

DISSERTATION

Charakterisierung von neutrophilen Granulozyten und Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bei Granulomatose mit Polyangiitis (GPA)

Characterization of neutrophil granulocytes and Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Granulomatosis with polyangiitis (GPA)

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Spyridon Lipka

Erstbetreuung: PD Dr. med. Tobias Alexander

Datum der Promotion: 30.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung	5
1.1 Granulomatose mit Polyangiitis (GPA)	5
1.2 Pathophysiologie der GPA.....	6
1.2.1 Beitrag des angeborenen Immunsystems	6
1.2.2 Beitrag der B-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems.....	8
1.3 Fragestellung	9
2 Methodik	10
2.1 Material	10
2.2 Patientenpopulation	14
2.3 Zellpräparation	15
2.4 Durchflusszytometrie	15
2.5 NETosis Assay	18
2.6 NET-ELISA	18
2.7 DNase1-Assay	19
2.8 Anti-Proteinase-3-ELISA.....	19
2.9 Statistische Analyse.....	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Phänotypisierung der Zellen	20
3.1.1 Untersuchung der absoluten Zellzahlen im Blut.....	20
3.1.2 Phänotypisierung der NDGs und LDGs.....	22
3.1.3 Aktivierte dendritische Zellen und erhöhte Level von zirkulierenden Plasmablasten in GPA und SLE	24

3.2	NETose-Kapazität von NDGs und direkte NET-Quantifizierung im Blut.....	25
3.4	Degradierung induzierter NETs durch Patientenserum	27
3.5	Korrelationen	27
4.	Diskussion.....	30
4.1	Zusammenfassung	30
4.2	Phänotypisierung von Low Density Granulocytes (LDGs).....	30
4.3	Rolle von NETs in der Immunpathogenese von GPA.....	31
4.4	Rolle von mDCs und B-Zellen	32
4.5	Limitationen	33
4.6	Conclusio und Ausblick.....	34
	Literaturverzeichnis	36
	Eidesstattliche Versicherung	47
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	48
	Druckexemplar(e) der Publikation(en)	50
	Lebenslauf.....	70
	Komplette Publikationsliste	71
	Danksagung	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	S. 10
Tabelle 2: Pufferlösung und Medien	S. 10
Tabelle 3: FACS-Antikörper	S. 11
Tabelle 4: IFA-Primärantikörper	S. 12
Tabelle 5: IFA-Sekundärantikörper	S. 12
Tabelle 6: Enzyme	S. 12
Tabelle 7: Kits	S. 13
Tabelle 8: Weitere Materialien	S. 13
Tabelle 9: Geräte	S. 14
Tabelle 10: Software-Programme	S. 14
Tabelle 11: Cell-Count-Panel	S. 16
Tabelle 12: Neutrophilen-Panel	S. 16
Tabelle 13: B-Zell-Panel	S. 17
Tabelle 14: DC-Panel	S. 17
Tabelle 15: Cell Count	S. 21
Tabelle 16: Monozyten, Dendritische Zellen, B-Zellen	S. 24

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neutrophil Extracellular Traps	8
Abbildung 2: Quantifizierung von LDGs	21
Abbildung 3: Quantifizierung von NDGs	21
Abbildung 4: Phänotypische Analyse von LDGs und NDGs	23
Abbildung 5: Quantifizierung von NET-Produktion in vitro	26
Abbildung 6: Quantifizierung von NETs isoliert aus peripherem Blut und DNase1 assay	27
Abbildung 7: Korrelationen	29

Abkürzungsverzeichnis

AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitiden
AK	Antikörper
ANCA	Anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper
BVAS	Birmingham Vasculitis Activity Score
DC	Dendritic cell (dendritische Zelle)
mDC	myeloide dendritische Zelle
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
HD	Healthy donors (Gesunde Kontrollen)
LDG	Low Density Granulocytes
NDG	Normal Density Granulocytes
NE	Neutrophile Elastase
NETs	Neutrophil extracellular traps
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
RT	Raumtemperatur
SLE	Systemischer Lupus erythematoses

Zusammenfassung

Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die durch eine Entzündung der kleinen Blutgefäße gekennzeichnet ist und mit Bildung von Granulomen in vielen verschiedenen Organsystemen assoziiert ist, einschließlich der Lunge und der Nieren. Kennzeichnend für diese Krankheit sind anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA), die in den meisten Fällen gegen das Antigen Proteinase-3 (PR3) gerichtet sind. Die genaue Ursache der GPA ist noch nicht vollständig geklärt und die zugrunde liegende Immunpathogenese noch nicht vollständig verstanden, aber viele Mechanismen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems scheinen, eine wichtige Rolle zu spielen. In den letzten Jahren ist die Rolle von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in den Fokus der Forschung gerückt. NETs sind netzartige Strukturen, die aus einem DNA-Gerüst bestehen und verschiedene Proteine, wie Neutrophile Elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO), enthalten. Neutrophile Granulozyten wurden als Quelle dieser NETs identifiziert. Sobald sie auf Bakterien treffen, setzen Granulozyten NETs frei, um die Infektion zu bekämpfen. DNase1, eine Endonuklease im Blutserum, ist u.a. für den Abbau dieser NETs verantwortlich. In einer Vielzahl von verschiedenen Krankheiten, einschließlich maligner Erkrankungen, Infektionen und Autoimmunerkrankungen, konnte gezeigt werden, dass eine Untergruppe von Neutrophilen, die sog. Low Density Granulocytes (LDGs), eine entscheidende Rolle bei der fehlregulierten NETs-Produktion spielt.

Ziel dieser Studie war, die Rolle von neutrophilen Granulozyten und NETs in der Entwicklung von GPA eingehender zu untersuchen. Wir haben daher zunächst die Oberflächenmarker von Neutrophilen und anderen Immunzellen mittels FACS charakterisiert und ihre Fähigkeit zur Produktion von NETs untersucht sowie die Menge von NETs im Blutplasma mittels ELISA gemessen. Zusätzlich wurde die Fähigkeit von Patientenserum zur Degradation von NETs mit Hilfe eines DNase-Assay quantifiziert, der auf der Fluoreszenzabnahme von PicoGreen™ basiert.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Patienten mit GPA im Vergleich zu gesunden Spendern (HD) deutlich erhöhte Anzahl von LDGs im peripheren Blut aufwiesen. Diese LDGs zeigten einen stärker aktivierten und unreifen Phänotyp verglichen mit gesunden Kontrollen. Die Kapazität von Neutrophilen zur Freisetzung von NETs und die Menge zirkulierender

NETs im Blut war vergleichbar mit denen gesunder Spender. Allerdings war die Degradation von NETs *in vitro* bei GPA-Patienten signifikant eingeschränkt, was mit klinischen und serologischen Aktivitätsmarkern korrelierte. Zusätzlich konnten wir eine Aktivierung von myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) mit erhöhter Expression von OX40L und erhöhte Frequenzen zirkulierender Plasmablasten feststellen, was darauf hinweist, dass verschiedene Zelltypen zur Pathogenese von GPA beitragen.

Zusammenfassend deuten unsere Daten darauf hin, dass neutrophile Granulozyten und NETs an der Pathogenese von GPA beteiligt sind. LDGs waren in erhöhter Frequenz im peripheren Blut nachweisbar und wiesen einen unreifen und aktivierten Phänotyp auf. Obwohl zirkulierende NETs bei GPA nicht erhöht nachweisbar waren, konnte eine eingeschränkte Degradierung von NETs nachgewiesen werden. Da NETs spezifische Zielantigene bei GPA enthalten, z.B. PR3, NE oder MPO, könnte eine Exposition von NETs eine Quelle von Autoantigenen darstellen, die mit der Produktion von Autoantikörpern verbunden sein könnte.

Abstract

Granulomatosis with polyangiitis (GPA) is a chronic autoimmune disease characterized by inflammation of the small vessels and associated with the formation of granulomas in many different organ systems, including the lung and kidneys. Hallmark of this disease are anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies (ANCA), in most cases against the antigen Proteinase-3 (PR3). The exact cause of GPA is not yet fully understood and the underlying immunopathogenesis is still unclear, but it appears that many mechanisms from both the innate and the adaptive immune system play an important role. In recent years the role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) has gained attention. These NETs are web-like structures composed of a DNA-scaffold and containing different proteins such as neutrophil elastase (NE) and myeloperoxidase (MPO). Neutrophil granulocytes have been identified as the source of these NETs. Once they encounter bacteria granulocytes extrude NETs to combat the infection. DNase1, an endonuclease found in the blood serum, is i.a. responsible for the degradation of NETs. In a variety of different diseases, including malignancies, infectious and autoimmune diseases, one subset of neutrophils, the Low Density Granulocytes (LDGs), has been shown to play a vital role in the dysregulated production of NETs.

In this study we aimed to examine further the role of neutrophil granulocytes and NETs in the development of GPA. Therefore, we identified the surface markers of neutrophils using FACS. We also examined the ability of neutrophils to produce NETs and investigated the level of NETs directly in the blood plasma of patients using an ELISA. The NET-degradation ability of patient sera was also quantified by using a DNase-Assay, based on the quenching of PicoGreen™.

Our research shows that individuals with GPA had notably elevated levels of LDGs in peripheral blood when compared to healthy donors (HD). These LDGs showed a more activated and immature phenotype. The capacity of neutrophils to produce NETs and the amount of circulating NETs in the bloodstream were comparable to those of healthy donors. However, the degradation of NETs *in vitro* in GPA-patients was significantly impaired and this correlated with clinical and serological markers. Additionally, we could show an activation of myeloid dendritic cells (mDCs) with an elevated expression of OX40L and higher frequencies of circulating plasmablasts, indicating that different cell types contribute to pathogenesis of GPA.

In summary, our data support the notion of neutrophil granulocytes and NETs contributing to the pathogenesis of GPA. LDGs were detectable in increased frequency in peripheral blood and exhibited an immature and activated phenotype. Although circulating NETs were not significantly increased in GPA, a limited degradation of NETs could be demonstrated. Since NETs contain specific target antigens in GPA, such as PR3, NE, or MPO, exposure to NETs could represent a source of autoantigens that may be associated with the production of autoantibodies.

1 Einleitung

1.1 Granulomatose mit Polyangiitis (GPA)

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), früher auch als Morbus Wegener bekannt, ist eine Vaskulitis der kleinen und mittleren Blutgefäße (1). Diese Autoimmunerkrankung gehört zur Gruppe der ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAVs), die zurzeit anhand der EULAR/ACR-Klassifikationskriterien in drei große Gruppen eingeteilt werden: die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), die Mikroskopische Polyangiitis (MPA) und die Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA) (2). In Deutschland beträgt die Prävalenz für AAV ca. 150/Mio (für GPA ca. 58-98/Mio) und die Inzidenz ca. 12/Mio (für GPA ca. 6-12/Mio) (3, 4).

Charakteristisches Merkmal von AAVs ist die Produktion sog. antineutrophiler zytoplasmatischer Antikörper (ANCA) (5). Bei GPA sind diese fast ausschließlich gegen das Antigen Proteinase-3 (PR3), eine Serinprotease in den Granula der neutrophilen Granulozyten (6), gerichtet (5, 7). Ein weiteres Zielantigen ist die Myeloperoxidase (MPO), eine Peroxidase in neutrophilen Granulozyten und Monozyten, welche an der Produktion von ROS (reactive oxygen species) beteiligt ist und somit einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung von Bakterien leistet (8). Erhöhte MPO-ANCA-Titer können nicht nur bei GPA, sondern auch bei MPA nachgewiesen werden (7).

Wie bei allen AAVs können auch bei GPA verschiedene Organe betroffen sein, v.a. die oberen und unteren Atemwege (u.a. blutiger Schnupfen, nasale Ulzera, Knorpelbeteiligung des Nasenseptums) sowie die Nieren (9). Der Befall verschiedener Organsysteme trägt zu einem variablen Krankheitsbild bei. Die Mortalität ist trotz der Einführung von Biologika und anderer zielgerichteter Therapien gegenüber der Normalbevölkerung immer noch erhöht (3, 10, 11). Eine gefürchtete Komplikation stellt vor allem die rasch progrediente Glomerulonephritis (RPGN für rapidly progressive glomerulonephritis) dar, die zu einem terminalen Nierenversagen führen kann (12, 13, 14).

Im Verlauf der GPA kommt es zur Bildung von Granulomen, die aus einer Ansammlung von entzündlichen Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten bestehen (1, 15). Die Therapie der AAVs fußt auf einer Behandlungsstrategie mit Immunsuppressiva und immunmodulierenden Substanzen (z.B. Cyclophosphamid oder Rituximab) (16, 17).

1.2 Pathophysiologie der GPA

Die pathophysiologischen Mechanismen, die der GPA zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Mehrere Mechanismen werden diskutiert, wobei sowohl Komponenten des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems beteiligt sind (18). Dabei scheinen neutrophile Granulozyten eine zentrale Rolle in der Dysregulation des Immunsystems bei Patient:innen mit GPA zu spielen (18). Es handelt sich hierbei um weiße Blutkörperchen, die normalerweise dazu beitragen, Infektionen zu bekämpfen, indem sie Krankheitserreger auf verschiedene Weisen angreifen und eliminieren (19). Außerdem scheinen die B-Lymphozyten, als Teil des adaptiven Immunsystems, einen wichtigen Beitrag zur Pathogenese der GPA zu leisten (20, 21, 22).

