

University of Groningen

## Neutrophil-endothelial interaction in ANCA associated vasculitis

Hu, Nan

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2011

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Hu, N. (2011). *Neutrophil-endothelial interaction in ANCA associated vasculitis*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

Chapter

9

**Nederlandse Samenvatting**

In dit proefschrift is de interactie tussen granulocyten en endotheelcellen in AAV (ANCA-associated vasculitis) onderzocht, vooral de mechanismen waardoor granulocyten achterblijven in de wand van bloedvaten, en de rol die expressie van het eiwit proteinase 3 (PR3) op de membraan van granulocyten hierin speelt.

De pathogenese van AAV is nog niet helemaal ontrafeld, maar het is intrigerend dat de vaatschade, die geassocieerd is met de aanwezigheid van anti-neutrofiel cytoplasmatische autoantistoffen (ANCA), bij voorkeur voorkomt in kleine vaten. Haarvaten en venulen zijn met name de plaatsen waar het uittreden van witte bloedcellen tijdens ontsteking plaatsvindt, en de endotheelcellen zijn daar erg gevoelig voor ontstekingsignalen. Er is geen bewijs dat ANCA bij AAV patiënten in de bloedcirculatie aan granulocyten binden en ze activeren. Bovendien zouden de eiwitten en enzymen die vrijkomen uit de geactiveerde granulocyten in de circulatie snel verdund worden in de bloedstroom of geblokkeerd worden door remmers, en zo geen schade aan de wand van bloedvaten veroorzaken. Dus kunnen deze producten van granulocyt alleen schade toebrengen aan de vaten als ze rechtstreeks in contact komen met de endotheelcellen die de wand van bloedvaten bekleden. In **Hoofdstuk 2** is de interactie tussen granulocyten en endotheelcellen bij AAV besproken en de mechanismen die de vaatschade veroorzaken. Wij veronderstellen dat de synapse-achtige interactie die gevormd wordt tussen het granulocyt- en endotheel-oppervlak tijdens adhesie of transmigratie van endotheelcellen een soort slagveld is, en noodzakelijk voor de voortdurende ontsteking in de vaatwand. Vele factoren, zoals ANCA, ontstekings- en chemotactische cytokines zijn betrokken bij dit proces. ANCA activeren de granulocyten en veroorzaken het vrijkomen van reactieve zuurstof metabolieten (ROS - reactive oxygen species) en proteolytische enzymen. Deze worden door NETs (neutrophil extracellular traps) geconcentreerd vlakbij de endotheelcellen, waardoor de vaatwand beschadigd wordt of waardoor de endotheelcellen geactiveerd worden wat leidt tot nog meer influx van leukocyten. Het is een gecompliceerd proces waarbij vele adhesiemoleculen, chemo-attractanten en hun receptoren, en immuun-modulatoren betrokken zijn, die daardoor ook allemaal de mogelijkheid bieden voor interventie in de ziekte.

We hebben eerst de hypothese getest dat verlaagde expressie van de chemokine-receptoren CXCR1 en CXCR2 de granulocyten bij de vaatwand houdt, waardoor de granulocyten in de kleine vaten blijven steken. In **Hoofdstuk 3** is de expressie van CXCR1 en CXCR2 op de membraan van granulocyten gemeten bij AAV patiënten in remissie in vergelijking tot gezonde controles. Serumwaarden van

