

Neutrophil endothelial cell interaction : investigations on TNF-[alpha] and E-selectin

Citation for published version (APA):

von Asmuth, E. J. U. (1995). *Neutrophil endothelial cell interaction : investigations on TNF-[alpha] and E-selectin*. Rijksuniversiteit Limburg.

Document status and date:

Published: 01/01/1995

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

The central theme of this thesis is the inflammatory interaction between neutrophils and endothelial cells. This inflammatory interaction is regulated by a number of soluble inflammatory mediators, which control the make-up of adhesion molecules on both cell types, and influence their behavior. The investigations presented in this thesis are part of the vast amount of novel information on adhesion molecules and cytokines published during the last decennium. On the basis of this new data, a picture arises in which the molecular basis of the different aspects of neutrophil behavior during inflammation can be defined:

- Selectins, adhesion molecules on both endothelium and neutrophils, mediate neutro-phil rolling by providing rapidly arising and rapidly disappearing highly avid binding sites.
- β_2 integrins on neutrophils guide chemotactic migration by providing delicately tuned affinity to a broth array of substrata, which increases at the side of the neutrophil where an agonist concentration is sensed exceeding the previous concentration.
- β_2 integrins can, in certain agonist and substrata-conditions, and in collaboration with CD43 on neutrophils, mediate a switch from 'migrating polar phenotype' to the 'immobilized spread phenotype' which is associated with neutrophil toxicity.
- Neutrophil agonists can be divided in 'chemotaxins' and 'secretagogues'. Chemotaxins, such as IL-8, can form gradients, thus supporting transendothelial migration and neutrophil accumulation at inflammatory sites. Secretagogues, such as TNF, support the aforementioned switch from 'migrating polar phenotype' to the 'immobilized spread phenotype' and initiate neutrophil toxicity.

The identification of these mediators, and the definition of their functions, which is depicted in detail in *chapter 1* of this thesis, has been of great benefit in understanding neutrophil behavior. The findings leave us with the challenge of translating this knowledge into clinical benefit for patients.

The experimental work presented in this thesis focusses on TNF, E-selectin, and the role of these molecules in neutrophil endothelial cell interaction. Investigations on these specific subjects are presented respectively in *chapter 3*, *chapter 4* and *chapter 5*.

In *chapter 2*, a short and more specific introduction to, and discussion of the experimental work is given.

In *chapter 3* the conditions which lead to the release of TNF and related cytokines (IL-6 and IL-8) were investigated. Mononuclear phagocytes, activated by lipopolysaccharides from the outer leaflet of gram negative bacteria are the 'classical' origin of soluble TNF during inflammation. TNF is, however, also released in response to other microbial surface components and serum-factors such as complement (*chapter 3.1*). Furthermore, TNF-release is shown not to be restricted to leukocytes, but to occur also by cytokine-activated renal epithelial cells (*chapter 3.2*). TNF thus can be associated with a wide array of inflammatory processes, which argues for a more basic role of TNF in inflammation. TNF-release by mononuclear phagocytes in response to lipopolysaccharides, is influenced by two homologous proteins, LPS binding protein, released during inflammation by the liver, and bactericidal/permeability-increasing protein, released by activated neutrophils. These two proteins can respectively increase and inhibit the detection of lipopolysaccharides by mononuclear phagocytes (*chapter 3.3*). Thus, TNF-release during gram-negative infection seems to be a host regulated event, rather than an overshoot-reaction to a bacterial 'toxin'.

Chapter 4 focusses on E-selectin, an inducible endothelial cell adhesion molecule which facilitates neutrophil 'rolling', the first step in neutrophil endothelial cell interaction during inflammation. Interference with E-selectin expression or E-selectin function thus might be effective in preventing neutrophil mediated inflammatory processes. E-selectin expression by endothelium is induced by the inflammatory mediators TNF and IL-1 and by bacterial lipopolysaccharides. Other factors can enhance E-selectin expression, such as IFN- γ (*chapter 4.2*) and yet unidentified serum factor(s) (*chapter 4.3*).

Furthermore, recognition of bacterial lipopolysaccharides by endothelial cells was shown to require CD14 (*chapter 4.4*). Future experiments will be necessary to determine the relevance of interference with E-selectin expression via these pathways. Besides mediating neutrophil rolling, E-selectin might have other functions. E-selectin is not stably expressed, but was found to be internalized rapidly after arriving on the cell-surface (*chapter 4.1*). The function of E-selectin internalization is unknown. By co-internalization of immune-complexes and soluble adhesion inhibiting factors, which are known to have affinity for

E-selectin, E-selectin might play an important role in decontaminating the circulation in situations of severe immunological challenge.