1.2.1 Beitrag des angeborenen Immunsystems

Die Neutrophilen als Teil des angeborenen Immunsystems verfügen über eine Reihe von unterschiedlichen Bekämpfungsmechanismen, u.a. Apoptose, Nekrose, Pyroptose, Autophagie und NETose (19, 23, 24). Im Rahmen der GPA scheint allerdings die Produktion von Neutrophil Extracellular Traps, sog. NETs, eine herausragende Rolle zu spielen (18). NETs sind Netze aus DNA, Histonen und Protein, die von neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden (24, 25) (vgl. Abbildung 1). Verschiedene Proteine sind Bestandteile dieser NETs, u.a. PR3 und MPO (26). Wenn neutrophile Granulozyten mit einem potenziellen Krankheitserreger in Kontakt kommen, können sie während eines als NETose bezeichneten Prozesses ihre DNA-Stränge und antimikrobiellen Proteine in die Umgebung abgeben (24, 27, 28). Immunkomplexe können auch die Produktion von NETs stimulieren (29). Für den Abbau der NETs ist die extrazelluläre Endonuklease DNase1 verantwortlich, die sich im Serum befindet (30).

In den letzten Jahren rückte außerdem eine neue Subgruppe von neutrophilen Granulozyten in den Fokus, die Low Density Granulocytes (LDGs). Diese weisen eine geringere Dichte im Vergleich zu den Normal Density Granulocytes (NDGs) auf und werden aus der PBMC-Schicht (peripheral blood mononuclear cells) nach Blutzentrifugation auf einem Ficoll-Gradienten isoliert (31). Sie scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, z.B. Infektionen (32, 33) sowie Autoimmunerkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) (34) und der Multiplen Sklerose (35), zu spielen. Auch im Rahmen von AAVs wurden sie schon beschrieben (36). Abhängig von der untersuchten Krankheit zeichnen sie sich durch einen aktivierten Phänotyp aus

(34, 36, 37). Es konnte zudem gezeigt werden, dass LDGs von Patient:innen mit SLE und GPA vermehrt NETs produzieren (36, 38) und einen unreifen Phänotyp besitzen (37, 39, 40, 41). Die Gruppe der LDGs ist allerdings nicht abschließend definiert und ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten nicht abschließend geklärt (42). NETs von AAV-Betroffenen konnten außerdem in den Entzündungsherden verschiedener Organe, wie Niere (43) und Haut (44), nachgewiesen werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NETs von Makrophagen internalisiert werden (45) und dendritische Zellen über TLR7 und TLR9 aktivieren (46), was zu einer erhöhten Produktion von Interferon-alpha (IFN- α) (47), u.a. bei SLE, führt (48). Dendritische Zellen (DCs) sind Immunzellen, welche in der Lage sind, Antigene aufzunehmen, zu verarbeiten und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (49). Zwei wichtige Gruppen sind die plasmazytoiden DCs (pDCs) und die myeloiden DCs (mDCs) (50). Die pDCs exprimieren das Molekül CD123 (51) und sind bekannt für ihre Fähigkeit, große Mengen an Typ I Interferonen zu produzieren (52, 53), auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen (54). Insbesondere beim SLE ist eine erhöhte Produktion von IFN- α bekannt. Diese IFN- α produzierenden pDCs sind in der Lage, eine Entzündungsreaktion im Körper auszulösen und Autoantikörperproduktion zu fördern (55, 56, 57).

Die mDCs exprimieren das Molekül CD11c und MHC-II-Komplexe (58, 59, 60). Sie stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem dar, indem sie T-Lymphozyten aktivieren können (60). Diese T-Lymphozyten produzieren daraufhin Interferon-gamma (IFN- γ) (61). Außerdem induzierten Immunkomplexe bestehend aus RNA, welche vermehrt in NETs vorkamen, die Expression von OX40L auf mDCs in SLE (62). Die Beimpfung von gesunden Mäusen mit NET-geladenen mDCs resultierte in einer PR3- und MPO-ANCA-Produktion (44).

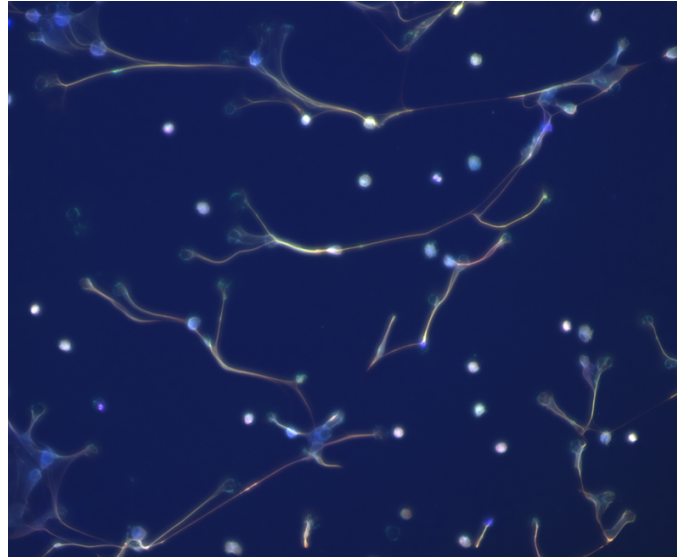


Abbildung 1: Neutrophil Extracellular Traps. Neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit PMA setzen Neutrophil Extracellular Traps (NETs) frei.

Quelle: eigene Darstellung

1.2.2 Beitrag der B-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems

B-Lymphozyten und Plasmablasten spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, u.a. durch die Produktion von Autoantikörpern und weiterer Mediatoren (63, 64). B-Lymphozyten sind spezialisierte Zellen des Immunsystems, die in der Lage sind, spezifische Antigene zu erkennen und nach Differenzierung in Plasmazellen Antikörper zu produzieren, um diese zu bekämpfen (65).

Plasmablasten sind kurzlebige Plasmazellen, die aus B-Lymphozyten entstehen und große Mengen an Antikörpern produzieren können (66). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, können aber auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen Autoantikörper produzieren, was zu Entzündungen und Gewebeschäden führen kann (67, 68).

In der Pathogenese der GPA konnte die Rolle von B-Lymphozyten nachgewiesen werden (69, 70, 71, 72). Ein wichtiger Pathomechanismus ist die Produktion von Autoantikörpern (ANCA) gegen die Antigene Proteinase-3 (PR3) oder Myeloperoxidase (MPO) (73). Die Bindung von ANCA an die entsprechenden Antigene kann zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und der Freisetzung von NETs führen (43, 74, 75). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass DNA-Sequenzen die Produktion von ANCA zur Folge haben kann (73).

Somit scheinen NETs ein gemeinsames Bindeglied zwischen den neutrophilen Granulozyten und den B-Zellen – zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem – darzustellen.

1.3 Fragestellung

Trotz der vielen Erkenntnisse ist die Rolle der einzelnen Zelltypen und Mechanismen, welche zur Entstehung der GPA beitragen, nicht abschließend geklärt. Ein Problem in der schon publizierten Literatur liegt häufig in der mangelhaften Unterscheidung zwischen GPA und AAVs – ein Begriff, unter den mehrere Krankheitsentitäten fallen. Diese Arbeit beschränkt sich deshalb auf eine definierte Krankheit (Granulomatose mit Polyangiitis). Gleichzeitig wurde versucht die unterschiedlichen Eigenschaften von NDGs und LDGs und ihren Beitrag in der Immunpathogenese zu beleuchten. Ausgehend von den oben angeführten Überlegungen zu dem vielschichtigen Beitrag sowohl des angeborenen (Neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, NETs) wie auch des adaptiven Immunsystems (B-Zellen) wurden folgende Ziele für diese Arbeit formuliert:

1. Die Phänotypisierung folgender Immunzellen: NDGs, LDGs, DCs und B-Zellen.
2. Ausgehend vom Konzept der NETose, als potentielle Antigenquelle für die diagnostisch wichtigen ANCA: die Quantifizierung von NETs direkt aus dem Plasma erkrankter Personen.
3. Die Untersuchung der NETose-Kapazität neutrophiler Granulozyten, frisch isoliert aus dem Vollblut.
4. Die Kapazität des Serums erkrankter Personen, die NETs abzubauen.

Als Kontrollgruppe dienten dabei gesunde Personen. Als zweite Vergleichsgruppe wurden Personen herangezogen, die an SLE litten.

2 Methodik

2.1 Material

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Firma
4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Thermo Fisher Scientific
ABTS	Merck
DMSO	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck
FcR blocking reagent, human	Miltenyi Biotec
eBioscience™ 1-step Fix/Lyse Solution (10X)	Invitrogen
Histopaque® 1119	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342 (Verdünnung 1:500)	Thermo Fisher Scientific
HSA, Gibco™	Thermo Fisher Scientific
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich
Percoll®	Cytiva
Tween-20	Sigma-Aldrich

Eigene Darstellung

Tabelle 2: Pufferlösungen und Medien

Pufferlösungen	Bestandteile
ELISA wash buffer	PBS, 0.05 % Tween-20
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (Merck)
IFA blocking buffer	PBS, 3 % (v/v) donkey serum, 3 % (v/v) cold water fish gelatine, 1 % (w/v) BSA , 0,5 % Tween 20 (v/v)

IFA Medium	RMPI 1640 Medium (without phenol red), 10mM Hepes, 0,2 % HAS
IFA permeation buffer	PBS, 0,5 % TritonX-100
MACS buffer	PBS, 0,2 % (w/v) HSA, 5 mM EDTA
PBS	Dulbecco's PBS (Thermo Fisher)
RMPI 1640 Medium (without phenol red)	Thermo Fisher Scientific

Eigene Darstellung

Tabelle 3: FACS-Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Firma
CD3	APC-Vio770	BW264/56	1:50	Miltenyi Biotec
CD3	PerCP	BW264/56	1:50	Miltenyi Biotec
CD4	VioBlue	REA623	1:50	Miltenyi Biotec
CD8	PE	REA734	1:50	Miltenyi Biotec
CD10	PerCP-Cy5.5	HI10a	25µg/mL	BD Pharmingen
CD11c	VioBlue	MJ4-27G12	1:50	Miltenyi Biotec
CD14	APC-Vio770	TÜK4	1:50	Miltenyi Biotec
CD14	FITC	TÜK4	1:50	Miltenyi Biotec
CD15	PE-Vio770	VIMC6	1:50	Miltenyi Biotec
CD16	VioGreen	REA423	1:50	Miltenyi Biotec
CD19	APC	REA675	1:50	Miltenyi Biotec
CD19	APC-Vio770	REA675	1:50	Miltenyi Biotec
CD19	VioBlue	REA675	1:50	Miltenyi Biotec
CD20	PE-Vio770	REA780	1:50	Miltenyi Biotec
CD24	PerCP-Vio700	REA832	1:50	Miltenyi Biotec
CD27	PE	M-T271	1:50	Miltenyi Biotec
CD33	FITC	REA775	1:50	Miltenyi Biotec
CD38	APC	IB6	1:50	Miltenyi Biotec

CD45	FITC	REA747	1:50	Miltenyi Biotec
CD56	APC-Vio770	REA196	1:50	Miltenyi Biotec
CD56	PE-Vio770	REA196	1:50	Miltenyi Biotec
CD62L	VioBlue	145/15	1:50	Miltenyi Biotec
CD63	PE	REA1055	1:50	Miltenyi Biotec
CD66b	APC	REA306	1:50	Miltenyi Biotec
CD123	PerCP/Cy5.5	6H6	5µl/Test	Biolegend
CD252/OX40L	APC	159403	10µl/Test	R&D Systems™
HLA-DR	VioGreen	REA805	1:50	Miltenyi Biotec
Anti-FCeR1a	APC-Vio770	CRA1	1:50	Miltenyi Biotec
IgD	FITC	IgD26	1:11	Miltenyi Biotec
Siglec-1	PE	7-239	5µl/Test	Biolegend

Eigene Darstellung

Tabelle 4: IFA-Primärantikörper

Primärantikörper	Herkunft	Verdünnung	Firma
anti-PL2-3	mouse	1:200	Made in house
anti-NE	rabbit	1:500	Calbiochem

Eigene Darstellung

Tabelle 5: IFA-Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Herkunft	Fluorochrom	Verdünnung	Firma
Anti-mouse Alexa568	goat	Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific
Anti-mouse Alexa488	goat	Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific

Eigene Darstellung

Tabelle 6: Enzyme

Enzym	Firma
DNAse1	New England Biolabs

DNase1 reaction buffer	New England Biolabs
------------------------	---------------------

Eigene Darstellung

Tabelle 7: Kits

Kit	Firma
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific
Elastase, Human, ELISA Kit	HycultBiotech
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche

Eigene Darstellung

Tabelle 8: Weitere Materialien

Material	Firma
24-Well-Platen	Sarstedt
96-Well-Platen	Sarstedt
Cover glasses 13 mm	Thermo Fisher Scientific
Eppendorfgefäße	Eppendorf
FACS tubes	BD
Falcons (50ml, 15ml)	Corning
Microscope slide	Marienfeld
Vacurette® Plasma K3EDTA (3 ml)	greiner bio-one
Vacurette® Lithium Heparin (9 ml)	greiner bio-one
Vacurette® Serum (5 ml)	greiner bio-one
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen 10 µl	Thermo Fischer Scientific
Pipettenspitzen 200 µl	Corning
Pipettenspitzen 1000 µl	Corning
Trucount™ tubes	BD Biosciences
Vacurette® Sicherheitsblutentnahmeset	greiner bio-one

Eigene Darstellung

Tabelle 9: Geräte

Gerät	Firma
Casy Cell Counter	OMNI Life Science
Centrifuge 5415D	Eppendorf
EVOS FL Auto2	Thermo Fisher Scientific
MACS Quant	Miltenyi Biotec
Multifuge 3S-R	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop2000	Thermo Fisher Scientific
Sonopuls Sonicator	Bandelin
Versa Max microplate reader™	Molecular devices
Victor X Light Luminescence Reader	Perkin Elmer

Eigene Darstellung

Tabelle 10: Software-Programme

Name	Version	Firma
GraphPad PRISM	8.0.2	GraphPad Software
MACS Quantify	2.11	Miltenyi Biotec
FlowJo	10.6.1	FlowJo
ImageJ	1.52c	National Institute of Health, USA

Eigene Darstellung

2.2 Patientenpopulation

Zum Zwecke dieser Studie wurden 21 gesunde Kontrollen, 21 Patient:innen mit SLE und 12 Patient:innen mit GPA rekrutiert. Nach ausführlicher Aufklärung wurde jeder einzelnen Person ca. 50 ml Vollblut abgenommen (5 x Heparin-, 1 x EDTA-Plasma-, 1 x Serumröhrchen). Die Patient:innen wurden aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie sowie der Rheumatologischen Fachambulanz rekrutiert. Angaben zum Patientenkollektiv (u.a. Alter, Geschlecht, Symptome und medikamentöse Behandlung) sind in (76), Table 1, S. 3 beschrieben.