IL-8, TNF- $\alpha$ , Angiopoietin-1 en -2 van patiënten met rustige en actieve ziekte en controles zijn gemeten. Vervolgens is de adhesie en de trans-endotheliale migratie van granulocyten bepaald, met en zonder blokkering van CXCR<sub>1</sub> en CXCR<sub>2</sub>. De expressie van CXCR<sub>1</sub> en CXCR<sub>2</sub> was significant verlaagd bij AAV patiënten in vergelijking met de controles. *In vitro* vonden we dat IL-8 de CXCR<sub>1</sub> en CXCR<sub>2</sub> expressie op granulocyten dosis afhankelijk verlaagd en bovendien dat de serum IL-8 spiegels bij patiënten met actieve AAV verhoogd waren. Verder waren de IL-8 spiegels negatief gecorreleerd met de CXCR<sub>1</sub>/CXCR<sub>2</sub> expressie op granulocyten, ook bij patiënten met rustige ziekte. Het blokkeren van CXCR<sub>1</sub> en CXCR<sub>2</sub> met repertaxin, een specifieke remmer van deze chemokine receptoren, verhoogde de adhesie van granulocyten, maar verhinderde de migratie door een laag van glomerulaire endotheelcellen. Men zou kunnen speculeren dat, *in vivo*, circulerend IL-8 geproduceerd door geactiveerde endotheelcellen of granulocyten, de CXCR<sub>1</sub> en CXCR<sub>2</sub> expressie op granulocyten verlaagd, waardoor deze vervolgens een verhoogde adhesie en verlaagde trans-endotheliale migratie laten zien. De granulocyten, die hierdoor accumuleren in het micro-vasculaire compartiment worden vervolgens geactiveerd door ANCA, en de ROS en enzymen die hierdoor vrijkomen veroorzaken de schade aan de vaatwand.

Wat betreft de mechanismen die vaatschade veroorzaken bij AAV is de rol van andere autoantistoffen, de AECA (anti-endothelial cell autoantibodies) interessant maar nog slecht onderzocht. De aanwezigheid van AECA bij patiënten met AAV is door verschillende groepen gerapporteerd maar met tegenstrijdige data wat betreft het voorkomen, namelijk variërend van 8% tot 100%. Verhoogde binding van AECA werd aangetoond aan endotheliale cellen geïsoleerd uit de neus-, de nier- of longweefsel, de organen die het meest betrokken zijn bij AAV. Deze resultaten doen vermoeden dat AECA bij AAV orgaanspecifiek zijn en dat zou kunnen betekenen dat als substraat voor AECA detectie endotheliale cellen van relevante organen gebruikt zouden moeten worden. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 4** de prevalentie van AECA in AAV onderzocht en daarbij een humane glomerulaire (nier) endotheliale (GEnC) cellijn gebruikt in vergelijking met primaire HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), die vaak gebruikt worden voor detectie van AECA. Aangezien AECA endotheelcellen kunnen activeren, zijn ook serum spiegels gemeten van adhesie moleculen, als zijnde merkers van endotheel activatie. In het algemeen was er een lage frequentie van AECA bij patiënten met AAV. AECA werden gevonden in 4 van de 29 patiënten met de ziekte van Wegener (14%) en bij geen van de MPA patiënten wanneer de GEnCs als substraat werden gebruikt, terwijl AECA positief waren in 10% van de

Wegener en in 14% van de MPA patiënten wanneer HUVEC als substraat gebruikt werden. Er werd geen significant verschil gevonden in de hoogte van de AECA test waarden tussen AAV patiënten en controles. De serum waarden van circulerend VCAM-1 en ICAM-1, endotheliale adhesiemoleculen, bij AAV patiënten waren significant verhoogd ten opzichte van controles. Er werd echter geen correlatie gevonden tussen AECA titers en de spiegels van de circulerende adhesiemoleculen. Ook was er geen verschil tussen AECA-positieve en -negatieve patiënten wat betreft de endotheliale activatiemerkers. Theoretisch zou het van belang kunnen zijn om meer dan één type substraatcellen te gebruiken om de kans om AECA te detecteren te vergroten. De pathogenetische betekenis van AECA is echter nog onzeker, en het zal eerst nodig zijn om de antigenen waartegen AECA reageren te ontmaskeren alvorens de diagnostische en pathogenetische betekenis vast te kunnen stellen.

