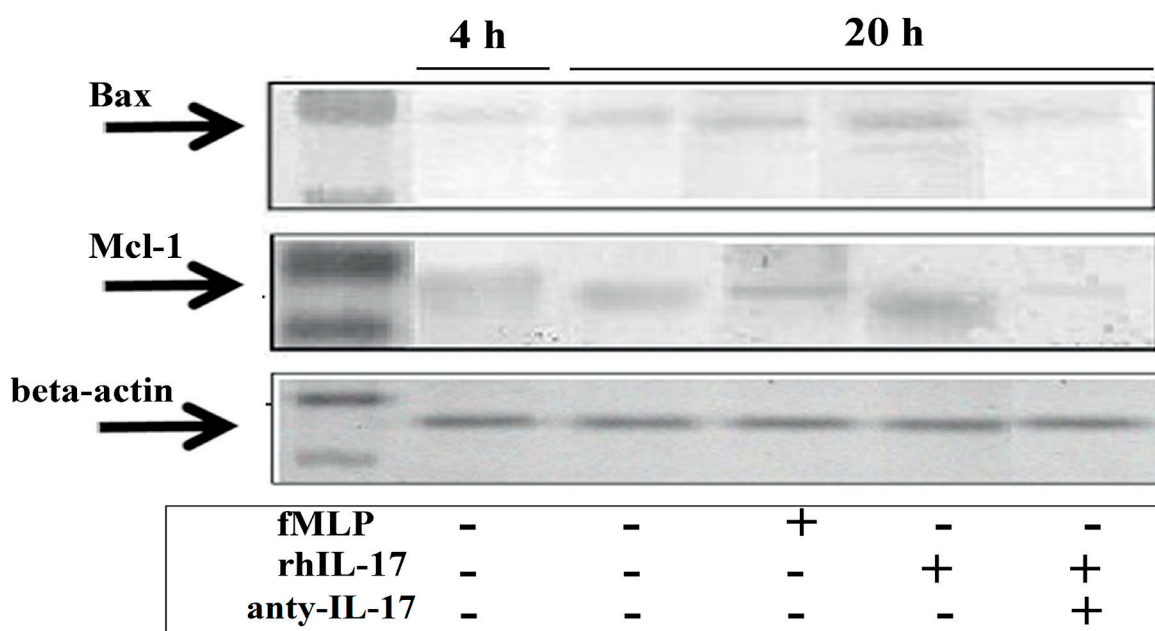
4 godziny. Wzrost ekspresji TLR2 obserwowano również w PMN stymulowanych rhIL-17 i fMLP w porównaniu do komórek niestymulowanych ocenianych w tym samym czasie inkubacji. Natomiast ekspresja TLR2 w PMN inkubowanych rhIL-17 oraz z przeciwciałami anty-IL-17A była niższa w porównaniu do komórek stymulowanych rhIL-17 ocenianych po 20 godzinach inkubacji (Fig. 2).

### Ekspresja Bax i Mcl-1 w lizatach neutrofilów

Wykorzystując specyficzne przeciwciała monoklonalne w lizatach neutrofilów inkubowanych przez 4 i 20 godzin metodą western blot potwierdzono obecność wewnątrzkomórkowego białka Bax o masie cząsteczkowej około 21

### The expression of TLR2 in lysates of neutrophils

In lysates of neutrophils incubated for 4 and 20 hours the expression of TLR2 – a protein, with its molecular weight of about 90kDa, was revealed by the Western blot method. It was observed that the expression of this protein in unstimulated neutrophils incubated for 20 hours was higher in comparison with the expression of neutrophils incubated for 4 hours. An increase in TLR2 expression was also observed in PMNs stimulated by rhIL-17 and fMLP in comparison with the unstimulated cells evaluated in the same time of the incubation. On the other hand, the expression of TLR2 in PMNs incubated with rhIL-17 and



\* - różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN po 4 i 20 godz. inkubacji – statistically significant differences between PMNs after 4 and 20 hours of their incubation

a - różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN niestymulowanymi a PMN stymulowanymi – statistically significant differences between stimulated and unstimulated PMNs

b - różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN stymulowanymi rh-IL17 i inkubowanymi z rhIL-17+anty-IL-17A – statistically significant differences between PMNs stimulated by rhIL17 and incubated with rhIL-17+anti-IL-17A

c - różnice istotne statystycznie pomiędzy PMN stymulowanymi fMLP a rhIL-17 – statistically significant differences between PMNs stimulated by fMLP and rhIL-17