2.3 Zellpräparation

Die Gewinnung der einzelnen Zellpopulationen (neutrophile Granulozyten, B- und T-Lymphozyten, dendritische und NK-Zellen) folgte einem in der Literatur bekannten Separationsprotokoll (77, 78). Dabei wurde das Vollblut aus Heparinröhrchen auf Histopaque® 1119 in einem Verhältnis von 1 zu 1 geschichtet und bei 800 g für 20 min zentrifugiert. Histopaque® 1119 ist ein von der Firma Sigma-Aldrich produziertes steriles, endotoxin-geprüftes Medium mit einer Dichte von 1,119 g/mL, welches aus Polysaccharose und Natriumditrizoat besteht (79). Nach der Auftrennung in verschiedene Zellschichten wurde das Plasma (oberste Schicht) entsorgt. Die nachfolgenden Schichten der Neutrophilen und der PBMCs wurden getrennt und in gesonderten Falcons aufbewahrt. Es folgte ein Waschschrift mit DPBS, einem Waschpuffer bestehend aus sterilem PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) und 0.2 % Humanalbuminserum. Nach einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt (bei 300g für 10 min) wurden die PBMCs in 20 ml DPBS resuspendiert, deren Anzahl mit Hilfe des CASY cell counters (OMNI Life Science) bestimmt wurde. Die Neutrophilen wurden nach dem Waschen mit DPBS zusätzlich mittels einer Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Für die Erstellung der Dichtegradienten wurde Percoll®, ein Medium aus Kieselpartikeln und nicht-dialysierbarem Polyvinylpyrrolidon, von der Firma Cytiva verwendet (80). Nach Durchführung der Gradientenzentrifugation (bei 800g für 20 min) wurde die wolkige Schicht mit den Neutrophilen separiert und mit DPBS abermals gewaschen. Schließlich wurden die Neutrophilen in 10 ml DPBS resuspendiert und mit Hilfe von CASY gezählt.

2.4 Durchflusszytometrie

Die absoluten Zellzahlen wurden im Vollblut mittels des Kits BD Trucount™ tubes bestimmt. Es wurde nach dem im Kit beiliegenden Protokoll verfahren, wobei die mit Antikörpern markierten Zellen mit eBioscience™ 1-step Fix/Lyse Solution (10X) fixiert und die Erythrozyten lysiert wurden.

Um den Phänotyp der einzelnen Zellpopulationen zu bestimmen, bediente man sich der Durchflusszytometrie (engl. FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting) mit dem MACS Quant Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec). Dabei wurden verschiedene Panels (s. Tabelle 11 - Tabelle 14) mit unterschiedlichen Antikörpern festgelegt. Anhand dieser Panels wurden entsprechend Antikörpermischungen angesetzt. Für die NDGs wurden die Zellen

aus der Neutrophilenschicht gefärbt. Um die LDGs zu bestimmen, wurden zudem Zellen aus der PBMC-Schicht gefärbt (gleiches Panel wie für die NDGs). Die B-Zellen und die dendritischen Zellen wurden auch aus der PBMC-Schicht gefärbt.

Es erfolgte die Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Antikörpern und einem FcR-blocking Reagens für 30 min auf Eis im Dunkeln. Es wurde immer eine Negativkontrolle ohne Antikörperfärbung geführt. Bei jeder FACS-Messung wurden die Neutrophilen und die PBMCs mit dem eBioscience™ Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff eFluor™ 780 (LD-Färbung) behandelt, um die Vitalität der Zellen sicherzustellen. Dieser Farbstoff strahlt im selben Wellenbereich (633 nm) (81) wie das Fluorochrom APC-Vio770 (640 nm) (82), weshalb dieses als dump-Kanal verwendet wurde, um die für das jeweilige Experiment nicht zu untersuchenden Zellen auszusortieren.

Tabelle 11: Cell-Count-Panel

Antigen	Fluorochrom
CD3	PerCP
CD4	VioBlue
CD8	PE
CD14	APC-Vio770
CD16	VioGreen
CD19	APC
CD45	FITC
CD56	PE-Vio770

Eigene Darstellung

Tabelle 12: Neutrophilen-Panel

Antigen	Fluorochrom
CD10	PerCP-Cy5.5
CD15	PE-Vio770
CD16	VioGreen
CD33	FITC
CD62L	VioBlue

CD63	PE
CD66b	APC
dump (CD3/14/19/56)/LD	APC-Vio770

Eigene Darstellung

Tabelle 13: B-Zell-Panel

Antigen	Fluorochrom
CD19	VioBlue
CD20	PE-Vio770
CD24	PerCP-Vio770
CD27	PE
CD38	APC
HLA-DR	VioGreen
IgD	FITC
dump (CD3/14)/LD	APC-Vio770

Eigene Darstellung

Tabelle 14: DC-Panel

Antigen	Fluorochrom
CD11c	VioBlue
CD14	FITC
CD56	PE-Vio770
CD123	PerCP/Cy5.5
CD252/OX40L	APC
HLA-DR	VioGreen
Siglec-1	PE
dump(CD3/19)/LD	APC-Vio770

Eigene Darstellung

2.5 NETosis Assay

Zur Bestimmung der NETose-Kapazität von NDGs wurde einer in der Literatur beschriebenen Methode bedient (83). Dabei hat man 6×10^6 Neutrophilen in einem 15 ml Falcon zentrifugiert (bei 300 g für 10 min) und nach der Entfernung des Überstandes in 3 ml IFA-Medium (500 ml RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot + 10 mM Hepes + 0.2 % HAS) resuspendiert. In eine 24-Well Platte wurden 13 mm große Glassplättchen in 10 Wells eingesetzt, nachdem diese mit EtOH und PBS gewaschen wurden. In 5 Wells wurden 250 μ l IFA-Medium pipettiert und in die restlichen 5 Wells 250 μ l PMA-Lösung (Stocksolution: 20 μ M, Verdünnungsfaktor 1:200, sodass 2,5 μ l PMA/Well). PMA ist ein Protein-kinase-C-Aktivator (84), der zur Stimulation der NETose eingesetzt wird. Zum Schluss wurden in jedes Well 250 μ l Zellsuspension pipettiert. Die Zellen wurden für 0 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h inkubiert (bei 37 °C, 5 % CO₂) und mit 2 % PFA fixiert. Nachdem die Glasplättchen mit PBS gewaschen worden waren, erfolgte die Permeation der Zellen mit 200 μ l TritonX-100/PBS für 5 min. Blockiert wurde mit einem Blocking buffer für 30 min bei RT. Zwecks Färbung inkubierte man die Zellen mit 50 μ l Primärantikörper (anti-PL2-3 und anti-NE) für 1 h bei RT. Nach einem weiteren Waschgang fügte man die Sekundärantikörper (anti-mouse Alexa568, anti-rabbit Alexa488) und Hoechst 33342 hinzu (30 min bei RT). Die Plättchen wurden dann auf ein Mikroskopieträger gebracht und mit Mowiol über Nacht behandelt. Die Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte dann am Mikroskop EVOS FL Auto2. Zu den Mikroskopeinstellungen und der Berechnung der NETosis-Rate sei auf die ursprüngliche Publikation (83) und (76), S. 4 verwiesen.

2.6 NET-ELISA

Zur direkten Bestimmung von NETs im Plasma der Patient:innen kam ein von der Arbeitsgruppe entwickelter Sandwich-ELISA zum Einsatz (85). Dafür verwendete man das Elastase, Human, ELISA Kit (HycultBiotech), mit Anti-NE-AK auf einer stationären Phase und als zweiten Antikörper: Anti-DNA-POD-AK (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche). ABTS diente als Waschlösung und 5 % H₂SO₄ zur Blockierung. Als Materialquelle diente EDTA-Plasma. Zur genauen Quantifizierung der NETs im Blut wurde außerdem eine Standardkurve (mit NETs isoliert von gesunden Kontrollen, quantifiziert mittels Nano-Drop2000) als Triplikat geführt. Gemessen wurde am Victor X Light Luminescence Reader (Perkin Elmer). Die genauen Behandlungsschritte sind in (85) beschrieben.

2.7 DNase1-Assay

Mit Hilfe dieses Assays wurde die NET-Degradation von SLE-Seren beschrieben (30). Er wurde modifiziert eingesetzt, um die NET-Degradation von GPA-Seren zu untersuchen. Grundlage hierfür bildete das Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay-Kit (Thermo Fisher Scientific). Die Methode wurde ausführlich in (76), S. 4 und beschrieben. Zusammenfassend wurden 0.4 µg NETs (isoliert von gesunden Kontrollen) mit 50 µl inkubiert (in Triplicaten). Als Positivkontrolle diente DNase1 und als Negativkontrolle unbehandelte NETs. Man verfuhr nach Anleitung des Herstellers; nach einer Inkubationszeit von (t_1)4,5 h und (t_2)21 h wurde die Abnahme der Fluoreszenz (Quenching) am Versa Max microplate reader™ (Molecular devices) gemessen.

2.8 Anti-Proteinase-3-ELISA

Die Quantifizierung von IgG-Antikörpern gegen Proteinase-3 wurde vom Labor Berlin durchgeführt. Dafür wurde ein ELISA-Kit verwendet (ORG 618, Anti-PR3 hs, ORGENTEC Diagnostika, Germany).

2.9 Statistische Analyse

Für die Durchführung der statistischen Analyse wurde das GraphPad Prism 8.0.2 (San Diego, CA) verwendet. Die statistischen Untersuchungen erfolgten mit dem Kruskal-Wallis-Test mit der Dunn-Korrektur bzw. der Spearman-Korrelation. Hierbei wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden als Median \pm Interquartilabstand (IQR) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung der Zellen

3.1.1 Untersuchung der absoluten Zellzahlen im Blut

Anhand des Cell-Count-Panels im sogenannten Trucount-Verfahren lässt sich die absolute Anzahl von Zellpopulation im Blut der Patient:innen bestimmen. Hierbei ließen sich zwar keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Anzahl von CD16⁺ NDGs und LDGs zwischen den Gruppen feststellen (s. Abbildung 2B und Abbildung 3B). Allerdings war die relative Anzahl von LDGs, definiert als CD15⁺SSC^{hi} Zellen in der PBMC-Schicht, bei GPA-Patient:innen signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen (s. Abbildung 2A). Zusätzlich wiesen GPA-Patient:innen eine signifikant erniedrigte Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und Monozyten auf. Die SLE-Kohorte wiederum zeigte eine erniedrigte Anzahl an CD4⁺ Lymphozyten, NK und NKT-Zellen auf (s. Tabelle 15). Die B-Lymphozyten wiesen auch keinen signifikanten Unterschied auf (s. Tabelle 15).