In *chapter 5*, the involvement of TNF and E-selectin in neutrophil-mediated endothelial cell damage was investigated. In comparison to other physiological neutrophil agonists, TNF showed to be the strongest trigger for neutrophil-mediated endothelial cell injury (*chapter 5.1 and 5.2*). TNF induced neutrophil mediated endothelial cell injury depended completely on TNF-activation of neutrophils (*chapter 5.1 and 5.3*), which identifies TNF as a representative of a novel group of neutrophil agonists. Endothelial cells did, however, participate in neutrophil activation by TNF, probably by expressing surface bound PAF in response to initial neutrophil H_2O_2 -release (*chapter 5.4*). TNF was not unique in its capacity to activate neutrophils. Fc γ RII mediated neutrophil activation, induced by a neutrophil binding anti-elastase monoclonal antibody was able to mimic TNF in its capacity to induce neutrophil respiratory burst activity (*chapter 5.2*). This mechanism might play a role in the pathogenesis of tissue damage in clinical auto-immune syndromes with circulating elastase-reactive antibodies, such as Wegener's granulomatosis.

TNF-induced neutrophil activation required specific adhesive interactions. The contributions of different adhesion-molecules, and of adhesion-molecule independent neutrophil adherence in TNF-induced neutrophil activation were evaluated. β_2 integrin member CD11b/CD18 mediated substrate-interaction appeared to be essential in neutrophil toxicity incited by TNF (*chapter 5.3*). Neutrophil CD11b/CD18 thus appears to be more than just an adhesion molecule. It controls the switch to a highly flattened phenotype which adapts the neutrophil to releasing its array of protein degrading enzymes and starting an ongoing burst of reactive oxygen species.

SAMENVATTING

De interactie tussen neutrofiële granulocyten en endotheelcellen tijdens ontstekings-processen staat centraal in dit proefschrift. Deze interactie wordt gestuurd door een aantal ontstekings-mediators, die de aanwezigheid van adhesie-moleculen op beide cel-typen reguleren, en het gedrag van deze cellen beïnvloeden.

De onderzoeken in dit proefschrift zijn ingebed in de grote hoeveelheid nieuwe informatie over cytokinen en adhesie-moleculen die de laatste 10 jaar verschenen is. Op basis van deze informatie kan een indeling gemaakt worden van de moleculaire basis van de verschillende fasen van neutrofiel-gedrag tijdens ontstekingen:

- Selectines, adhesie-moleculen die zowel op endotheelcellen als op neutrofielen voorkomen, zijn betrokken in neutrofiel 'rolling' doordat ze neutrofielen kortdurend krachtig aan de vaatwand kunnen verankeren.
- De op neutrofielen aanwezige β_2 integrins zijn van belang bij chemotactische bewegingen, doordat ze, aan die kant van de neutrofiel waar deze een verhoging in de concentratie van een chemotactische stof waarneemt, een gedoseerde affiniteits-toename kunnen teweegbrengen.
- β_2 integrins kunnen samen met CD43 op neutrofielen, wanneer de juiste substraat- en stimulus-condities aanwezig zijn, de neutrofiel laten veranderen van een 'polair migrerend fenotype' naar een 'geïmmobiliseerd uitgespreid fenotype', een vormverandering die in verband staat met neutrofiel-toxiciteit.
- Neutrofiel agonisten kunnen worden ingedeeld in 'chemotaxinen' en 'secretagogen'. Chemotaxinen, zoals IL-8, kunnen gradiënten vormen, die het uit de bloedbaan treden en het migreren naar ontstekings-centra van neutrofielen bewerkstelligen. Secretagogen, zoals TNF, bewerkstelligen de bovengenoemde vormverandering van neutrofielen, en induceren neutrofiel-toxiciteit.

De identificatie van deze mediators, en het ontrafelen van hun functie, hetgeen in *hoofdstuk 1* van dit proefschrift in detail uitgewerkt is, heeft een grote vooruitgang in het begrijpen van neutrofiel gedrag tijdens ontstekingen gegeven. Daarmee is een nieuwe uitdaging geschapen om dit begrip om te zetten in concrete vooruitgang in therapeutische mogelijkheden bij ontstekings-ziekten.

In het in dit proefschrift beschreven experimentele werk staan TNF, E-selectin en neutrofiel endotheelcel interactie centraal. De onderzoeken over deze specifieke onderwerpen zijn respectievelijk in *hoofdstuk 3, 4 en 5* weergegeven. Een korte, meer specifieke introductie in, en discussie van het experimentele werk in deze hoofdstukken wordt in *hoofdstuk 2* gegeven.

In *hoofdstuk 3* werden de condities onderzocht, die afgifte van TNF en andere cytokinen zoals IL-6 en IL-8 tot gevolg hebben. Door lipopolysacchariden uit de buitenwand van gram negatieve bacteriën (endotoxinen) gestimuleerde mononucleaire fagocyten, vormen de 'klassieke' bron van TNF tijdens ontstekingsprocessen. De afgifte van TNF en andere cytokinen kan echter ook veroorzaakt worden door andere microbiële oppervlakte-componenten en door serum-factoren zoals complement (*hoofdstuk 3.1*), terwijl ook andere cellen dan leukocyten, zoals uit de nier afkomstige epitheelcellen, een belangrijke cytokinen-bron bleken te kunnen zijn (*hoofdstuk 3.2*).