Ryc. 3. Analiza Western blot dla białka Bax i Mcl-1 w PMN

Fig. 3. The Western blot analysis of Bax and Mcl-1 proteins in PMNs

kDa oraz białko Mcl-1 o masie cząsteczkowej około 40 kDa. Ekspresja obu białek była silniejsza w neutrofilach inkubowanych przez 20 godzin w porównaniu do komórek inkubowanych przez 4 godziny. Obecność rhIL-17 nasiliła, natomiast fMLP obniżyła ekspresję białka Bax w lizatach inkubowanych przez 20 godzin w porównaniu do ekspresji w komórkach niestymulowanych ocenianych w tym samym czasie.

Jednocześnie zaobserwowano istotnie niższą ekspresję ocenianych białek w PMN inkubowanych z rhIL-17 oraz z przeciwciałami anti-IL-17A w porównaniu do komórek stymulowanych rhIL-17 ocenianych po 20 godzinach inkubacji (Fig. 3).

## Dyskusja

Wyniki przeprowadzonych badań własnych wykazały związek pomiędzy nasiloną apoptozą a wzrostem ekspresji receptora TLR2 w ludzkich neutrofilach stymulowanych rhIL-17. Zmianom tym towarzyszył wzrost ekspresji proapoptotycznego białka Bax, co sugeruje, że IL-17 może w sposób bezpośredni indukować apoptozę neutrofilów na drodze wewnętrznej przy udziale tego białka i w sposób zależny od receptora TLR2. Obserwacje dotyczące wpływu IL-17 na apoptozę PMN i białko Bax są zgodne z doniesieniami Zhang i wsp. [10]. Autorzy ci zaobserwowali korelację pomiędzy zwiększonym indeksem apoptotycznym a nasiloną ekspresją tego białka w neutrofilach.

Ponadto zaobserwowano, że rhIL-17 w badaniach *in vitro* nasila ekspresję antyapoptotycznego białka Mcl-1 w ludzkich neutrofilach krwi obwodowej. Uzyskane wyniki wydają się być zaskakujące i odmienne od wyników innych autorów [10, 11].

W badaniach własnych zaobserwowano, że obecność w hodowli przeciwciał anti-IL-17 istotnie obniżyło odsetek neutrofilów apoptotycznych i jednocześnie ekspresję białek Bax i Mcl-1, co podkreśla rolę tej cytokiny w bezpośredniej regulacji apoptozy neutrofilów z udziałem badanych białek.

Efekt indukcji Mcl-1 pod wpływem rhIL-17 można tłumaczyć obecnością białek, które w kooperacji z Mcl-1 mogą odpowiadać za nasilenie apoptozy neutrofilów. Jak zaobserwowano, niektóre z białek należących do rodziny Nur77, zależnie od rodzaju komórek i czynników stymulujących, mogą wykazywać przeciwne do znanych cechy czynnościowe [12, 13]. Zaobserwowano, że białko Nur77, będące białkiem adaptorowym w szlaku prowadzącym do apoptozy, wiążąc się z Bcl-2 powoduje zmianę jego konformacji, co prowadzi do zmiany jego funkcji z antyapoptotycznej na proapoptotyczną [13]. Mechanizm prowadzący do tych zmian nie jest jeszcze do końca poznany. Zaobserwowano, że zwiększona ekspresja antyapoptotycznych białek może ułatwiać apoptozę, podczas gdy białka proapoptotyczne mogą wykazywać działanie antyapoptotyczne. Potwierdzeniem tej teorii są

anti-IL-17A antibodies was lower in comparison with the cells stimulated with rhIL-17 evaluated after 20 hours of incubation (Fig. 2).

