

University of Groningen

## Effector mechanisms of ANCA-associated glomerulonephritis

van der Veen, Betty Sita

**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:*

2010

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

*Citation for published version (APA):*

van der Veen, B. S. (2010). *Effector mechanisms of ANCA-associated glomerulonephritis*. 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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**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.*

# *Appendix*

*Nederlandse samenvatting  
(voor niet-ingewijden)*

## WAT IS ANCA-GEASSOCIEERDE GLOMERULONEFRITIS?

### Glomeruli en glomerulonefritis

Bloedvaten zijn essentieel voor het functioneren van het menselijk lichaam. Niet alleen verzorgen ze het transport van bloed en daarmee het transport van zuurstof, voedingsstoffen en afvalstoffen naar en van organen, ze hebben ook orgaan-specifieke functies. Zo zorgen de kleine bloedvaten van de nierfilters, de glomeruli, ervoor dat het bloed wordt gezuiverd van afvalstoffen. Glomeruli zijn kluwen van kleine bloedvaatjes die werken als een soort zeef. De glomeruli laten water en kleine moleculen door terwijl ze belangrijke eiwitten en bloedcellen in de bloedbaan houden. Het gefiltreerde product van water en kleine moleculen resulteert uiteindelijk in urine. De cellen die de binnenkant van een bloedvat bekleden, de endotheelcellen, spelen een belangrijke rol bij het uitvoeren van de functies van een bloedvat. Zo zijn de endotheelcellen van de glomerulus selectief doorlaatbaar en daardoor bepalen ze mede het functioneren van het glomerulaire filter.

Wanneer een bloedvat ontstoken raakt, spreken we van vasculitis. Vasculitis wordt gekenmerkt door vernietiging van de wand van het bloedvat waardoor lekkage of vernauwing van het vat optreedt. Vasculitis kan voorkomen in bloedvaten van elke grootte en elk type. De ontstekingen kunnen beperkt zijn tot één orgaan (orgaan-gelimiteerde vasculitis) maar ook kunnen bloedvaten in meerdere organen aangedaan zijn (systemische vasculitis). Wanneer er sprake is van vasculitis in de glomeruli van de nier, dan wordt dat glomerulonefritis genoemd. Glomerulonefritis wordt gekenmerkt door schade aan de glomerulaire bloedvaten, infiltratie van ontstekingscellen (witte bloedcellen) in de glomerulus en lekkage van eiwit en rode bloedcellen naar de urine. De glomerulaire schade kan uiteindelijk leiden tot het dichtslibben van een glomerulus. Wanneer teveel glomeruli zijn aangedaan, resulteert dat in nierfalen.

### ANCA-geassocieerde glomerulonefritis

ANCA-geassocieerde vasculitiden zijn systemische vasculitiden die voornamelijk kleine tot middelgrote bloedvaten aandoen en gekenmerkt worden door de aanwezigheid van anti-neutrofiële cytoplasmatische autoantistoffen (ANCA). Tot de groep van ANCA-geassocieerde vasculitiden behoren de ziekte van Wegener, microscopische polyangiitis, het syndroom van Churg-Strauss en nier-gelimiteerde vasculitis. ANCA-geassocieerde vasculitiden zijn relatief zeldzame ziekten (met een jaarlijkse incidentie van ongeveer 20 per miljoen in Europese populaties) maar ze hebben een extreem hoge mortaliteit. De mortaliteit van onbehandelde Wegener's granulomatose is ongeveer 80% na 1 jaar en nadert de 100% na 5 jaar. Alhoewel ANCA-geassocieerde vasculitiden meerdere organen kunnen aandoen, zijn de longen en de nieren het vaakst betrokken. Als er sprake is van vasculitis in de nieren, dan uit zich dat als glomerulonefritis en spreken we van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis.

**Het ziekteverwekkende mechanisme van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis**

ANCA-geassocieerde glomerulonefritis is een autoimmuunziekte. Het immuunsysteem is het menselijk afweermechanisme tegen vreemde ziekteverwekkende indringers zoals bacteriën en virussen. Het immuunsysteem werkt onder andere via antilichamen. Antilichamen zijn immuunglobulinen die zeer specifiek gericht zijn tegen één vreemd eiwit. Samen met ontstekingscellen vallen antilichamen de indringers aan. In het geval van een autoimmuunziekte is het immuunsysteem echter gericht tegen een lichaamseigen eiwit waardoor cellen van de patiënt zelf worden aangevallen.