Membraanexpressie van ANCA-antigenen, zoals proteïnase 3 (PR<sub>3</sub>), is nodig voor binding van ANCA en is een cruciaal onderdeel van de ANCA-gemedieerde granulocyt activatie. PR<sub>3</sub> expressie is sterk verhoogd tijdens de adhesie van granulocyten. Het PR<sub>3</sub> molecuul heeft geen transmembraan domein in zijn sequentie. De mechanismen hoe PR<sub>3</sub> tot expressie komt en de signaal transductie na binding van ANCA zijn daarom interessant en worden besproken in **Hoofdstuk 5**. PR<sub>3</sub> komt verschillend tot expressie op de membraan van granulocyten, de percentages variëren van 0 tot 100% tussen individuen, en zijn min of meer constant in een persoon. CD<sub>177</sub> is de receptor van PR<sub>3</sub> en verantwoordelijk voor het grootste deel van de expressie van PR<sub>3</sub> op de membraan van de granulocyt. Bij de CD<sub>177</sub><sup>+</sup> subset van de granulocyten vindt co-localisatie plaats van een aantal moleculen samen met PR<sub>3</sub> op de membraan en dit complex bestaande uit CD<sub>177</sub>, PR<sub>3</sub>, FcγRIIIb en β<sub>2</sub>-integrines is betrokken bij de signaal transductie. Dit complex heeft waarschijnlijk een rol in het rekruteren van granulocyten, het leiden van de cellen naar het endotheel en vervolgens bij de via binding aan PR<sub>3</sub> verlopende activatie door ANCA gericht tegen PR<sub>3</sub>. Echter, ook een lage expressie van CD<sub>177</sub> op granulocyten wordt gevonden en ook deze granulocyten kunnen geactiveerd worden door PR<sub>3</sub>-ANCA, wat doet vermoeden dat CD<sub>177</sub> niet de enige receptor van PR<sub>3</sub> is. Andere mogelijke receptoren en mechanismen betrokken bij signaal transductie zullen nader onderzocht moeten worden, zoals bijvoorbeeld chondroïtine sulfaat- en heparansulfaat- bevattende proteoglycanen, PLSCR<sub>1</sub> (phospholipid scramblase 1), en hydrofobe insertie. Het is mogelijk dat deze verschillende moleculen het mogelijk maken dat zowel granulocyten met lage als met hoge PR<sub>3</sub> expressie op

de membraan betrokken zijn bij de pathofysiologie van PR<sub>3</sub>-ANCA geassocieerde vasculitis onafhankelijk van CD177 expressie.

Het percentage van granulocyten met hoge membraan expressie van PR<sub>3</sub> (mPR<sub>3</sub>) is verhoogd bij AAV patiënten en is een risicofactor voor het optreden van een recidief van de ziekte van Wegener. In **Hoofdstuk 6** is onderzocht of CD177 expressie ook verhoogd is bij AAV en verantwoordelijk is voor mPR<sub>3</sub> op-regulatie, en wat de rol is van CD177 bij PR<sub>3</sub>-ANCA gemedieerde granulocyt activatie. De expressie van CD177 en PR<sub>3</sub> is geanalyseerd op geïsoleerde granulocyten van patiënten met AAV, SLE, reumatoïde artritis en gezonde controles. Granulocyt activatie ten gevolge van anti-PR<sub>3</sub> antilichamen werd bepaald door het meten van uitstoot van zuurstofradicalen. Het percentage van CD177<sup>+</sup> granulocyten was significant hoger bij AAV en SLE patiënten vergeleken met controles. Bij 3 controles werd helemaal geen CD177 expressie gemeten. Voorincubatie van de granulocyten van deze donoren met TNF- $\alpha$  leidde niet tot CD177 expressie, maar wel tot PR<sub>3</sub> expressie. Granulocyten van CD177<sup>-</sup> donoren of de fractie CD177<sup>-</sup> granulocyten van donoren met een bimodale expressie van CD177 waren echter wel in staat tot zuurstof radicalen productie na stimulatie met anti-PR<sub>3</sub>. De variatie in hoogte van de anti-PR<sub>3</sub> gemedieerde granulocyt activatie was onafhankelijk van het percentage CD177 positieve granulocyten. Deze data bevestigen onze hypothese dat CD177-onafhankelijke mPR<sub>3</sub> expressie voorkomt en dat ook CD177<sup>-</sup> granulocyten geactiveerd kunnen worden door PR<sub>3</sub>-ANCA.