## The expression of Bax and Mcl-1 in lysates of neutrophils

Using specific monoclonal antibodies in lysates of neutrophils incubated for 4 and 20 hours by the Western blot method, the presence of an intracellular protein Bax with its molecular weight of about 21kDa was confirmed, as well as of Mcl-1 protein with its molecular weight of about 40 kDa. The expression of both proteins was stronger in neutrophils incubated for 20 hours in comparison with the cells incubated for 4 hours. The expression of Bax protein in lysates incubated for 20 hours was intensified by the presence of rhIL-17, whereas it was decreased by fMLP, in comparison with the expression in unstimulated cells evaluated in the same time. At the same time, an essentially decreased expression of the evaluated proteins in PMNs incubated with rhIL-17 and anti-IL-17A antibodies was observed, in comparison with the cells stimulated by rhIL-17 evaluated after 20 hours of incubation (Fig. 3).

## Discussion

The results of research of the authors of the study have revealed a relationship between intensified apoptosis and increase in the expression of TLR2 receptor in human neutrophils stimulated by rhIL-17. The changes were accompanied by the increase in the expression of Bax – a proapoptotic protein, which suggests that IL-17 may directly induce neutrophil apoptosis in an intrinsic way, with this protein's participation and in a way dependent on the TLR2 receptor. The observations concerning the influence of IL-17 on the apoptosis of PMNs and a protein Bax are compatible with those of Zhang and co-authors [10]. They have noticed a correlation between the increased apoptotic index and the intensified expression of this protein in neutrophils.

Moreover, it has been observed that rhIL-17 in the examinations *in vitro* intensifies the expression of a proapoptotic protein Mcl-1 in human neutrophils of the peripheral blood. The obtained results may seem surprising and different from the results of other authors [10, 11].

The authors of the study have observed that the presence of anti-IL-17 antibodies in the culture has essentially reduced the percentage of apoptotic neutrophils, and at the same time the expression of the proteins Bax and Mcl-1, which stresses the role of this cytokine in a direct regulation of neutrophil apoptosis with the participation of the examined proteins.

The effect of Mcl-1 induction under the influence of rhIL-17 can be explained by the presence of the proteins, which in cooperation with Mcl-1 may be responsible for



wyniki uzyskane przez Harter i wsp., którzy stwierdzili, że nasiloną ekspresją białek antyapoptotycznych Bid i Mcl-1 w neutrofilach odzwierciedla jednocześnie wysoki poziom apoptozy tych komórek u pacjentów z sepsą [12].

Wyniki badań własnych poszerzono o ocenę ekspresji receptora TLR2 na neutrofilach, sugerując jego udział w indukcji procesu apoptozy tych komórek. Into i wsp. zaobserwowali, że w ludzkich limfocytach, makrofagach oraz monocytach TLR2 indukuje apoptozę z udziałem kaspazy 3 [14]. Receptor TLR2 nazywany „receptorem śmierci”, wykazuje zdolność wiązania białka adaptorowego MyD88 oraz białka adaptorowego FADD, co powoduje przekazanie sygnału apoptotycznego do wnętrza komórki i aktywację kaskady reakcji, prowadząc do apoptozy komórki na drodze zewnętrznej [8]. Obserwowany w badaniach własnych stymulujący wpływ rhIL-17 na ekspresję TLR2 sugeruje udział tej cytokiny w indukcji apoptozy także na drodze zewnętrznej.

Zaobserwowany w przeprowadzonych badaniach własnych wpływ rhIL-17 na proces apoptozy w PMN jest całkowicie odmienny od efektów wywieranych przez inne cytokiny. Wcześniej przeprowadzone badania wykazały że IL-15, również zaliczana do cytokin zapalnych opóźnia apoptozę PMN i jednocześnie nasila ekspresję TLR2 [15]. Pelletier i wsp. oraz Bouchard i wsp. tłumaczą to zjawisko poprzez zdolność IL-15 do hamowania degradacji Mcl-1 [16,17]. Derouet, Fulop i wsp. wykazali, że GM-CSF również opóźnia apoptozę neutrofilów, między innymi poprzez wzrost stabilności białka Mcl-1 i obniżenie ekspresji białka Bax [5,18]. Ponadto zaobserwowano, że cytokina ta nasila ekspresję TLR2 [19].