Patiënten met ANCA-geassocieerde glomerulonefritis hebben autoantilichamen (ANCA) van het immuunglobuline type G (IgG) die gericht zijn tegen enzymen van ontstekingscellen. Enzymen zijn een groep van eiwitten die enzymatische activiteit hebben. De meest voorkomende enzymen waartegen ANCA gericht zijn, zijn de enzymen myeloperoxidase (MPO) en proteinase 3 (Pr3). Deze enzymen zitten met name in ontstekingscellen van het type neutrofiële granulocyt (neutrofielen) maar ook in mindere mate in het type monocyt. Bij een patiënt met ANCA-geassocieerde glomerulonefritis binden ANCA in de bloedbaan aan neutrofielen waardoor de neutrofielen geactiveerd raken. ANCA-geactiveerde neutrofielen gaan vervolgens een interactie aan met endotheelcellen van glomerulaire bloedvaten. In reactie op neutrofielactivatie wordt er een ontstekingsreactie ontketend waarbij nog meer ontstekingscellen naar de glomerulus komen. ANCA-geactiveerde neutrofielen geven ter plaatse eiwit-afbrekende enzymen en oxiderende stoffen af die schadelijk zijn voor cellen in de directe omgeving. Doordat de neutrofielen in interactie zijn met glomerulaire endotheelcellen worden deze endotheelcellen vernietigd waardoor glomerulaire schade ontstaat.

**DOEL VAN DIT PROEFSCHRIFT**

ANCA-geassocieerde glomerulonefritis is een zeldzame maar ernstige aandoening die gekarakteriseerd wordt door een hoge mortaliteit indien niet direct met behandeling wordt gestart. De huidige behandeling van patiënten met deze aandoening berust op aspecifieke onderdrukking van het immuunsysteem. Deze behandeling is vaak niet toereikend en gaat gepaard met ernstige bijwerkingen. Om deze redenen zijn specifiekere therapieën met een grotere effectiviteit en minder bijwerkingen noodzakelijk. Meer inzicht in het ziekteverwekkende mechanisme dat aan ANCA-geassocieerde glomerulonefritis ten grondslag ligt, kan bijdragen aan de ontwikkeling van specifiekere behandelstrategieën.

Het doel van dit proefschrift was daarom het verder onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan en het verloop van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. De nadruk lag hierbij op het identificeren van aangrijpingspunten voor efficiëntere therapieën en op het testen van experimentele therapieën. Tijdens het onderzoek is gebruik gemaakt van cellen afkomstig van de mens (neutrofielen en glomerulaire endotheelcellen) en van een muismodel voor

ANCA-geassocieerde glomerulonefritis dat gebaseerd is op toediening van antilichamen tegen MPO.

## RESULTATEN VAN DIT PROEFSCHRIFT

Het is tot op heden niet duidelijk waarom de ziekteverwekkende ANCA ontstaan bij patiënten. Wat we echter wel weten, is dat ANCA-geassocieerde glomerulonefritis een multifactoriële ziekte is. De activiteit van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis hangt niet alleen af van immunologische factoren maar ook van omgevingsfactoren (zoals infecties) en genetische factoren. In dit proefschrift hebben we enkele van deze factoren nader bekeken, waaronder de factoren infectie, ANCA, ontstekingscellen, complement en kinases.

### Infectie

De belangrijkste aanwijzing dat infecties belangrijk kunnen zijn voor ANCA-geassocieerde glomerulonefritis, is de waarneming dat neutrofielen een extra stimulans (*priming*) nodig hebben voordat ze vatbaar zijn voor activatie door ANCA. Een infectie veroorzaakt de productie van ontstekingsstoffen die zo'n extra stimulans kunnen realiseren. Op hetzelfde moment activeren deze ontstekingsstoffen endotheelcellen, waardoor de interactie tussen het endotheel en neutrofielen wordt versterkt.

In **hoofdstuk 2** hebben we gekeken naar één zo'n ontstekingsstof: de complementfactor C5a. Het complementsysteem is een belangrijk onderdeel van het immuunsysteem en C5a speelt een centrale rol in de functie van complement (het complementsysteem wordt uitgebreider behandeld in de paragraaf *complement*). We ontdekten dat C5a humane neutrofielen kan *primen* voor activatie door zowel Pr3-ANCA als MPO-ANCA en dat dit proces afhankelijk is van het enzym p38MAPK (de rol van dit enzym wordt uitgebreider behandeld in de paragraaf *kinases*). Bovendien bleek C5a in staat om glomerulaire endotheelcellen te activeren om de ontstekingscel-aantrekkende stoffen (chemokines) IL-8 en MCP-1 te produceren. Deze bevindingen suggereren dat als het complementsysteem wordt geactiveerd tijdens ANCA-geassocieerde glomerulonefritis, C5a kan zorgen voor *priming* van neutrofielen en activatie van endotheelcellen en op die manier kan bijdragen aan de beschadiging van bloedvaten.