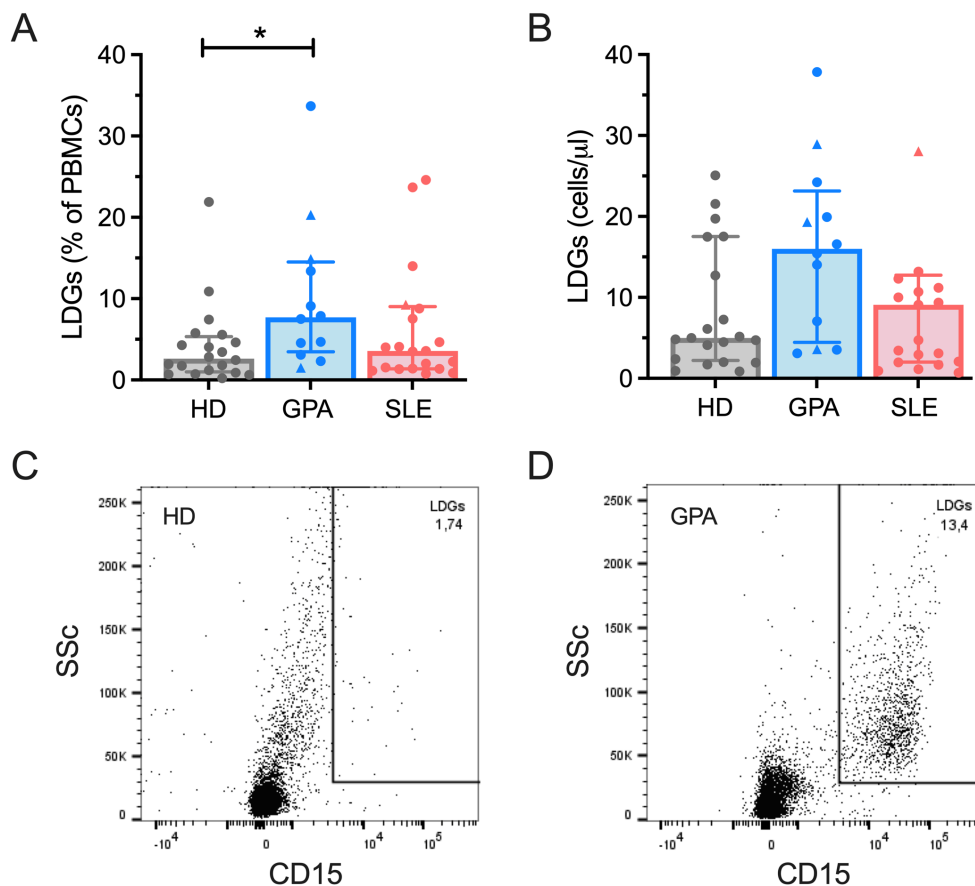


Abbildung 2: „Quantifizierung von LDGs. Prozentangabe (A) und absolute Zahlen (B) der LDGs im peripheren Blut (HD, n=12; GPA, n=12; SLE, n=21). LDGs wurden als CD15⁺SSC^{hi} in

der PBMC-Schicht von mit Percoll aufgetrenntem Blut mit Hilfe von FACS definiert (...). Patient:innen, die mit ≥ 20 mg Prednisolon täglich behandelt wurden (...), werden als Dreiecke dargestellt. Die Balken repräsentieren den Median, die Fehlerbalken den Interquartilabstand. Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert ($\alpha = 0.05$), $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Repräsentative Abbildungen für die Detektion von LDGs bei einer gesunden Kontrolle (**C**) und einem GPA-Erkrankten (**D**) werden dargestellt.“ (Übersetzung durch den Autor)

Quelle: Lipka et al. 2023, S. 6 (76)

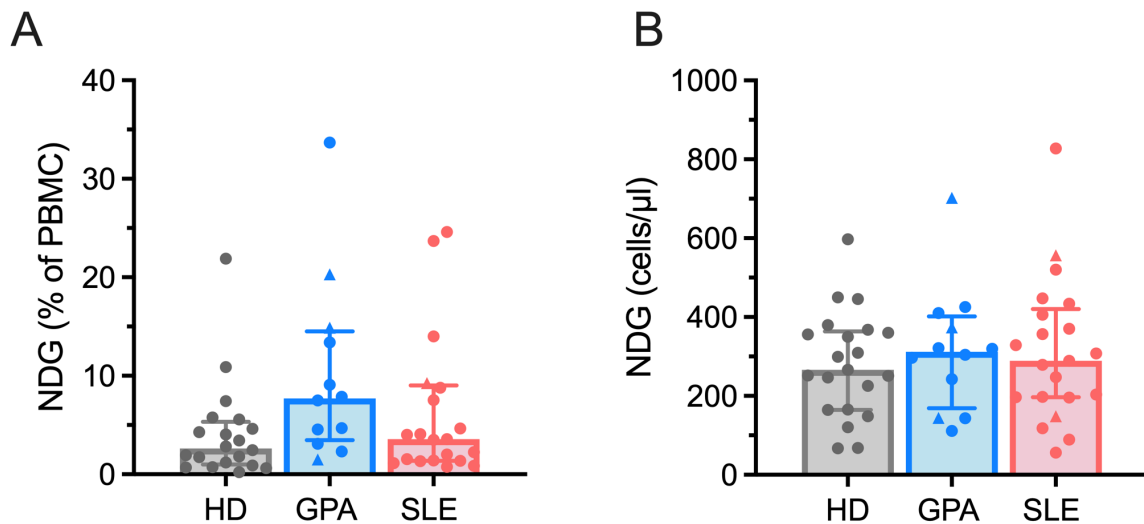


Abbildung 3: „Quantifizierung von NDGs. (A) NDGs-Frequenzen (...) und **(B)** absolute Zahlen von NDGs wurden durch Durchflusszytometrie bestimmt (HD, n=21; GPA, n=12; SLE, n=21) mit Hilfe der Truocount-Methode. NDGs wurden als CD16⁺SSC⁺ Zellen im Vollblut identifiziert. (...) Patient:innen, die mit ≥ 20 mg Prednisolon täglich behandelt wurden (...), werden als Dreiecke dargestellt. Median \pm IQR werden dargestellt. Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert, keine signifikanten Unterschiede wurden festgestellt.“ (Übersetzung durch den Autor)

Quelle: Lipka et al. 2023, aus Supporting Information (76)

Tabelle 15: Cell Count

Zelltyp		HD	GPA	SLE	Adjustierter P - Wert
Cell count (Zellen/ μ l)	B cells	22.69 (15.14-32.61)	12.98 (8.24-37.64)	11.93 (3.36-29.13)	HD vs. GPA $P > 0.999$ HD vs. SLE $P = 0.194$
	CD16 ⁺ Neutrophils	266.5 (165-364.1)	304.1 (144.1-410.5)	289.3 (196.6-420.1)	HD vs. GPA $P > 0.999$ HD vs. SLE $P > 0.999$

CD4 ⁺ T cells	82.32 (43.82- 101.9)	37.01 (21.02- 55.2)	34.52 (18.37- 56.23)	HD vs. GPA <i>P</i> =0.018 HD vs. SLE <i>P</i> <0.001
CD8 ⁺ T cells	30.75 (17.16- 39.71)	16.8 (9.99- 22.88)	23.26 (17.27- 29.85)	HD vs. GPA <i>P</i> =0.035 HD vs. SLE <i>P</i> =0.544
Monocytes	19.3 (11.53- 28.71)	6.8 (3.07- 10.77)	14.83 (5.88- 25.90)	HD vs. GPA <i>P</i> =0.011 HD vs. SLE <i>P</i> =0.537
NK cells	18.21 (7.23- 27.51)	9.22 (4.31- 22.35)	5.7 (3.12- 12.02)	HD vs. GPA <i>P</i> =0.291 HD vs. SLE <i>P</i> =0.001
NKT cells	6.58 (3.27- 15.79)	3.34 (1.72- 5.96)	2.17 (0.76- 3.68)	HD vs. GPA <i>P</i> =0.107 HD vs. SLE <i>P</i> <0.001

Eigene Darstellung: Median \pm IQR, Abkürzungen: NK, Natürliche Killer-Zellen; NKT, Natürliche Killer-T-Zellen, Statistische Analyse: Kruskal-Wallis-Test

3.1.2 Phänotypisierung der NDGs und LDGs

Sowohl LDGs als auch NDGs von GPA-Patient:innen zeigten eine niedrigere Expression von CD10 (s. Abbildung 4A) und eine erhöhte Expression von CD66b (s. Abbildung 4F) – bei NDGs auch eine niedrigere CD16-Expression – was auf einen unreifen, aktivierten Phänotyp hindeutet. Weitere Marker (CD16, CD33, CD62L und CD63) allerdings zeigten keine signifikant veränderte Expression (s. Abbildung 4B, C, D, E). LDGs von SLE-Patient:innen zeigten wiederum keine veränderte Expression ihrer Oberflächenantigene. Nur die SLE-NDGs wiesen eine erhöhte CD63-Expression auf (s. Abbildung 4E), was auf vermehrte Degranulation hindeutet.

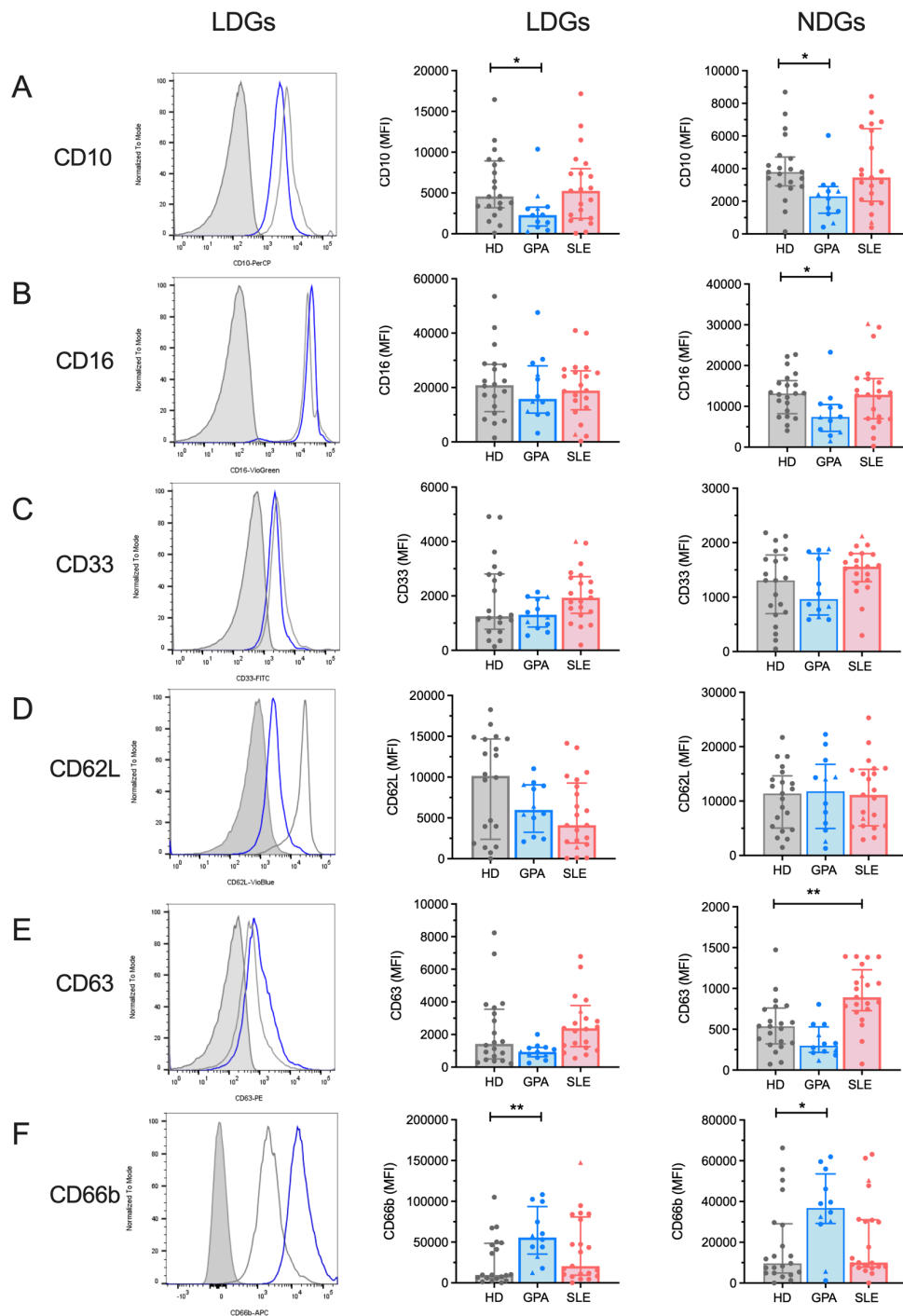


Abbildung 4: „Phänotypische Analyse von LDGs und NDGs. Oberflächenmarker, die mit (A,C) Reifung (CD10, CD33), (B,F) Aktivierung (CD16, CD66b), (D) Adhäsion (CD62L) und (E) Degranulation (CD63) assoziiert sind, wurden auf LDGs und NDGs gemessen (HD, n=21; GPA, n=12; SLE, n=21) mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Patient:innen, die mit ≥ 20 mg Prednison täglich behandelt wurden (...), werden als Dreiecke dargestellt. Repräsentative Histogramme von LDGs mit respektiver FMO-Kontrollfärbung (graugefüllte Kurve) für eine gesunde Kontrolle (graue Linie) und einem GPA-Erkrankten (blaue Linie) werden angezeigt. (...) Median \pm IQR werden dargestellt. Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert ($\alpha = 0.05$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.“ (Übersetzung durch den Autor)

Quelle: Lipka et al. 2023, S. 7 (76)