Odniesieniem do analizowanych wyników było zbadanie wpływu fMLP na ekspresję TLR2 oraz apoptozę neutrofilów oraz badanych białek apoptotycznych. W badaniach własnych potwierdzono hamujący wpływ fMLP na apoptozę neutrofilów i wykazano, że zjawisko to jest zależne od białka Bax, którego ekspresja uległa obniżeniu [20]. Nie zaobserwowano takiej zależności w odniesieniu do białka Mcl-1, co wskazuje na większe znaczenie białka Bax niż Mcl-1 w regulacji apoptozy neutrofilów. Jednocześnie zaobserwowano, że fMLP indukuje ekspresję TLR2 w sposób porównywalny do rhIL-17.

## Wnioski

Podsumowując, uzyskane wyniki wykazały, że nasiloną apoptozą neutrofilów zależy w sposób bezpośredni od wpływu rhIL-17 na białka szlaku wewnętrznego i prawdopodobnie w sposób zależny od receptora TLR2. Obserwowane zmiany ekspresji Bax zarówno pod wpływem fMLP, jak i rhIL-17 podkreślają istotną rolę tego białka w regulacji apoptozy neutrofilów. Natomiast wzrost ekspresji antyapoptotycznego Mcl-1, przy jednoczesnym nasileniu odsetka komórek apoptotycznych sugeruje istnienie czynników, które mogą zmieniać właściwości antyapoptotyczne tego białka na właściwości proapop-

the intensification of neutrophil apoptosis. As it has been observed some proteins from the family Nur77, depending on the kind of cells and stimulating factors, may indicate functional features contrary to the known ones [12,13]. It has been observed that Nur77, an adaptor protein in the pathway leading to apoptosis, binding with Bcl-2 causes the alteration of its conformation, which results in the alteration of its function from the antiapoptotic to proapoptotic [13]. The mechanism which causes the above alterations has not been fully studied yet. It has been observed that an increased expression of antiapoptotic proteins may facilitate apoptosis, while proapoptotic proteins may show antiapoptotic activity. This theory has been confirmed by the results obtained by Harter and co-authors, according to whom an intensified expression of antiapoptotic proteins Bid and Mcl-1 in neutrophils, indicates at the same time a high level of apoptosis of these cells in sepsis patients [12].

The results obtained by the authors of the study have been extended to include an evaluation of the expression of TLR2 receptor on neutrophils, suggesting its participation in the induction of apoptosis of these cells. It has been observed by Into and co-authors that TLR2, with the participation of caspase 3, induces apoptosis in human lymphocytes, macrophages and monocytes [14]. TLR2 called “a death receptor” reveals an ability to bind an adaptor protein MyD88 and an adaptor protein FADD, which results in the transmission of the apoptotic signal to the cell's interior and the activation of a cascade reaction leading to the cell's apoptosis on an external way [8].

The stimulating influence of rhIL-17 on the expression of TLR2, observed by the authors of the study, suggests the participation of this cytokine in apoptosis induction also on an external way.

The influence of rhIL-17 on the process of apoptosis in PMNs, observed by the authors of the study, is totally different from the effects exerted by other cytokines. The previous studies have revealed that IL15, also one of the inflammatory cytokines, retards apoptosis of PMNs and at the same time intensifies the expression of TLR2 [15]. Pelletier and co-authors as well as Bouchard and co-authors explain this phenomenon as an ability of IL-15 to the inhibition of Mcl-1 degradation [16,17]. Derouet, Fulop and co-authors have observed that GM-CSF also retards neutrophil apoptosis, among others by an increase in the stability of Mcl-1 and a decrease in the expression of Bax [5,18]. Moreover, it has been observed that this cytokine intensifies the expression of TLR2 [19].

In order to refer to the analysed results, the studies have been conducted on the influence of fMLP on the expression of TLR2, neutrophils' apoptosis and the examined apoptotic proteins. The research of the authors of the study has confirmed an inhibitory influence of fMLP on neutrophil apoptosis and it has revealed that this phenomenon depends on the protein Bax, whose

totyczne. Dalsze badania oceniające wpływ IL-17 na inne białka szlaku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego pozwolą w pełni wyjaśnić mechanizm indukcji apoptozy z udziałem tej cytokiny w ludzkich neutrofilach.

expression decreased [20]. The above dependence has not been observed in the protein Mcl-1, which indicates a larger significance of Bax protein than Mcl-1 protein in the regulation of neutrophil apoptosis. It has also been observed that fMLP induces the expression of TLR2, in a way comparable to rhIL-17.