Daarnaast is gebleken dat bacteriële producten, zoals het endotoxine lipopolysaccharide (LPS), glomerulonefritis kunnen verergeren in diermodellen van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. In **hoofdstuk 3** hebben we onderzocht wat het achterliggende mechanisme is van ernstigere glomerulonefritis veroorzaakt door LPS in een MPO-ANCA muismodel. We ontdekten dat de aanwezigheid van TLR4, de receptor voor LPS, nodig was op cellen afkomstig van het bloed (ontstekingscellen) als ook op cellen van de nier om maximale schade aan de glomerulus te bewerkstelligen. Deze bevinding laat zien dat zowel ontstekingscellen als niercellen geactiveerd door een bacteriële infectie kunnen bijdragen aan ANCA-geassocieerde glomerulonefritis.

De resultaten van **hoofdstukken 2 en 3** ondersteunen de hypothese dat ontstekingsstimuli

bijdragen aan ANCA-geassocieerde glomerulonefritis, doordat ze neutrofielpriming en endotheelactivatie bevorderen. De aanwezigheid van een infectie tijdens actieve ANCA-geassocieerde glomerulonefritis zal de ziekte dan ook waarschijnlijk verergeren. Of infecties ook daadwerkelijk betrokken zijn bij het ontstaan van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis zal nog verder moeten worden onderzocht.

## ANCA

De algemene opvatting is dat ANCA ziekteverwekkend zijn en bijdragen aan het ontstaan en verloop van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Een beter begrip van de ziekteverwekkende eigenschappen van het ANCA IgG molecuul zou kunnen leiden tot nieuwe aangrijpingspunten voor therapieën.

In **hoofdstuk 4** hebben we daarom gekeken naar de rol van suikergroepen aan het Fc-gedeelte van het ANCA IgG molecuul. ANCA IgG gebruikt zijn Fc-gedeelte om aan Fc $\gamma$ -receptoren op de neutrofiel te binden en zo neutrofielen te activeren: een essentiële stap in de pathogenese van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Met behulp van het bacteriële enzym EndoS kunnen we specifiek de suikergroepen van IgG Fc afknippen. We hebben ontdekt dat ANCA IgG waarvan de Fc suikers waren afgeknipt door EndoS, minder goed in staat waren om neutrofielen te activeren. Tevens veroorzaakten suikerloze ANCA IgG moleculen geen glomerulonefritis in een MPO-ANCA muismodel. Bovendien ontwikkelden muizen een minder ernstige glomerulonefritis wanneer de muizen kort na het induceren van de ziekte werden behandeld met EndoS. Deze resultaten suggereren dat de suikergroepen een belangrijke rol spelen bij het ontstaan van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis en dat het verwijderen van de suikergroepen van ANCA een veelbelovende additionele therapie kan zijn. Meer onderzoek naar de veiligheid, specificiteit en effectiviteit van een EndoS-behandeling is echter noodzakelijk voordat zo'n therapie kan worden toegepast in mensen.

Het is nog onduidelijk of inductie van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis afhankelijk is van specifieke antilichaam subklassen of antigeenepitopen van de ANCA IgG moleculen. In **hoofdstuk 5** hebben we daarom getest of een combinatie van anti-MPO monoklonale antilichamen van verschillende subklassen en gericht tegen verschillende antigeenepitopen, glomerulonefritis kunnen veroorzaken in muizen van de 129S6 stam. Muizen van deze stam zijn relatief gevoelig voor het ontwikkelen van glomerulonefritis in vergelijking met de muizenstam die doorgaans wordt gebruikt in het MPO-ANCA model (de C57BL/6 stam). We ontdekten dat een specifieke combinatie van drie anti-MPO monoklonale antilichamen in 129S6 muizen glomerulonefritis induceerde onder de voorwaarde dat de antilichamen samen met LPS werden toegediend. Dit resulteerde in een milde vorm van glomerulonefritis. Een ernstigere vorm van glomerulonefritis kan wellicht gerealiseerd worden door het aanpassen van de dosis van de anti-MPO antilichamen. In dat geval zou de muizenstam 129S6 kunnen dienen als model voor het verder bestuderen van het ziekteverwekkende vermogen van specifieke ANCA IgG subklassen en antigeenepitopen.