3.1.3 Aktivierte dendritische Zellen und erhöhte Level von zirkulierenden Plasmablasten in GPA und SLE

NETs können dendritische Zellen über Toll-like Rezeptor (TLR)-Signalwege aktivieren (46) und zu einer gesteigerten Produktion von IFN- α führen (47). Außerdem konnte eine vermehrte Expression von OX40L auf mDCs in SLE nachgewiesen werden, induziert durch Immunkomplexe (62). Wir haben in unseren Analysen daher zunächst den Phänotyp von dendritischen Zellen mittels FACS untersucht. Wir fanden eine erhöhte Expression von OX40L auf mDCs von GPA-Patient:innen, aber nicht bei SLE, was auf eine Aktivierung dieser Zellen hindeutet. Eine erhöhte IFN-I-Aktivität, gemessen an einer gesteigerten Expression von SIGLEC-1 auf mDCs, wurde wiederum nur bei SLE gefunden, was die Schlüsselrolle von IFN-I bei SLE bestätigt (86, 87). Im Hinblick auf B-Zell-Subpopulationen konnte eine erhöhte Frequenz zirkulierender Plasmablasten sowohl bei GPA als auch bei SLE nachgewiesen werden. Bei beiden Erkrankungen war auch eine erhöhte Frequenz von IgD/CD27 doppelt-negativen (DN) B-Zellen nachweisbar, welche Vorläufer pathogener AK-produzierender Zellen darstellen und somit die erhöhte humorale Aktivität bei beiden Erkrankungen widerspiegelt (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Monozyten, Dendritische Zellen, B-Zellen

Zelltyp		HD	GPA	SLE	Adjustierter <i>P</i> - Wert
Monozyten	SIGLEC-1 expression (rel. MFI)	2.7 (1.73-3.33)	1.85 (1.31-2.61)	66.93 (29.37-110.3)	HD vs. GPA <i>P</i> >0.999 HD vs. SLE <i>P</i> <0.001
Dendritische Zellen	pDCs (% CD123 ⁺ cells among CD3 ⁻ CD19 ⁻ HLA-DR ⁺)	9.60 (8.12-11.93)	5.19 (1.98-8.18)	5.69 (2.56-8.56)	HD vs. GPA <i>P</i> =0.006 HD vs. SLE <i>P</i> =0.014
	SIGLEC-1 expression on pDCs (rel. MFI)	1.98 (1.51-2.66)	1.29 (1.01-1.84)	2.08 (1.76-2.51)	HD vs. GPA <i>P</i> =0.064 HD vs. SLE <i>P</i> >0.999
	mDCs (% CD11 ⁺ cells among CD3 ⁻ CD19 ⁻ HLA-DR ⁺)	37.05 (29.03-49.10)	30.20 (21.30-58.18)	32.30 (10.75-52.35)	HD vs. GPA <i>P</i> =0.982 HD vs. SLE <i>P</i> =0.838

	SIGLEC-1 expression on mDCs (rel. MFI)	2.88 (2.11-3.47)	1.94 (1.61-4.34)	15.57 (6.41-24.20)	HD vs. GPA $P>0.999$ HD vs. SLE $P<0.001$
	OX40L expression (rel. MFI)	1.53 (1.28-2.54)	5.88 (2.15-24.73)	2.33 (1.74-2.97)	HD vs. GPA $P=0.003$ HD vs. SLE $P=0.144$
B Lymphozyten	CD19 ⁺ B cells (cells/ μ l)	22.69 (15.13-32.61)	12.98 (8.23-37.64)	11.93 (3.36-29.13)	HD vs. GPA $P>0.999$ HD vs. SLE $P=0.195$
	Plasmablasts (% CD38 ⁺ CD24 ⁻ among CD19 ⁺ B cells)	1.55 (1.06-2.95)	7.17 (3.76-8.83)	4.65 (1.55-7.81)	HD vs. GPA $P=0.002$ HD vs. SLE $P=0.019$
	Transitional B cells (% CD38 ⁺ CD24 ⁺ of CD19 ⁺ B cells)	2.84 (1.99-5.34)	10.10 (4.23-18.4)	8.89 (4.71-14.15)	HD vs. GPA $P=0.012$ HD vs. SLE $P=0.004$
	Switched memory B cells (% CD27 ⁺ IgD ⁻ of CD19 ⁺ B cells)	21.90 (18.25-24.67)	19.70 (14.7-26.2)	19.50 (17.05-28.95)	HD vs. GPA $P>0.999$ HD vs. SLE $P>0.999$
	Unswitched memory B cells (% CD27 ⁺ IgD ⁺ of CD19 ⁺ B cells)	11.60 (10.09-19.4)	3.67 (1.99-7.95)	7.11 (3.36-11.7)	HD vs. GPA $P=0.001$ HD vs. SLE $P=0.012$
	naive B cells (% CD27 ⁻ IgD ⁺ of CD19 ⁺ B cells)	49.75 (37.72-57.25)	28.80 (11.9-51.7)	42.50 (20.35-53.95)	HD vs. GPA $P=0.041$ HD vs. SLE $P=0.122$
	Double negative B cells (% CD27 ⁻ IgD ⁻ of CD19 ⁺ B cells)	10.04 (8.15-12.42)	17.20 (14.65-37.8)	15.00 (12.6-20.4)	HD vs. GPA $P<0.001$ HD vs. SLE $P=0.003$

Eigene Darstellung: Median \pm IQR, Abkürzungen: pDC, plasmazytoide Dendritische Zellen; mDC, myeloide Dendritische Zellen, Statistische Analyse: Kruskal-Wallis-Test

3.2 NETose-Kapazität von NDGs und direkte NET-Quantifizierung im Blut

Um die Kapazität von Granulozyten zur NETose zu untersuchen, wurden isolierte NDGs mit oder ohne PMA stimuliert und die Menge an NETs mittels Immunfluoreszenzmikroskopie quantifiziert (83). Wir fanden dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (s. Abbildung 5). Zusätzlich wurden mit Hilfe eines NE-basierten ELISA die Spiegel zirkulierender NETs gemessen. Es fanden sich hierbei keine erhöhten

NET-Spiegel im EDTA-Plasma von Patient:innen, weder bei GPA noch bei SLE im Vergleich zu gesunden Proband:innen (s. Abbildung 6A).

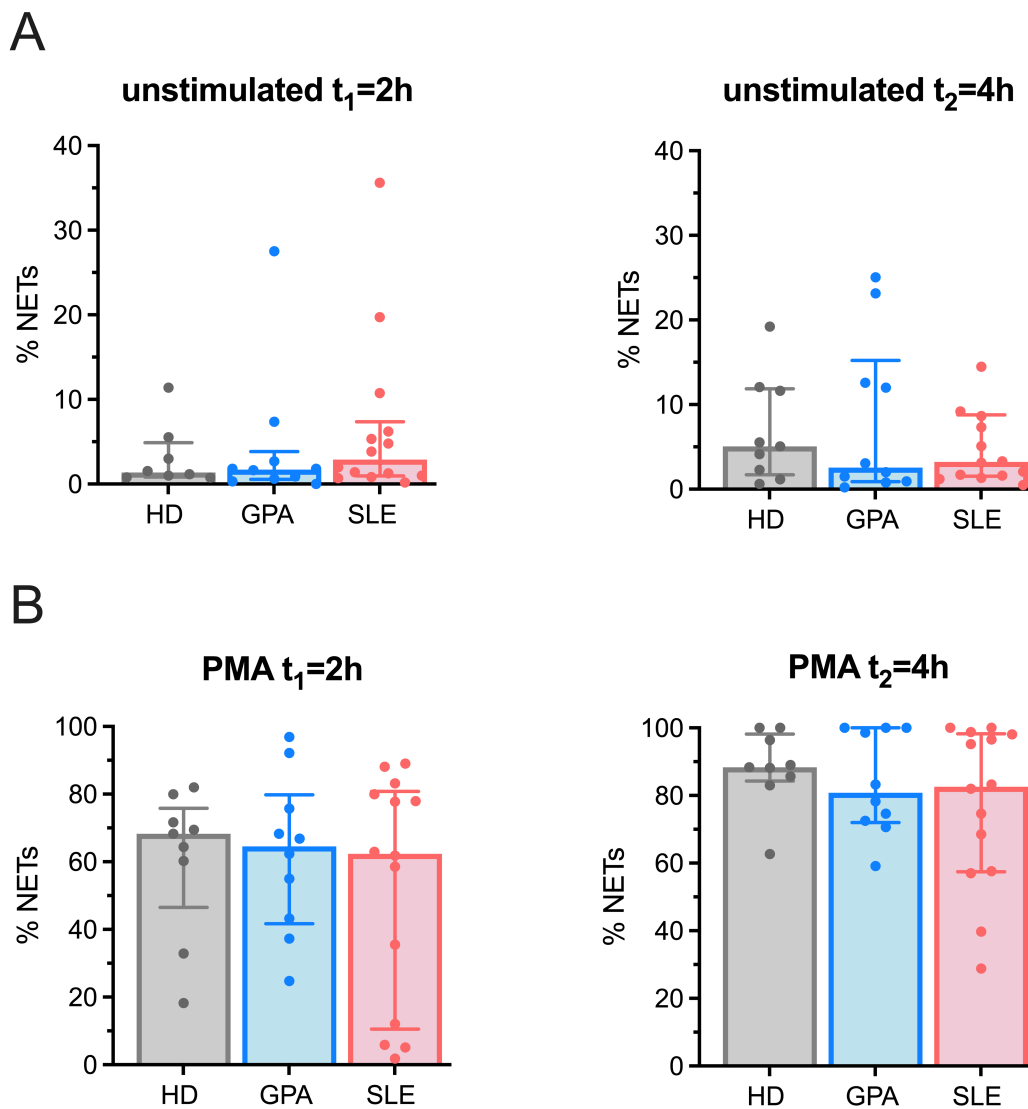


Abbildung 5: „Quantifizierung von NET-Produktion *in vitro*. Frisch isolierte NDGs wurden entweder (**A**) nicht behandelt oder (**B**) mit 100 nM PMA für 2 bzw. 4 Stunden stimuliert. Die Fähigkeit von NDGs NETs zu produzieren, wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz und einer semi-automatischen Quantifizierung bei HD (n=9), GPA (n=10) und SLE (n=14) vorgenommen. (...). Median \pm IQR werden dargestellt. Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert ($\alpha = 0.05$).“ (Übersetzung durch den Autor)

Quelle: Lipka et al. 2023, S. 8 (76)

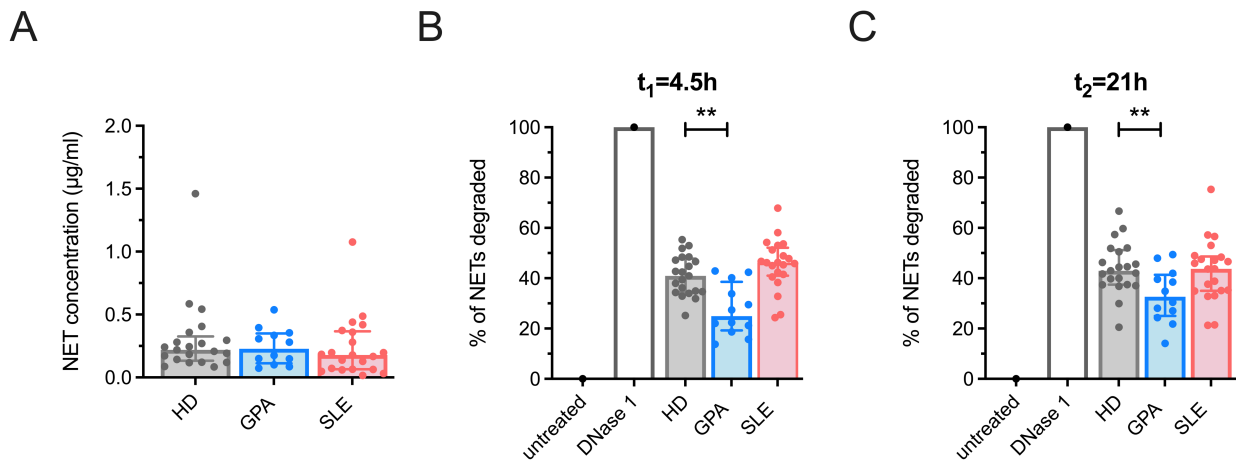


Abbildung 6: „Quantifizierung von NETs isoliert aus peripherem Blut und DNase1 assay. (A) NET-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines NET-ELISA in EDTA-Plasma bestimmt (HD, n=21; GPA, n=12; SLE, n=21). NET-Degradierungsaktivität von DNase1 im Serum wurde nach $t_1=4,5$ h (B) und $t_2=21$ h (C) (...) bestimmt. Median \pm IQR werden dargestellt. Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert ($\alpha = 0.05$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.“ (Übersetzung durch den Autor)

Quelle: Lipka et al. 2023, S. 9 (76)

3.4 Degradierung induzierter NETs durch Patientenserum

Um die Degradierung von NETs durch die im Blut befindliche Endonuklease DNase1 (30) zu bestimmen, wurden induzierte NETs von Granulozyten gesunder Kontrollen mit Patientenserum inkubiert und anschließend die NETs-Menge fluoreszenzoptisch unter Verwendung von PicoGreenTM gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Seren der GPA-Kohorte die NETs signifikant schlechter abbauten als die der gesunden Kohorte, während zwischen der SLE- und HD-Kohorte keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren (s. Abbildung 6B und C).