Vervolgens hebben we de verschillen bestudeerd tussen granulocyten subsets met en zonder CD177 expressie. De functie van CD177 is onbekend, behalve dan dat het een ligand is van PECAM-1, een adhesie molecuul op endotheliale cellen, en dit doet vermoeden dat CD177 een rol zou kunnen spelen in granulocyt migratie naar de micro-vasculatuur. Wij zagen echter geen significant verschil tussen de subsets wat betreft granulocyt adhesie of migratie door een GEnC cellaag (data niet geïncubeerd in dit proefschrift). Daarom is een micro-array studie uitgevoerd in **Hoofdstuk 7**, omdat verschillen in genen in CD177 subsets zouden kunnen duiden op verschillen in functie. Gen expressie in granulocyten van donoren met verschillende CD177 expressie werd vergeleken, en ook tussen CD177<sup>+</sup> en CD177<sup>-</sup> subpopulaties van donoren met bimodale expressie. Een aantal granule eiwitten, zoals defensin  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ , en  $\alpha_4$ , NGAL, BPI, en cathepsin G, die in hoeveelheid afnemen tijdens rijping van de granulocyt, hadden een hoge mRNA expressie in CD177<sup>-</sup> granulocyten. Dit zou kunnen betekenen dat er een relatie is tussen onrijpe granulocyten en de CD177<sup>-</sup> populatie, en inderdaad vonden we met

behulp van FACS analyse dat CD177 expressie opkomt tijdens granulocyt differentiatie. Verschillen in expressie van genen van granule eiwitten in de CD177 subsets zouden een verschillende differentiatie status van granulocyten kunnen weergeven. Echter de hoeveelheden van de granule eiwitten, opgeslagen in de granulocyten, waren niet verschillend tussen de CD177<sup>+</sup> en CD177<sup>-</sup> subsets; dus functionele verschillen op eiwitniveau werden niet gevonden. Deze verhoogde expressie van genen coderend voor granule eiwitten was al eerder gevonden bij AAV patiënten, maar het is onwaarschijnlijk dat dit het gevolg is van een verstoorde balans van CD177<sup>+</sup> en CD177<sup>-</sup> subsets of een verrijking met onrijpe granulocyten. De inductie van gen expressie van granule eiwitten die wordt gevonden na stimulatie van granulocyten met PMA of LPS, zou kunnen betekenen dat de voortdurende ontsteking bij AAV patiënten de werkelijke oorzaak is van de verhoogde genexpressie van granule eiwitten.

### **Algemene discussie**

Een belangrijk kenmerk van AAV is dat de necrotische lesies, die weinig deposities van immuuncomplexen laten zien, met name voorkomen in de kleine vaten. Granulocyten zijn de cellen die ANCA antigenen dragen en de producenten van ROS en proteolytische enzymen, wat leidt tot necrose van de endotheel cellen. Vroege adherentie van grote hoeveelheden granulocyten in de vaten suggereert dat de ophoping van granulocyten een teken is van opkomende vaatschade en een vereiste voor ANCA-gemedieerde vaatschade. Men neemt aan dat circulerende granulocyten niet gemakkelijk geactiveerd worden door ANCA, maar dat adherente granulocyten na aktivatie door ANCA endotheel cellen beschadigen. De rekrutering van granulocyten is een proces van opeenvolgende stappen. Wanneer de granulocyten rollen over het endotheel zullen ze daarna adhereren en vervolgens migreren. Men zou daarom verwachten dat de ANCA-gemedieerde weefsel schade niet alleen in de vaatwand optreedt, maar ook in het onderliggende weefsel, wat echter niet het geval is. Studies van nier-biopsen van AAV patiënten hebben laten zien dat de granulocyten, die ophopen in de glomeruli slecht doordringen in het interstitiële weefsel, hoewel daar chemo-attractanten voor granulocyten aanwezig zijn. Het lijkt erop dat de mobilisatie van granulocyten op gang is gebracht bij AAV, maar dat het stagneert door bepaalde mechanismen. Om het ziekte proces te begrijpen en nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen is het daarom heel belangrijk om te onderzoeken welke mechanismen de rekrutering van granulocyten tot in de weefsels belemmeren en wat er gebeurt tijdens granulocyt-endotheelcel interactie.