## Ontstekingscellen

Ontstekingscellen, met name neutrofielen, zijn erg belangrijk bij het ontstaan van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Het blokkeren van de migratie van ontstekingscellen naar de plaats van ontsteking (de glomerulus) zou daarom mogelijk kunnen fungeren als therapie voor ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Een groep van ontstekingsstoffen die met name betrokken zijn bij het aantrekken van ontstekingscellen, is de groep van chemokines. In **hoofdstuk 6** hebben we de genexpressie van chemokines en hun receptoren in het MPO-ANCA muismodel bepaald. We hebben hierbij op verschillende tijdstippen en op verschillende locaties in de nier gekeken. Het doel was om potentiële doelwitten voor therapie te identificeren. Het bleek dat enkele chemokines en chemokinereceptoren verhoogd tot expressie kwamen tijdens anti-MPO-geïnduceerde glomerulonefritis, met name in de glomerulus. Tussen de genen die verhoogd tot expressie kwamen, zaten chemokines en chemokinereceptoren die betrokken zijn bij het aantrekken van neutrofielen en monocytten. Dit suggereert dat deze chemokines en receptoren als doelwit zouden kunnen dienen om het aantrekken van een specifieke soort ontstekingscel te remmen tijdens het ontstaan van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. De verhoogde expressie van één specifieke chemokinereceptor, CXCR2, en zijn liganden, CXCL1 en CXCL2, leek te correleren met de aanwezigheid van neutrofielen in de glomeruli. Dit suggereerde dat het blokkeren van CXCR2 of zijn liganden het aantrekken van neutrofielen en de daarmee gepaard gaande glomerulaire schade zou verminderen. Het blokkeren van de CXCR2 liganden leidde inderdaad tot een gedeeltelijke vermindering van het aantal neutrofielen in en schade aan de glomeruli (**hoofdstuk 3**). Aan de andere kant, het blokkeren van de CXCR2 receptor resulteerde in een toename van het aantal neutrofielen in de glomeruli terwijl de uiteindelijke schade aan de glomeruli niet veranderde (**hoofdstuk 6**). Deze tegenstrijdige resultaten kunnen niet gemakkelijk worden verklaard, maar mogelijk worden ze veroorzaakt door verschillen in de experimentele opzet in de beide hoofdstukken. Een andere mogelijkheid is dat CXCL1 en CXCL2 een andere, nog niet geïdentificeerde, receptor kunnen activeren. Deze resultaten laten in ieder geval zien dat het blokkeren van een specifiek chemokine-chemokinereceptor paar alleen effectief kan zijn als behandeling indien het uitgesloten is dat de functie van het geblokkeerde doelwit wordt overgenomen door andere chemokines of chemokinereceptoren. In het geval van de CXCR2-liganden betekent dit dat er meer onderzoek moet worden gedaan naar de exacte rol van deze neutrofiel-aantrekkende ontstekingsstoffen bij het ontstaan van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis.

## Complement

Het complementsysteem is onderdeel van het immuunsysteem en belangrijk voor de verdediging tegen bacteriële infecties. Complement kan geactiveerd worden via drie verschillende routes: de klassieke, de lectine en de alternatieve route. Alle drie de routes leiden uiteindelijk tot activatie van complementcomponent C5. C5 wordt vervolgens gesplitst tot de componenten C5a en C5b, die allebei bijdragen aan de verdediging tegen bacteriën. In eerdere studies in het MPO-ANCA

muismodel is aangetoond dat activatie van complement via de alternatieve route essentieel is voor het ontstaan van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Ook bleek dat het remmen van complementcomponent C5 (met een blokkerend antilichaam) en het remmen van de C5a receptor (C5aR; via een geïnduceerde genetische deficiëntie) in de muizen de ontwikkeling van glomerulonefritis verminderde. Het is echter nog niet bekend of de C5a-C5aR interactie ook een rol speelt in ANCA-geassocieerde glomerulonefritis in de mens. In **hoofdstuk 2** lieten we zien dat C5a in staat is om humane neutrofielen te *primen* en om humane glomerulaire endotheelcellen te activeren. Bovendien constateerden we dat de C5aR verhoogd tot expressie kwam in beschadigde glomeruli van nieren van patiënten met ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Deze bevindingen dragen bij aan de hypothese dat C5 of C5aR als doelwit zouden kunnen dienen voor de behandeling van patiënten met ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Er zijn enkele specifieke C5- en C5aR-remmers beschikbaar die veilig zijn bevonden voor humane toediening. Dit biedt mogelijkheden voor het testen van de effectiviteit en veiligheid van deze remmers voor de behandeling van patiënten met ANCA-geassocieerde glomerulonefritis in klinische studies.

