ETH zürich

ETH Library

The role of cytokines in regulating inflammatory mechanisms

in vitro studies with endothelial cells and macrophages

Doctoral Thesis

Author(s):
Althaus, Roland

Publication date:
1997

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-001923634

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH No. 12463

The role of cytokines in regulating inflammatory mechanisms: *in vitro* studies with endothelial cells and macrophages

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
Roland Althaus
Dipl. Natw. ETH

born July 20, 1966
citizen of Unterlangenegg (BE)

accepted on the recommendation of:
Prof. Dr. F. E. Würgler, examiner
Dr. A. N. Shakhov, co-examiner
Dr. R. Moser co-examiner

Zürich, 1997

Zusammenfassung

Eine Entzündung ist ein physiologischer Prozess des Körpers, der dazu dient, das pathogene Agens zu eliminieren, Gewebeschäden auf ein Minimum zu reduzieren und letztendlich die Homöostase wieder herzustellen, soweit dies überhaupt noch möglich ist. Entzündungen beruhen auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Zelltypen. Wichtige Partner sind Granulozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und Makrophagen. Das Zusammenwirken der verschiedenen Zelltypen ist einer strengen Kontrolle unterworfen, die zumindest teilweise von einer Gruppe von sekretierten, niedermolekularen (Glyko-) Proteinen vermittelt wird, die unter dem Begriff "Zytokine" zusammengefasst werden. Im Normalfall sind Entzündungen transiente Prozesse, welche jedoch in pathologischen Fällen einen chronischen Verlauf annehmen können.

Bei Versagen der subtilen Steuerungsmechanismen können die körpereigenen Prozesse mitunter grösseren Schaden anrichten, als das verursachende Pathogen selbst. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war eine weitergehende Charakterisierung der Funktion, die Zytokine in einzelnen Phasen der Entzündung ausüben. Dazu wurden je ein *in vitro* Modell für Endothelzellen und eines für Makrophagen verwendet.

1. Leukozyten Extravasation

Die Einwanderung von Leukozyten in Entzündungsherde wird haupsächlich durch das Endothelium, beziehungsweise durch die Expression bestimmter Zelladhäsionsmoleküle, gesteuert. Man weiss bereits recht viel über die Induktion solcher Adhäsionsmoleküle, wogegen die Mechanismen, welche zu einer Abschaltung ihrer Expression führen, noch nicht sehr präzise bekannt sind. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass IL-4 und IL-13 durch die zeitliche Beschränkung der E-Selektin Expression das sogenannte "Rolling", ein erster Schritt bei der Extravasation von Leukozyten, vermindern. Die frühe Phase der E-Selektin Transkription und Translation, ausgelöst durch TNF, wird nicht beeinflusst.

2. Reduzierte antimikrobielle Aktivität von TNF/LTα defizenten Makrophagen gegen Listerien

In dieser Arbeit wurden aus Knochenmarks-Stammzellen *in vitro* differenzierte Makrophagen, die mit Listerien (Listeria monocytogenes, LM) infiziert wurden, als Modell verwendet. TNF/LTα defiziente Makrophagen zeigen nach einer Vorbehandlung mit IFNγ/LPS und nachfolgender Infektion mit LM eine auffallende Reduktion ihrer antimikrobiellen Kapazität. Sie verlieren im

Gegensatz zu Makrophagen aus Knochenmark von wt Mäusen die Wachstumskontrolle über den intrazellulär lebenden Mikroorganismus. Zwar konnte durch Hemmung der NO Produktion gezeigt werden, dass dieses Effektormolekül zu einer effizienten Wachstumskontrolle von LM nötig ist, dies bietet aber noch keine ausreichende Erklärung für den Unterschied zwischen wt und ko Makrophagen, zumal die Spiegel ihrer NO Produktion vergleichbar sind. Eine Analyse der Zytokinprofile ergab bei ko Makrophagen einen ungefähr zehnmal höheren Spiegel an TGFβ Transkripten im Vergleich zu wt Makrophagen. Der hemmende Einfluss von TGFβ auf die Superoxid-Produktion in Makrophagen konnte in früheren Arbeit gezeigt werden. Unsere Daten zeigen damit, dass die reduzierte antimikrobielle Kapazität von TNF/LTα defizienten Makrophagen auf eine beeinträchtigte Superoxid-Produktion zurückzuführen ist. Peroxynitrit, das Produkt der Reaktion von NO und Superoxid, erhält damit Bedeutung als mögliches neues antimikrobielles Effektormolekül.