3.5 Korrelationen

Die gemessenen Daten der NETose und der NET-Degradierung wurden anschließend mit klinischen und serologischen Parametern verglichen. Dabei konnte eine schwache Korrelation zwischen einer gestörten NETs-Degradierung bei GPA-Patient:innen mit dem klinischen Aktivitätsscore BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score) festgestellt werden (s. Abbildung 7A). Außerdem korrelierte diese auch mit der Konzentration an ANCA (IgG gegen Proteinase-3) im Serum, gemessen mittels ELISA (ORG 618, Anti-PR3 hs, ORGENTEC Diagnostika, Germany) (s. Abbildung 7A). Weitere Parameter (z.B. Level

der zirkulierenden NETs im Blut) zeigten keine Korrelation mit den klinischen oder serologischen Daten (s. Abbildung 7B-D).

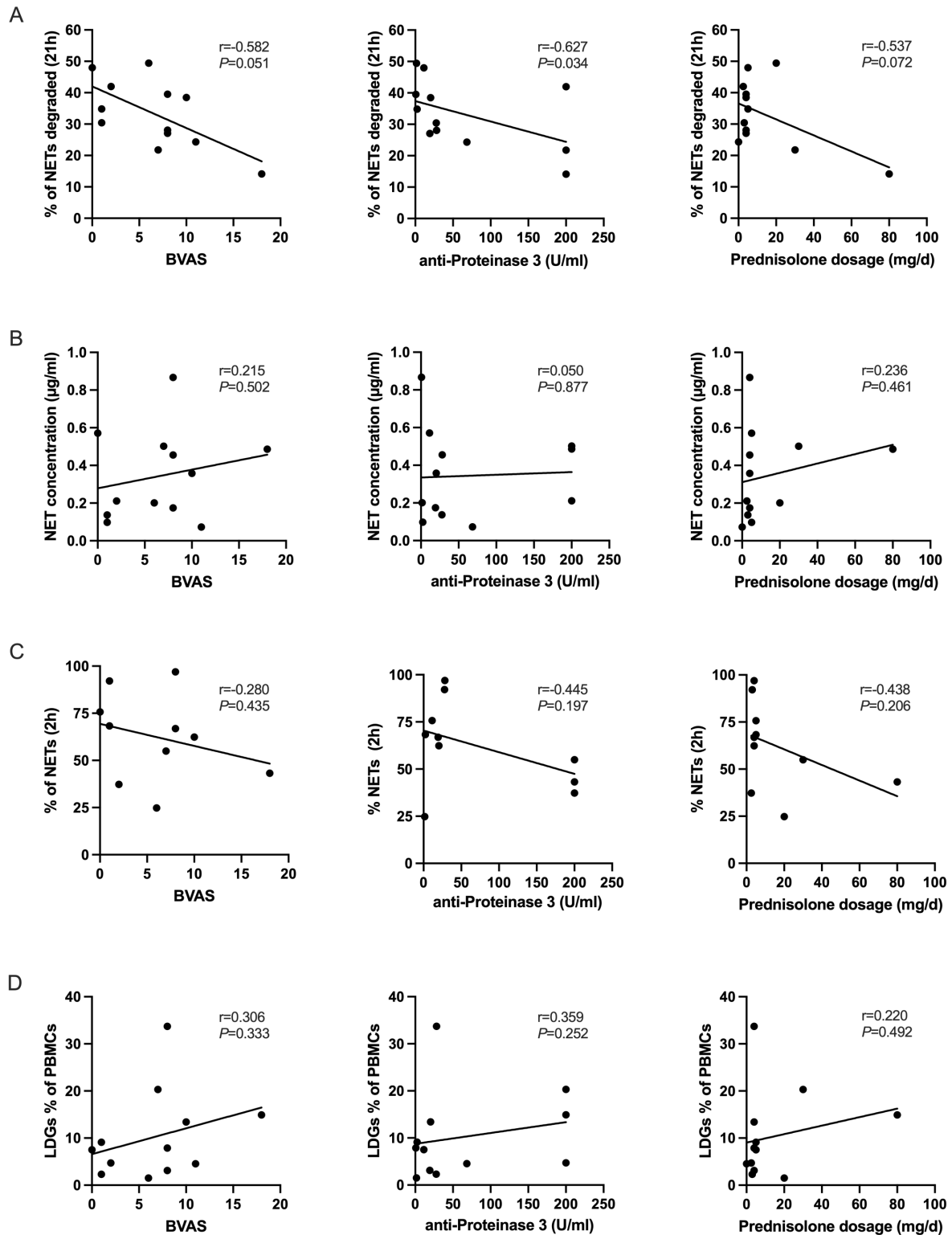


Abbildung 7: „Korrelationen. (...) Spearman-Korrelationen von **(A)** NETs-Degradierungsaktivität nach 21 h Inkubationszeit, **(B)** NET-Konzentration im peripheren Blut gemessen mit ELISA, **(C)** Frequenz der NET-Formation von NDGs nach 2 h PMA-Stimulation und **(D)** LDG-Levels im peripheren Blut mit BVAS, anti-PR3-Serumtiter, sowie tägliche Prednisolondosis. (...) Korrelationskoeffizient und P -Wert sind in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet ($\alpha=0.05$).“ (Übersetzung durch den Autor)

Quelle: Lipka et al. 2023, S. 10 (76)

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung

Die Pathophysiologie der Granulomatose mit Polyangiitis ist komplex und verschiedene zelluläre und lösliche Mediatoren des Immunsystems tragen dazu bei. NETs scheinen dabei eine zentrale Rolle zu spielen (88). In dieser Arbeit richteten wir unser Augenmerk auf die Rolle der Neutrophilen Granulozyten, ihren Phänotyp und ihre Kapazität, NETs zu produzieren. Außerdem wurden NETs direkt im Blut von GPA-Erkrankten quantifiziert sowie die Fähigkeit der GPA-Seren NETs zu degradieren untersucht. Parallel dazu wurden Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems durchflusszytometrisch phänotypisiert. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Frequenzen von LDGs bei GPA-Erkrankten signifikant erhöht waren und einen unreifen, aktivierten Phänotyp aufwiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollen und zu NDGs (niedrige CD10-Expression, erhöhte CD66b-Expression). Parallel dazu war eine erhöhte Frequenz zirkulierender Plasmablasten und doppelt-negativer (DN) B-Zellen nachweisbar und eine Aktivierung von mDC mit erhöhter Expression von OX40L.

Funktionell konnte in Stimulationsassays mit PMA keine erhöhte NETose in NDGs bei Patienten mit GPA induziert werden. Auch die Quantifizierung von zirkulierenden NETs aus Patientenplasma zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass die Degradierung von NETs bei GPA-Patient:innen signifikant eingeschränkt war. Dies korrelierte mit klinischen sowie serologischen Parametern, z.B. dem BVAS und ANCA-Titer im Serum, was die Relevanz der Untersuchungsergebnisse unterstreicht.

4.2 Phänotypisierung von Low Density Granulocytes (LDGs)

Bereits frühere Studien haben sich mit der Rolle von LDGs beschäftigt. Bei SLE-Erkrankten konnten Denny et al. LDGs aus der PBMC-Schicht mittels negativer Selektion isolieren und zeigen, dass diese eine eigenständige Untergruppe von neutrophilen Granulozyten darstellen und einen proinflammatorischen Phänotyp aufweisen (34). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass LDGs mikroskopisch eher unreifen Granulozyten ähneln, obwohl die Expression von CD33, einem Marker für zelluläre Unreife, nur sehr schwach ausgeprägt war und nach Stimulation mit PMA vermehrt TNF- α und IFN-I produzieren.

Villanueva et al. haben außerdem gezeigt, dass LDGs bei SLE nach Stimulation mit PMA vermehrt NETs produzieren (38).

Bei AAV konnte gezeigt werden, dass LDGs spontan mehr NETs produzieren als NDGs. Eine Korrelation mit klinischen Parametern, z.B. ANCA-Titern, war nicht nachweisbar (36). Hervorzuheben ist, dass noch kein spezifischer Marker auf LDGs verfügbar ist, auf dessen Grundlage die Zellen mit hoher Sicherheit und Reinheit isoliert werden können. Deshalb behalf man sich in dieser Studie mit einem bekannten Antikörper (CD66b), der gegen NDGs gerichtet ist. In einer Übersichtsarbeit von Ning et al. wurden die Eigenschaften von LDGs zusammengefasst: LDGs weisen eine hohe Variabilität im Phänotyp auf, abhängig von der zugrundeliegenden Krankheitsursache. Bei einigen Krebserkrankungen und entzündlichen Erkrankungen haben LDGs immunsuppressive Eigenschaften, während in vielen immunvermittelten Erkrankungen LDGs proinflammatorische Eigenschaften zeigen (89).

Korrelierend zu Voruntersuchungen deuten unsere Daten darauf hin, dass LDGs in GPA einen unreifen (niedrige CD10-Expression) und einen aktivierten (erhöhte CD66b-Expression) Phänotyp aufweisen und untermauern somit die zentrale Rolle von LDGs in der Immunpathogenese der Erkrankung. Interessanterweise zeigen die Expressionsmuster weiterer Antigene (CD33, CD16, CD62L und CD63) keinen signifikanten Unterschied zu den HDs, was auf einen einzigartigen Phänotyp der LDGs hindeuten könnte.

Darüber hinaus war die relative Anzahl der LDGs erhöht, was frühere Ergebnisse bestätigt (36). Die absolute Anzahl der LDGs war allerdings nicht erhöht. Ein möglicher Grund dafür könnte die erniedrigte Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sein, was allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen von London et al. steht, die erhöhte T-Zell-Zahlen messen konnten (90). Die T-Zellen müssten näher bestimmt werden, um einen genauen Vergleich ziehen zu können.

4.3 Rolle von NETs in der Immunpathogenese von GPA

Die Rolle der NETs in der Pathophysiologie der GPA ist nicht abschließend geklärt. Unsere Daten weisen zwar eine gestörte Degradierung von NETs bei GPA nach, allerdings konnten keine erhöhten Level zirkulierender NETs im Plasma nachgewiesen werden. Außerdem konnte keine erhöhte NETose-Kapazität von GPA-NDGs im Vergleich zu HD-NDGs nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu den

Ergebnissen anderer Studien. Akiyama et al. haben z.B. gezeigt, dass NDGs von GPA-Erkrankten mit einem Kopf-Hals-Befall im Vergleich zu gesunden Kontrollen und GPA-Patient:innen mit systemischem Befall vermehrt NETs produzieren (91). Diese Diskrepanz zu unseren Ergebnissen könnte zum einen in der Heterogenität der Patientengruppe, zum anderen in der angewandten Methodik liegen. Darüber hinaus haben Wand et al. erhöhte NETs, definiert als DNA/MPO-Komplexe, im Serum von AAV-Erkrankten gemessen (92). Kessenbrock et al. wiederum konnten erhöhte NET-Abbauprodukte, definiert, als Nukleosom/MPO-Komplexe, in Seren von Patient:innen mit aktiver AAV nachweisen (43). Demgegenüber wurde ein verminderter Abbau von NETs durch SLE-Seren beobachtet (30), während Bruschi et al. eine gestörte DNase-Aktivität, gemessen an der Abbaukapazität von dsDNA, nur bei SLE-Patient:innen mit Nierenbeteiligung feststellten. Sie konnten aber vermehrt NET-Abbauprodukte als DNA/MPO-Komplexe im Blutserum von SLE-Erkrankten nachweisen (93). Dies deutet darauf hin, dass alternative Mechanismen für die NETs-Degradierung aktiviert sein könnten, die möglicherweise zur Pathologie beitragen, wie z.B. die NET-Clearance durch Makrophagen oder myeloide dendritische Zellen (45). Außerdem könnte diese Diskrepanz durch die Akkumulation von NETs in entzündeten Gewebeläsionen, wie sie in der Niere oder Lunge von Patienten mit GPA beobachtet wurden, erklärt werden (94, 95). Dagegen konnten erhöhte NET-Spiegel in Plasmen von Malaria-Erkrankten gemessen werden (85). Dieser Unterschied könnte auch auf die unterschiedliche Pathogenese der Krankheiten (autoimmun vs. infektiös bedingt) und mithin der unterschiedlichen Entstehung der NETs zurückzuführen sein. Zusätzliche Forschungsarbeiten sind erforderlich, um diese Hypothesen zu bestätigen oder zu widerlegen.