### Conclusions

Summing up, the obtained results have revealed that intensified neutrophil apoptosis depends directly on the influence of rhIL-17 on the intracellular proteins and probably indirectly on TLR2 receptor. The observed changes in the expression of Bax both under the influence of fMLP and rhIL-17, stress an essential role of this protein in the regulation of neutrophil apoptosis. On the other hand, an increase in the expression of antiapoptotic Mcl-1, with a simultaneous increase in the percentage of apoptotic cells, suggests the existence of factors which may change the antiapoptotic properties of the protein into proapoptotic ones. Further studies evaluating the influence of rhIL-17 on other intracellular and extracellular proteins will allow to explain fully the mechanism of the apoptosis induction with the participation of this cytokine in human neutrophils.

### Piśmiennictwo / References

1. Geering B, Simon H-U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* 2011;18:1457-1469.
2. Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal. *Scan. J Immunol.* 2011;73:401-407
3. Croker BA, O’Zdonnell JA, Nowell CJ, Metcalf D, Dewson G, Campbell KJ, Rogers KL, Hu Y, Smyth GK, Zhang J, White M. Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1. *PNAS.* 2011;108:13135-13140
4. Paunel-Gorgulu A, Zornig M, Logters T, Altrichter J, Rabenhorst U, Cinatl J, Windolf J, Scholz M. Mcl-1-mediated impairment of the intrinsic apoptosis pathway in circulating neutrophils from critically patients can be overcome by Fas stimulation. *J Immunol.* 2009;183:6198-6206
5. Fulop TJ, Larbi A, Linteau A, Desgeorges S, Douziech N. The role of Mcl-1 and Bax expression alteration in the decreased rescue of human neutrophils from apoptosis by GM-CSF with aging. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002;973:305-308.
6. Frentzel JW. Disruption of apoptotic signal pathway during glucocorticoid-induced survival of human neutrophils. Michigan State University ProQuest LLC United States Code. UMI Microform 3331909. 2008;9-21,149-151
7. Kakareko M, Jablonska E, Jablonski J. The influence of rhIL-17 on the expression of Toll-like receptor-2. *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol.*, 2010;16:32-36.
8. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J. Immunol.* 2003;170:5268-5275.
9. Zeman K. Metody izolacji i oceny funkcji granulocytów obojętnochłonnych. *Immunol. Pol.* 1990;1-2 157-170.
10. Zhang ZG, He QY, Liu XM, Tang XY, Chen LZ. Effect of Interleukin-17 on neutrophil apoptosis. *Beijing. Da. Xue. Xue. Bao.* 2006;18:305-309.
11. Dragon S, Saffar AS, Shan L. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effect of GM-CSF in human neutrophils. *Mol. Immunol.* 2008;45:160-168.
12. Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Mcl-1 correlates with reduced apoptosis in neutrophils from patients with sepsis. *J. Am. Coll. Surg.* 2003;197:964-973.
13. Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao X. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell.* 2004;116:527-5540.
14. Into T, Nodasaka Y, Hasebe A, Okuzawa T, Nakamura J, Ohata N, Shibata K. Mycoplasma lipoproteins induce toll-like receptor 2- and caspases-mediated cell death in lymphocytes and monocytes. *Microbiol. Immunol.* 2002;46:265-276.
15. Marcinczyk M, Jablonska E, Puzewska W, Hermanowska-Szapakowicz T. Effect of rhIL-15 on TLR2 expression and apoptosis of PMN from patients with Lyme disease. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 2005;57:85-91.
16. Pelletier M, Rathé C, Girard D. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-ac-

- tivated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Lett.* 2002;4:164-170.
17. Bouchard A, Ratthe C, Girard D. Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J. Leukoc. Biol.* 2004;75:893-900.
  18. Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem.* 2004;279:26915-26921
  19. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE. Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 2002; 100:1860-1868.
  20. Hu T, Bei L, Huang Y. The relationship between fMLP induced neutrophil respiratory burst and apoptosis of neutrophil. *Shi. Yan. Sheng. Wu. Xue. Bao.*, 1999;32:359-366.

**Adres do korespondencji / Mailing address:**

Magdalena Kakareko  
ul. Waszyngtona 15A  
15-269 Białystok