3. IFNγ/LPS induzierte NO Produktion in Makrophagen

Stickoxid (NO) ist für den Wirtsorganismus ein potentiell gefährliches Molekül. Es unterliegt deshalb einer strengen Regulation. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass LPS und TNF die NO-Produktion durch mindestens teilweise unterschiedliche intrazelluläre Signalwege auslösen. Die durch LPS induzierte Transkription des Enzyms iNOS hängt von der Aktivierung der p38 MAP kinase ab und kann durch deren Hemmung stark vermindert werden. Die TNF-induzierte iNOS Transkription wird duch diese Hemmung jedoch praktisch nicht beeinträchtigt. Im weiteren konnte gezeigt werden, dass in diesem Modell der synergistische Effekt von IFNγ für eine effiziente NO Produktion unabdingbar ist.

Summary

Inflammation is a physiological process of the body which is started to remove pathogenic agents, restrict tissue damage to a minimum and eventually to restore homeostasis as far as possible. It relies on a complex interplay between numerous cell types including endothelial cells and macrophages. These interactions are subject to a tight control which is at least partly mediated by a family of secreted low-molecular-weight (glyco-) proteins termed cytokines. Although an inflammation usually is of transient nature, it may become chronic.

If the subtle regulatory mechanisms are lost or misguided, a normally beneficial inflammation can cause more harm to the host than the pathogenic agent itself. The main goal of this work was to further characterize the role of cytokines in two different *in vitro* models (endothelial cells and macrophages) that are important in distinct stages of the inflammatory cascade.

1. Leukocyte extravasation

Leukocyte recruiting to inflammatory sites is governed by the endothelium, expressing a defined pattern of adhesion molecules in response to inflammatory stimuli. While much is known about the induction of adhesion molecules like E-selectin, the mechanisms down-regulating their expression and thus limiting the inflammatory process are less clear. We present evidence that IL-4 and IL-13 downregulate the rolling adhesion of leukocytes to activated endothelial cells by limiting the period of E-selectin expression. Early E-selectin mRNA transcription and protein expression is, however, not affected. Our data suggest that IL-4 and IL-13 restrict the acute phase of leukocyte extravasation by controlling the rolling adhesion by limiting the interval of E-selectin expression.

2. Reduced antilisterial activity of TNF/LTα deficient bone marrow-derived macrophages

TNF/LTα deficient macrophages show a striking susceptibility to infection with Listeria monocytogenes (LM). To investigate possible reasons for this, bone marrow derived macrophages from wt and knockout mice were subjected to *in vitro* infections with LM. After activation with IFNγ/LPS and subsequent infection only wt macrophages were able to control the growth of intracellular LM. NO is necessary for LM killing as demonstrated by inhibition of NO production, which led to a loss of LM growth control, however, the levels of NO formation are similar between wt and knockout macrophages. Analysis of the cytokine pattern revealed that TGFβ transcript levels are about 10x higher in

knockout macrophages compared to wt. TGFβ is known to downregulate superoxide production in macrophages. Therefore, our data suggest that the reduced anti-listerial activity of knockout macrophages is linked to an impaired superoxide formation and additionally imply a role of peroxynitrite as microbicidal effector molecule.

3. IFNγ/LPS triggered NO formation in macrophages

The production of nitric oxide is potentially harmful for the host itself and is therefore tightly regulated. In this study we present evidence that LPS and TNF use at least partially different signalling pathways, inducing iNOS transciption. While LPS triggered iNOS transcription strongly depends on the activation of p38 MAP kinase, its blockade does not affect TNF induced iNOS transcription. Additionally, in bone marrow derived macrophages the priming effect of IFNγ is an absolute requirement to render a second stimulus (LPS or TNF) efficient in terms of NO production.