ANCA en cytokines in de bloedbaan zijn betrokken bij de verstoorde granulocyt-endotheel interactie bij AAV, en beiden stimuleren granulocyten en endotheelcellen wat leidt tot expressie van adhesie moleculen. In dit proefschrift is een mechanisme gebaseerd op chemokines toegelicht. Expressie van CXCR<sub>1</sub> en CXCR<sub>2</sub> is significant verlaagd op granulocyten van AAV patiënten, en deze verlaging is gecorreleerd met ziekteactiviteit. Circulerend IL-8, wat verhoogd voorkomt bij AAV, kan één van de factoren zijn waardoor de chemokine receptoren verlaagd zijn. Ten gevolge hiervan hebben deze granulocyten met verlaagde CXCR<sub>1</sub> en CXCR<sub>2</sub> expressie een verhoogde adhesie en verlaagde migratie door het glomerulaire endotheel. Deze data suggereren een relatie tussen circulerend IL-8, chemokine receptoren en ophoping van granulocyten in de vaatwand. Echter, de rol van CXCR<sub>1/2</sub> in granulocyt adhesie is hiermee niet verklaard, aangezien ook eerder is aangetoond dat activatie van CXCR<sub>2</sub> een signaal voor sterke adhesie geeft. Daarom is het nodig dat het mechanisme achter de verhoogde adhesie van granulocyten zonder CXCR<sub>1/2</sub> expressie verder onderzocht wordt. In het bijzonder de betrokken adhesie moleculen en de eigenschappen en de structuur en functie van glomerulaire endotheelcellen zijn zeer interessant.

De mechanismen, die vaatschade veroorzaken zijn vooral gerelateerd aan ANCA. ANCA activeren de granulocyten wat leidt tot uitstoting van ROS en proteolytische enzymen, die direct de vaatwand beschadigen en de endotheelcellen aanzetten tot het rekruteren van nog meer ontstekingscellen. NETs worden gevormd door geactiveerde granulocyten. Deze structuren concentreren PR<sub>3</sub> en MPO op het granulocyt oppervlak, zodat ANCA ze kunnen herkennen. Andere autoantistoffen, AECA, komen ook voor bij AAV. Echter, hun specifieke antigenen op endotheelcellen zijn nog niet gevonden. Wij hebben geen pathogene rol voor AECA in onze studie in dit proefschrift gevonden, maar kunnen niet uitsluiten dat ANCA antigenen op endotheelcellen ANCA-geïnduceerde schade kunnen mediëren.

Herkenning van PR<sub>3</sub> of MPO door ANCA is een vereiste voor activatie van granulocyten. Expressie van deze ANCA-antigenen op de membraan wordt geïnduceerd door pro-inflammatoire cytokines, zoals TNF- $\alpha$  en IL-1 $\beta$ , en verder wordt mPR<sub>3</sub> expressie sterk verhoogd tijdens adhesie van de granulocyt. CD<sub>177</sub> is een receptor voor PR<sub>3</sub> op granulocyten. De fysieke interactie tussen deze twee moleculen is echter nog niet duidelijk. CD<sub>177</sub> is waarschijnlijk een adhesie molecuul, en  $\beta$ 2-integrines, belangrijke adhesiemoleculen op granulocyten, co-