Gezien de veelheid van ontstekings-processen welke met TNF-afgifte gepaard gaan, lijkt een fundamentele rol voor TNF bij ontstekingen waarschijnlijk. TNF-afgifte door mononucleaire fagocyten in aanwezigheid van endotoxinen wordt beïnvloed door twee homologe eiwitten, 'LPS binding protein' afgegeven door de lever tijdens systemische ontstekingen, en 'bactericidal/permeability increasing protein' afgegeven door geactiveerde neutrofielen. Deze eiwitten kunnen de detectie van endotoxinen door mononucleaire fagocyten stimuleren respectievelijk blokkeren (*hoofdstuk 3.3*). Dit impliceert dat TNF-afgifte gedurende gram-negatieve infecties eerder een door de gastheer gereguleerd fenomeen is, dan een uit de hand gelopen reactie op een bacterieel toxine.

In *hoofdstuk 4* staat E-selectin centraal, een induceerbaar endotheelcel adhesiemolecuul dat neutrofiel 'rolling', de eerste stap in neutrofiel endotheelcel interactie tijdens ontstekingen, mogelijk maakt. Het blokkeren van de expressie of de functie van E-selectin zou zodoende neutrofiel gemedieerde ontstekings-schade kunnen voorkomen. E-selectin expressie wordt veroorzaakt door ontstekingsmediatoren zoals TNF en IL-1 en door endotoxine. Andere factoren kunnen E-selectin expressie verhogen, zoals IFN- γ (*hoofdstuk 4.2*) en bepaalde nog ongeïdentificeerde serum bestanddelen (*hoofdstuk 4.3*). In door endotoxine veroorzaakte E-selectin expressie spelen CD14 receptoren een essentiële rol (*hoofdstuk 4.4*).

Toekomstig onderzoek zal moeten uitmaken of interventie met E-selectin expressie via één van deze routes zinvol is.

E-selectin zou, naast een rol bij neutrofiel 'rolling', nog andere functies kunnen hebben. E-selectin-moleculen worden niet stabiel tot expressie gebracht, maar bleken na een kort verblijf aan het cel-oppervlak weer geïnternaliseerd te wor-

den. De functie van E-selectin internalisatie is onbekend. Via co-internalisatie van immuun-complexen en adherentie remmende factoren, stoffen waarvan bekend is dat deze affiniteit voor E-selectin hebben, zou E-selectin een belangrijke rol kunnen spelen in het 'schoon houden' van de circulatie tijdens ernstige ontstekingsprocessen (*hoofdstuk 4.1*).

In *hoofdstuk 5* werd de betrokkenheid van TNF en E-selectin in neutrofiel gemedieerde endotheelcel-schade onderzocht. Aanwezigheid van TNF bleek uitgebreide neutrofiel-gemedieerde endotheelcel-schade te kunnen veroorzaken (*hoofdstuk 5.1*). TNF bleek krachtiger dan andere fysiologische neutrofiel agonisten in het induceren van H_2O_2 productie door neutrofielen en van endotheelcel-schade (*hoofdstuk 5.1*), hetgeen TNF identificeert als een vertegenwoordiger van een nieuwe groep neutrofiel agonisten. Hoewel TNF-activatie van endotheelcellen geen rol bleek te spelen bij TNF-geïnduceerde endotheelcel schade (*hoofdstuk 5.1 en 5.3*), bleken endotheelcellen wel een actief aandeel te hebben in neutrofiel-activatie door TNF, waarvoor membraangebonden PAF, geïnduceerd op de endotheelcel door blootstelling aan H_2O_2 van de geactiveerde neutrofiel, verantwoordelijk lijkt (*hoofdstuk 5.4*). Het vermogen van TNF om H_2O_2 productie door neutrofielen te veroorzaken bleek niet uniek te zijn. Sterke en langdurige zuurstof-radicaal productie door neutrofielen werd ook veroorzaakt door een neutrofiel bindend anti-elastase monoclonaal antilichaam (*hoofdstuk 5.2*). Dit mechanisme kan een rol spelen in de pathogenese van weefsel-schade in klinische auto-immuun syndromen met circulerende elastase-bindende anti-lichamen, zoals in de ziekte van Wegener.

TNF-geïnduceerde neutrofiel activatie bleek afhankelijk te zijn van specifiek oppervlakte-contact. De rol van verschillende adhesie-moleculen, en van adhesie-molecuul onafhankelijke neutrofiel adherentie, in TNF-geïnduceerde neutrofiel activatie werd onderzocht. Substraat-contact via de β_2 integrin vertegenwoordiger CD11b/CD18 bleek onmisbaar te zijn voor neutrofiel toxiciteit geïnduceerd door TNF (*hoofdstuk 5.3*). Neutrofiel CD11b/CD18 blijkt zodoende meer te zijn dan een adhesie-molecuul. Het controleert de verandering van de neutrofiel van een polaire naar een plat uitgestrekte cel die de neutrofiel lijkt aan te passen aan het vrijmaken van zijn toxische areaal van eiwitplitsende en zuurstof radicaal producerende enzymen.