### **Kinases**

De activatie van neutrofielen door binding van ANCA aan MPO/Pr3 en Fc $\gamma$ R wordt onder andere veroorzaakt door activatie van kinases (een groep van enzymen) zoals fosfatidylinositol-3 kinase (PI3K). Daarnaast is het p38 mitogeen-geactiveerd eiwit kinase (p38MAPK) betrokken bij de *priming* van neutrofielen voor ANCA-gemedieerde activatie. De activatie van kinases tijdens stimulatie met ANCA suggereert dat het blokkeren van specifieke kinases wellicht neutrofiel activatie en ANCA-geassocieerde glomerulonefritis kan voorkomen. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat de mate van glomerulonefritis ontwikkeling in een MPO-ANCA muismodel inderdaad afneemt als PI3K geblokkeerd wordt met een specifieke remmer. In **hoofdstuk 7** hebben we getest of specifieke blokkering van p38MAPK ook het ziekteverwekkende vermogen van ANCA kon verminderen, zowel in humane cellen als in het MPO-ANCA muismodel. We ontdekten dat blokkering van p38MAPK ANCA-gemedieerde activatie van neutrofielen en LPS-geïnduceerde productie van ontstekingsstoffen door glomerulaire endotheelcellen verminderde. Ook in het MPO-ANCA muismodel werd de schade aan de glomeruli gereduceerd na remming van p38MAPK, alhoewel er geen vermindering was van de hoeveelheid geëkt eiwit en bloed in de urine. Deze resultaten laten zien dat het blokkeren van p38MAPK in het muismodel een aantal aspecten van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis remt maar niet het totale ontstekingsproces. Dit suggereert dat het remmen van p38MAPK niet geschikt zal zijn voor de behandeling van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Bovendien doen deze resultaten vermoeden dat het specifiek blokkeren van kinases die direct geactiveerd worden door ANCA (zoals PI3K) effectiever is dan het blokkeren van kinases betrokken bij neutrophil *priming* (zoals p38MAPK).



## CONCLUSIE

Het ontstaan en het verloop van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis wordt bepaald door een combinatie van omgevings-, immunologische en genetische factoren. Een infectie kan als een omgevingsfactor bijdragen aan de verergering van glomerulonefritis via het *primen* van neutrofielen en het activeren van endotheelcellen. Er is meer onderzoek nodig om te bepalen of infecties ook bijdragen aan het veroorzaken van glomerulonefritis. Daarnaast zijn verscheidene immunologische factoren, waaronder zowel ontstekingscellen als -stoffen, betrokken bij het ontstaan van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Het remmen van deze factoren zou de ontwikkeling van glomerulonefritis wellicht kunnen afremmen. Zo zijn het blokkeren van de C5a/C5aR interactie en het verhinderen van Fc $\gamma$ R activatie (bijvoorbeeld via enzymatische verwijdering van de suikergroepen van het ANCA IgG molecuul) veelbelovende therapeutische strategieën. Meer (klinische) studies zijn echter noodzakelijk om de veiligheid en effectiviteit van deze behandelingen te beoordelen. Aan de andere kant, ontstekingsstoffen en -enzymen die behoren tot systemen met veel biologische overtolligheid (dit wel zeggen: een groep van gerelateerde stoffen die elkaars functie (gedeeltelijk) kunnen overnemen), zoals chemokines en p38MAPK, lijken minder geschikt als doelwit voor therapieën voor ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. Naast omgevings- en immunologische factoren bepalen genetische factoren mede de gevoeligheid voor het ontwikkelen van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis. De muizenstam 129S6, welke erg gevoelig is voor het ontwikkelen van glomerulonefritis, kan dienen als een model om in detail te bestuderen welke genen deze gevoeligheid beïnvloeden. Daarnaast kan de 129S6 muizenstam ook dienen als model voor het testen van de pathogeniciteit van verschillende anti-MPO monoklonale antistoffen, om het belang van ANCA IgG subklassen en epitopspecificiteit voor het ontstaan van ANCA-geassocieerde glomerulonefritis te ontrafelen.