lokaliseren met PR<sub>3</sub> in lipid-rafts en geven signalen door in de cel als ANCA binden aan PR<sub>3</sub>. Daarom kan membraan PR<sub>3</sub> expressie niet langer beschouwd worden als een gebeurtenis onafhankelijk van granulocyt-endotheel interactie. In deze context is het complex van moleculen van belang, dat co-lokaliseert op de membraan met PR<sub>3</sub>, zoals CD177 en  $\beta$ 2-integrines. De functie van dit complex is waarschijnlijk om de granulocyten te rekruteren en dicht bij het endotheel te brengen. Verder speelt het bij AAV een rol in de PR<sub>3</sub>-ANCA gemedieerde granulocyt aktivatie en daaruit resulterende vaatschade.

We hebben laten zien dat het percentage CD177<sup>+</sup> granulocyten verhoogd is bij AAV, en dit is de reden voor een verhoogd percentage granulocyten met hoge mPR<sub>3</sub> expressie. Deze scheve verdeling zou genetisch bepaald kunnen zijn. Echter, verhoogde CD177<sup>+</sup> zijn ook gevonden bij andere ziektebeelden, zoals bij ernstige infectie, behandeling met G-CSF of zwangerschap, suggererend dat er een ander mechanisme bestaat wat de balans tussen granulocyt subsets bepaalt. Wanneer bekend is waarom CD177<sup>-</sup> verschillend tot expressie komt in granulocyten zou dit mechanisme duidelijk kunnen worden. Functionele gevolgen van verhoogde CD177/mPR<sub>3</sub> expressie bij AAV zijn afhankelijk van de moleculaire functie van CD177, of zou tot uiting kunnen komen in verschillen in functie tussen CD177<sup>+</sup> en CD177<sup>-</sup> granulocyt subsets. Het feit dat CD177 kan binden aan PECAM-1 leidt niet tot verschillen in adhesie of migratie tussen de subsets. Granulocyten worden gelijkmatig geactiveerd door PR<sub>3</sub>-ANCA, onafhankelijk van CD177 expressie, suggererend dat CD177 niet betrokken is bij de signaal transductie route na PR<sub>3</sub>-ANCA binding. Tenslotte, analyse van genexpressie van het hele genoom onthulde dat genen van granule eiwitten verhoogd tot expressie komen in CD177<sup>-</sup> granulocyten ten opzichte van CD177<sup>+</sup> granulocyten. Deze bevinding kan een uitgangspunt vormen voor het ontrafelen van de karakteristieken van deze granulocyten subsets en de pathogene rol van dit molecule in AAV.

Concluderend kunnen we stellen dat de interactie tussen granulocyten en endotheelcellen van groot belang is voor de ontwikkeling van de ziekte en voor interventie. Verlaagde expressie van CXCR<sub>1</sub> en CXCR<sub>2</sub> is bevorderlijk voor de ophoping van granulocyten in de kleine vaten. De rol van AECA in dit proces is niet erg belangrijk. Membraan expressie van ANCA-antigenen zoals PR<sub>3</sub> wordt op-gereguleerd tijdens rekrutering van granulocyten. CD177 is verantwoordelijk voor PR<sub>3</sub> expressie, maar niet essentieel voor PR<sub>3</sub>-ANCA gemedieerde activatie van granulocyten. Het onderliggende mechanisme voor de verhoogde

percentages  $CD177^+/PR3^{hi}$  granulocyten bij AAV is niet duidelijk. Verschillen in gen expressie tussen  $CD177^+$  en  $CD177^-$  subsets laten zich niet eenvoudig vertalen naar verschillen in functie, maar duiden eerder op verschillen in rijping of aktivatie van granulocyten. Deze populaties zijn uit balans in AAV, maar verdere studies zullen moeten uitwijzen wat de pathofysiologische betekenis hiervan is.