4.4 Rolle von mDCs und B-Zellen

Bei Mäusen können myeloide dendritische Zellen (mDCs) PR3 und MPO aus NETs aufnehmen, und die Injektion dieser mit NETs beladenen mDCs führte zur Bildung von MPO- und PR3-ANCA und zur Entwicklung einer AAV-ähnlichen Erkrankung (44). Ähnlich wie bei SLE, bei der Immunkomplexe die Expression von OX40L auf myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) stark induzierten (62), zeigten unsere phänotypischen Analysen eine Hochregulierung von OX40L auf mDCs bei GPA, was auf eine Verbindung zwischen NETs und zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems hindeutet. Es sind aber weitere funktionelle Untersuchungen erforderlich, um die Rolle dendritischer Zellen

in der komplexen Pathogenese von GPA zu entschlüsseln. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass ANCA Neutrophile aktivieren können, um NETs zu induzieren (43), was auf einen *circulus vitiosus* hindeutet, bei dem NETs als Brücke zwischen Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems fungieren können, um pathogene ANCAs zu produzieren. In Übereinstimmung mit diesen Vorstellungen beobachteten wir erhöhte Konzentrationen von zirkulierenden Plasmablasten und eine Korrelation zwischen der NET-Abbaufähigkeit und klinischen (BVAS-Score) und serologischen (c-ANCA) Markern der Krankheitsaktivität.

4.5 Limitationen

Die Arbeit weist gewisse Limitationen auf. Die Anzahl der Probanden war zu gering, um einen Test auf Normalverteilung durchzuführen. Um die Ergebnisse zu validieren und um verallgemeinernde Aussagen zu treffen, bedürfte es einer größeren Anzahl von Patient:innen. Allerdings konnte man in der Literatur schon beschriebene Ergebnisse reproduzieren, u.a., dass die LDGs einen unreifen Phänotyp aufweisen.

Eine weitere Störvariable könnte die medikamentöse Behandlung der Patient:innen mit immunmodulierenden Substanzen darstellen. Gleichwohl gestaltete sich die Suche nach unbehandelten Personen als äußerst schwierig, da im Falle einer Erstdiagnose die Erkrankten hierzulande rasch einer Therapie zugeführt werden. Um dieses Problem zu kompensieren, wurden hauptsächlich Patienten mit klinischer Aktivität eingeschlossen. Die verfügbare Literatur beinhaltet zumeist Studien mit behandelten Personen, was einen Vergleich dieser mit der hiesigen Arbeit erlaubt.

Die Auftrennung des Vollblutes in seine Bestandteile könnte außerdem einen Effekt auf den Aktivitätsstatus der Zellen haben. Obwohl die in der Methodik beschriebene Vorgehensweise einen Standard darstellt, sollten mögliche Einflüsse bedingt durch die Zentrifugation nicht außer Acht gelassen werden. Dieser Einfluss ließe sich z.B. dadurch erfassen, dass man direkt gefärbte Zellen im Vollblut mit den separierten Zellen vergleicht. Allerdings könnte man dann schwer den Beitrag der LDGs erfassen, da noch spezifische Antigene, die sie von den NDGs unterscheiden ließen, nicht bekannt sind. Allgemein stellt die Untersuchung LDGs eine Herausforderung dar. Obwohl die Isolierung von LDGs *in vitro* schon beschrieben worden ist (34), konnten ähnliche Versuche im Rahmen dieser Arbeit jene Ergebnisse nicht reproduzieren. Die Erfassung pathognomonischer LDG-Antigene könnte hier eventuell Abhilfe schaffen.

Ein bedeutendes Hindernis stellte die Komplexität der Pathophysiologie dieser Erkrankung dar. Während der Fokus dieser Arbeit auf die Rolle des angeborenen Immunsystems, insbesondere auf neutrophile Granulozyten, gerichtet war, sollte der Beitrag des adaptiven Immunsystems nicht außer Acht gelassen werden. Um die Interaktion der beiden Teile des Immunsystems zu beleuchten, wurden hier primär B-Zellen phänotypisiert und die Ergebnisse bestätigen eine begleitende humorale Aktivität. Daneben sind aber auch Hinweise auf die Rolle von T-Zellen in der Pathogenese bekannt (96), die in Folgestudien einbezogen werden sollten.

4.6 Conclusio und Ausblick

Die Mortalität der GPA bleibt trotz Zulassung neuer biologischer und zielgerichteter Therapien hoch (10). Ein großes Problem stellt vor allem die Gefahr einer Nierenbeteiligung dar, was oft eine Dialyse und die damit verbundenen Komplikationen für die Betroffenen nach sich zieht (12, 13, 14). Die derzeit verfügbaren Therapieoptionen sind begrenzt und basieren zum größten Teil auf breitwirkenden immunsupprimierenden und immunmodulierenden Medikamenten (sog. DMARDs: disease modifying antirheumatic drugs) (17). Neue Ansätze beinhalten eine Depletion von B-Zellen (Rituximab) oder Inhibition des Komplementsystems (Avacopan). Weitere Therapieansätze sind in Entwicklung, basierend auf neuen Forschungsergebnissen.

NETs oder deren Abbau durch DNase1 könnten ebenfalls als zukünftiges medikamentöses Target in Frage kommen. So könnte die verstärkte NETose therapeutisch durch die Verabreichung von DNase1 inhibiert werden, was sich bei SLE-Patienten bereits als sicher und verträglich erwiesen hat (97) und als potenzielles Behandlungsziel bei AAV diskutiert wird (98). O'Sullivan et al. schlagen in ihrer Studie (98) potenzielle Wirkstoffe mit unterschiedlichen Angriffszielen vor, z.B. die NE-Hemmer Alvelestat und BAY 85-8501 oder Anti-Histon-Antikörper.

In dieser Arbeit haben wir versucht, die Rolle der neutrophilen Granulozyten und der NETose in der Immunpathogenese der GPA genauer zu beleuchten. Wir konnten vorpublizierte Ergebnisse bestätigen sowie die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Pathogenese von GPA untermauern. Trotzdem lassen sich unsere Daten nur unter Vorbehalt verallgemeinern und nicht ohne weiteres auf die gesamte Patientenpopulation übertragen. Ein zentrales Hindernis dabei stellt die Heterogenität der Erkrankung dar. In der

Literatur findet sich u.a. der Vorschlag, die AAVs anhand ihres ANCAs-Status zu definieren (99). Unabhängig davon sind Folgestudien erforderlich, um die komplexe Interaktion zwischen LDGs, NETose und NETs-Degradierung mit Komponenten des adaptiven Immunsystems zu untersuchen. Diese Untersuchungen könnten langfristig zu einem weiteren Verständnis der Pathophysiologie der GPA beitragen und neue Targets für zielgerichtete Therapieansätze identifizieren.

Literaturverzeichnis

1. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, Flores-Suarez LF, Gross WL, Guillevin L, Hagen EC, Hoffman GS, Jayne DR, Kallenberg CG, Lamprecht P, Langford CA, Luqmani RA, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Ozen S, Pusey CD, Rasmussen N, Rees AJ, Scott DG, Specks U, Stone JH, Takahashi K, Watts RA. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):1-11.
2. Yates M, Watts RA, Bajema IM, Cid MC, Crestani B, Hauser T, Hellmich B, Holle JU, Laudien M, Little MA, Luqmani RA, Mahr A, Merkel PA, Mills J, Mooney J, Segelmark M, Tesar V, Westman K, Vaglio A, Yalcindag N, Jayne DR, Mukhtyar C. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(9):1583-94.
3. Schirmer JH, Aries PM, de Groot K, Hellmich B, Holle JU, Kneitz C, Kötter I, Lamprecht P, Müller-Ladner U, Reinhold-Keller E, Specker C, Zänker M, Moosig F. S1-Leitlinie Diagnostik und Therapie der ANCA-assoziierten Vaskulitiden. *Zeitschrift für Rheumatologie.* 2017;76(3):77-104.
4. Herlyn K, Buckert F, Gross WL, Reinhold-Keller E. Doubled prevalence rates of ANCA-associated vasculitides and giant cell arteritis between 1994 and 2006 in northern Germany. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(5):882-9.
5. Geetha D, Jefferson JA. ANCA-Associated Vasculitis: Core Curriculum 2020. *Am J Kidney Dis.* 2020;75(1):124-37.
6. Martin KR, Witko-Sarsat V. Proteinase 3: the odd one out that became an autoantigen. *J Leukoc Biol.* 2017;102(3):689-98.
7. Alba MA, Jennette JC, Hu Y, Poulton CJ, Blazek L, Derebail VK, Falk RJ, Hogan SL. Relevance of Combined Clinicopathologic Phenotype and Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody Serotype in the Diagnosis of Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody Vasculitis. *Kidney Int Rep.* 2022;7(12):2676-90.
8. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys.* 2018;640:47-52.

9. Robson JC, Grayson PC, Ponte C, Suppiah R, Craven A, Judge A, Khalid S, Hutchings A, Watts RA, Merkel PA, Luqmani RA. 2022 American College of Rheumatology/European Alliance of Associations for Rheumatology classification criteria for granulomatosis with polyangiitis. *Ann Rheum Dis.* 2022;81(3):315-20.
10. Flossmann O, Berden A, de Groot K, Hagen C, Harper L, Heijl C, Höglund P, Jayne D, Luqmani R, Mahr A, Mukhtyar C, Pusey C, Rasmussen N, Stegeman C, Walsh M, Westman K. Long-term patient survival in ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(3):488-94.
11. Gayraud M, Guillevin L, le Toumelin P, Cohen P, Lhote F, Casassus P, Jarrousse B. Long-term followup of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, and Churg-Strauss syndrome: analysis of four prospective trials including 278 patients. *Arthritis Rheum.* 2001;44(3):666-75.
12. Booth AD, Almond MK, Burns A, Ellis P, Gaskin G, Neild GH, Plaisance M, Pusey CD, Jayne DR. Outcome of ANCA-associated renal vasculitis: a 5-year retrospective study. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(4):776-84.
13. Lee T, Gasim A, Derebail VK, Chung Y, McGregor JG, Lionaki S, Poulton CJ, Hogan SL, Jennette JC, Falk RJ, Nachman PH. Predictors of treatment outcomes in ANCA-associated vasculitis with severe kidney failure. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(5):905-13.
14. Li ZY, Gou SJ, Chen M, Zhao MH. Predictors for outcomes in patients with severe ANCA-associated glomerulonephritis who were dialysis-dependent at presentation: a study of 89 cases in a single Chinese center. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;42(5):515-21.
15. Perry SR, Rootman J, White VA. The clinical and pathologic constellation of Wegener granulomatosis of the orbit. *Ophthalmology.* 1997;104(4):683-94.
16. Chung SA, Langford CA, Maz M, Abril A, Gorelik M, Guyatt G, Archer AM, Conn DL, Full KA, Grayson PC, Ibarra MF, Imundo LF, Kim S, Merkel PA, Rhee RL, Seo P, Stone JH, Sule S, Sundel RP, Vitobaldi OI, Warner A, Byram K, Dua AB, Husainat N, James KE, Kalot MA, Lin YC, Springer JM, Turgunbaev M, Villa-Forte A, Turner AS, Mustafa RA. 2021 American College of Rheumatology/Vasculitis Foundation Guideline for the Management of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis Rheumatol.* 2021;73(8):1366-83.

17. Yates M, Watts R. ANCA-associated vasculitis. *Clin Med (Lond)*. 2017;17(1):60-4.
18. Nakazawa D, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(2):91-101.
19. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459-89.
20. Elmér E, Smargianaki S, Pettersson Å, Skattum L, Ohlsson S, Hellmark T, Johansson ÅCM. Increased Frequencies of Switched Memory B Cells and Plasmablasts in Peripheral Blood from Patients with ANCA-Associated Vasculitis. *Journal of Immunology Research*. 2020;2020:8209737.
21. Dumoitier N, Terrier B, London J, Lofek S, Mouthon L. Implication of B lymphocytes in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Autoimmunity Reviews*. 2015;14(11):996-1004.
22. Jennette JC, Falk RJ. B cell-mediated pathogenesis of ANCA-mediated vasculitis. *Seminars in Immunopathology*. 2014;36(3):327-38.
23. Pérez-Figueroa E, Álvarez-Carrasco P, Ortega E, Maldonado-Bernal C. Neutrophils: Many Ways to Die. *Front Immunol*. 2021;12:631821.
24. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
25. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-41.
26. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacker W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000639.
27. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463-9.

28. Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NETs. *J Leukoc Biol.* 2021;110(4):797-808.
29. Granger V, Peyneau M, Chollet-Martin S, de Chaisemartin L. Neutrophil Extracellular Traps in Autoimmunity and Allergy: Immune Complexes at Work. *Front Immunol.* 2019;10:2824.
30. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9813-8.
31. Hacbarth E, Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* 1986;29(11):1334-42.
32. Cloke T, Munder M, Taylor G, Muller I, Kropf P. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS One.* 2012;7(11):e48939.
33. Deng Y, Ye J, Luo Q, Huang Z, Peng Y, Xiong G, Guo Y, Jiang H, Li J. Low-Density Granulocytes Are Elevated in Mycobacterial Infection and Associated with the Severity of Tuberculosis. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153567.
34. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, McCune WJ, Kaplan MJ. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol.* 2010;184(6):3284-97.
35. Ostendorf L, Mothes R, van Koppen S, Lindquist RL, Bellmann-Strobl J, Asseyer S, Ruprecht K, Alexander T, Niesner RA, Hauser AE, Paul F, Radbruch H. Low-Density Granulocytes Are a Novel Immunopathological Feature in Both Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Front Immunol.* 2019;10:2725.
36. Endo A, Komagata Y, Yamagishi K, Kawashima S, Arimura Y, Kaname S. Two distinct subsets of LDGs (low density granulocytes) in ANCA-associated vasculitis. *Mod Rheumatol.* 2022;32(2):396-405.
37. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 2013;35(4):455-63.
38. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao W, Olsen SH, Klinker M, Shealy D, Denny MF, Plumas J, Chaperot L, Kretzler

- M, Bruce AT, Kaplan MJ. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2011;187(1):538-52.
39. Kaplan MJ. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(12):691-9.
40. Tay SH, Celhar T, Fairhurst AM. Low-Density Neutrophils in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(10):1587-95.
41. O'Neil LJ, Kaplan MJ, Carmona-Rivera C. The Role of Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Vascular Damage in Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Med.* 2019;8(9).
42. Ui Mhaonaigh A, Coughlan AM, Dwivedi A, Hartnett J, Cabral J, Moran B, Brennan K, Doyle SL, Hughes K, Lucey R, Floudas A, Fearon U, McGrath S, Cormican S, De Bhailis A, Molloy EJ, Brady G, Little MA. Low Density Granulocytes in ANCA Vasculitis Are Heterogenous and Hypo-Responsive to Anti-Myeloperoxidase Antibodies. *Front Immunol.* 2019;10:2603.
43. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Grone HJ, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* 2009;15(6):623-5.
44. Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, Guarnotta C, Cappetti B, Casalini P, Piconese S, Parenza M, Guiducci C, Vitali C, Colombo MP. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood.* 2012;120(15):3007-18.
45. Lazzaretto B, Fadeel B. Intra- and Extracellular Degradation of Neutrophil Extracellular Traps by Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol.* 2019;203(8):2276-90.
46. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, Homey B, Barrat FJ, Zal T, Gilliet M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med.* 2009;206(9):1983-94.
47. Apel F, Andreeva L, Knackstedt LS, Streeck R, Frese CK, Goosmann C, Hopfner KP, Zychlinsky A. The cytosolic DNA sensor cGAS recognizes neutrophil extracellular traps. *Sci Signal.* 2021;14(673).

48. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ, Banchereau J, Pascual V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011;3(73):73ra20.
49. Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin Immunopathol.* 2017;39(2):153-63.
50. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154(1):3-20.
51. Karagun E, Gamsizkan M, Buyucek S, Coskun S. CD123 immunoexpression in cutaneous lupus erythematosus, polymorphous light eruption, pityriasis rosea, and mycosis fungoides. *Postepy Dermatol Alergol.* 2021;38(6):994-1000.
52. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schröder JM, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007;449(7162):564-9.
53. Gary-Gouy H, Lebon P, Dalloul AH. Type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells and monocytes is triggered by viruses, but the level of production is controlled by distinct cytokines. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22(6):653-9.
54. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity.* 2006;25(3):383-92.
55. Soni C, Perez OA, Voss WN, Pucella JN, Serpas L, Mehl J, Ching KL, Goike J, Georgiou G, Ippolito GC, Sisirak V, Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells and Type I Interferon Promote Extrafollicular B Cell Responses to Extracellular Self-DNA. *Immunity.* 2020;52(6):1022-38.e7.
56. Panda SK, Kolbeck R, Sanjuan MA. Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology.* 2017;44:20-5.
57. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 2003;19(2):225-34.
58. Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 1999;66(2):205-8.

59. Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Kimura H, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Reduced blood BDCA-2+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2005;142(1):84-91.
60. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology.* 2015;220(6):833-44.
61. Laffont S, Siddiqui KR, Powrie F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2010;40(7):1877-83.
62. Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, Liu Y, Narayanan P, Seneschal J, Maurouard T, Dougall D, Davizon ES, Dumortier H, Douchet I, Raffray L, Richez C, Lazaro E, Duffau P, Truchetet ME, Khoryati L, Mercie P, Couzi L, Merville P, Schaefferbeke T, Villard JF, Pellegrin JL, Moreau JF, Muller S, Zurawski S, Coffman RL, Pascual V, Ueno H, Blanco P. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity.* 2015;42(6):1159-70.
63. Pillai S, Mattoo H, Cariappa A. B cells and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(6):721-31.
64. Möckel T, Basta F, Weinmann-Menke J, Schwarting A. B cell activating factor (BAFF): Structure, functions, autoimmunity and clinical implications in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Autoimmun Rev.* 2021;20(2):102736.
65. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-41.
66. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):160-71.
67. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2000;165(10):5970-9.
68. Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, Valet G, Lipsky PE, Dorner T. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1332-42.

69. Oleinika K, Mauri C, Salama AD. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2019;15(1):11-26.
70. Matsumoto K, Suzuki K, Yoshimoto K, Seki N, Tsujimoto H, Chiba K, Takeuchi T. Significant association between clinical characteristics and immuno-phenotypes in patients with ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology*. 2019;59(3):545-53.
71. von Borstel A, Land J, Abdulahad WH, Rutgers A, Stegeman CA, Diepstra A, Heeringa P, Sanders JS. CD27+CD38hi B Cell Frequency During Remission Predicts Relapsing Disease in Granulomatosis With Polyangiitis Patients. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
72. Popa ER, Stegeman CA, Bos NA, Kallenberg CGM, Tervaert JWC. Differential B- and T-cell activation in Wegener's granulomatosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999;103(5):885-94.
73. Hurtado PR, Jeffs L, Nitschke J, Patel M, Sarvestani G, Cassidy J, Hissaria P, Gillis D, Peh CA. CpG oligodeoxynucleotide stimulates production of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ANCA associated vasculitis. *BMC Immunol*. 2008;9:34.
74. Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(5):990-7.
75. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(11):4115-9.
76. Lipka S, Ostendorf L, Schneider U, Hiepe F, Apel F, Alexander T. Increased levels of immature and activated low density granulocytes and altered degradation of neutrophil extracellular traps in granulomatosis with polyangiitis. *PLoS One*. 2023;18(3):e0282919.
77. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 2002;169(2):898-905.
78. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel AV, Wang X, Tomar D, Woodruff MC, Simon Z, Bugrovsky R, Blalock EL, Scharer CD, Tipton CM, Wei C, Lim SS, Petri M, Niewold TB, Anolik JH, Gibson G, Lee FE, Boss JM, Lund FE, Sanz I. Distinct

Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2018;49(4):725-39.e6.

79. Sigma-Aldrich. Histopaque®-1119 2023 [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/11191>].

80. Sigma-Aldrich. Percoll® 2023 [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/ge17089101?>

81. Scientific T. eBioscience™ Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff eFluor™ 780 2006-2023 [Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/65-0865-14>].

82. Mullins JM. Fluorochromes: Properties and Characteristics. In: Oliver C, Jamur MC, editors. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 123-34.

83. Brinkmann V, Goosmann C, Kuhn LI, Zychlinsky A. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front Immunol*. 2012;3:413.

84. Jensen WA, Wicks-Beard BJ, Cockerell GL. Inhibition of protein kinase C results in decreased expression of bovine leukemia virus. *J Virol*. 1992;66(7):4427-33.

85. Knackstedt SL, Georgiadou A, Apel F, Abu-Abed U, Moxon CA, Cunnington AJ, Raupach B, Cunningham D, Langhorne J, Kruger R, Barrera V, Harding SP, Berg A, Patel S, Otterdal K, Mordmuller B, Schwarzer E, Brinkmann V, Zychlinsky A, Amulic B. Neutrophil extracellular traps drive inflammatory pathogenesis in malaria. *Sci Immunol*. 2019;4(40).

86. Wilhelm TR, Taddeo A, Winter O, Schulz AR, Malzer JN, Domingo C, Biesen R, Alexander T, Thiel A, Radbruch A, Hiepe F, Gerl V. Siglec-1-positive plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in human peripheral blood: A semi-mature and myeloid-like subset imbalanced during protective and autoimmune responses. *Clin Immunol*. 2016;163:42-51.

87. Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grun JR, Steinbrich-Zollner M, Backhaus M, Haupl T, Rudwaleit M, Riemekasten G, Radbruch A, Hiepe F, Burmester GR, Grutzkau A. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2008;58(4):1136-45.

88. Kronbichler A, Lee KH, Denicolò S, Choi D, Lee H, Ahn D, Kim KH, Lee JH, Kim H, Hwang M, Jung SW, Lee C, Lee H, Sung H, Lee D, Hwang J, Kim S, Hwang I, Kim

- DY, Kim HJ, Cho G, Cho Y, Kim D, Choi M, Park J, Park J, Tizaoui K, Li H, Smith L, Koyanagi A, Jacob L, Gauckler P, Shin JI. Immunopathogenesis of ANCA-Associated Vasculitis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19).
89. Ning X, Wang WM, Jin HZ. Low-Density Granulocytes in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *J Immunol Res.* 2022;2022:1622160.
90. London J, Dumoitier N, Lofek S, Dion J, Chaigne B, Mocek J, Thieblemont N, Cohen P, Le Jeune C, Guillevin L, Witko-Sarsat V, Varin-Blank N, Terrier B, Mouthon L. Skewed peripheral B- and T-cell compartments in patients with ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* 2021;60(5):2157-68.
91. Akiyama M, Zeisbrich M, Ibrahim N, Ohtsuki S, Berry GJ, Hwang PH, Goronzy JJ, Weyand CM. Neutrophil Extracellular Traps Induce Tissue-Invasive Monocytes in Granulomatosis With Polyangiitis. *Front Immunol.* 2019;10:2617.
92. Wang H, Sha LL, Ma TT, Zhang LX, Chen M, Zhao MH. Circulating Level of Neutrophil Extracellular Traps Is Not a Useful Biomarker for Assessing Disease Activity in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148197.
93. Bruschi M, Bonanni A, Petretto A, Vaglio A, Pratesi F, Santucci L, Migliorini P, Bertelli R, Galetti M, Belletti S, Cavagna L, Moroni G, Franceschini F, Fredi M, Pazzola G, Allegri L, Sinico RA, Pesce G, Bagnasco M, Manfredi A, Ramirez GA, Ramoino P, Bianchini P, Puppo F, Pupo F, Negrini S, Mattana F, Emmi G, Garibotto G, Santoro D, Scolari F, Ravelli A, Tincani A, Cravedi P, Volpi S, Candiano G, Ghiggeri GM. Neutrophil Extracellular Traps Profiles in Patients with Incident Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis. *J Rheumatol.* 2020;47(3):377-86.
94. Yoshida M, Sasaki M, Sugisaki K, Yamaguchi Y, Yamada M. Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis. *Clin Kidney J.* 2013;6(3):308-12.
95. O'Sullivan KM, Lo CY, Summers SA, Elgass KD, McMillan PJ, Longano A, Ford SL, Gan PY, Kerr PG, Kitching AR, Holdsworth SR. Renal participation of myeloperoxidase in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2015;88(5):1030-46.

96. Reijnders TDY, Stegeman CA, Huitema MG, Rutgers A, Heeringa P, Abdulahad WH. Unraveling the identity of FoxP3+ regulatory T cells in Granulomatosis with Polyangiitis patients. *Sci Rep.* 2019;9(1):8273.
97. Davis JC, Jr., Manzi S, Yarboro C, Rairie J, McInnes I, Averbely D, Sinicropi D, Hale VG, Balow J, Austin H, Boumpas DT, Klippel JH. Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus.* 1999;8(1):68-76.
98. O'Sullivan KM, Holdsworth SR. Neutrophil Extracellular Traps: A Potential Therapeutic Target in MPO-ANCA Associated Vasculitis? *Front Immunol.* 2021;12:635188.
99. Domínguez-Quintana M, Alba MA, Hinojosa-Azaola A. Classification of ANCA-associated vasculitis: differences based on ANCA specificity and clinicopathologic phenotype. *Rheumatol Int.* 2021;41(10):1717-28.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Spyridon Lipka, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung von neutrophilen Granulozyten und Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bei Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), Characterization of neutrophil granulocytes and Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Granulomatosis with polyangiitis (GPA) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Spyridon Lipka hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Lipka S, Ostendorf L, Schneider U, Hiepe F, Apel F, Alexander T (2023) Increased levels of immature and activated low density granulocytes and altered degradation of neutrophil extracellular traps in granulomatosis with polyangiitis. PLoS ONE 18(3): e0282919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919>

Beitrag im Einzelnen:

Laborarbeit: Die Durchführung der Experimente erfolgte durch mich. Folgende Experimente habe ich selbständig durchgeführt: Gewinnung des Probenmaterials (Blut), Auftrennung des Bluts, Vorbereitung und Färbung der Zellen für FACS, Vorbereitung der NDGs für die Bestimmung der NETose-Kapazität mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, Durchführung der Experimente: NET-ELISA und DNase-Assay.

Datenakquisition: Ich sammelte Daten mit Hilfe der Datenbank SAP. Dazu gehörten neben den klinischen Daten (Symptome, Therapie, Komplikationen) auch laborchemische Daten (Serologie, Antikörperlabor). Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Tobias Alexander.

Datenauswertung und statistische Analyse: Ich habe mit Hilfe des Programms GraphPad Prism die statistische Auswertung der Daten vorgenommen. Für etwaige Fragen standen mir Herr Dr. rer. nat. Falko Apel und PD Dr. med. Tobias Alexander zur Verfügung.

Dateninterpretation: Die Dateninterpretation erfolgte durch mich in Zusammenarbeit und Supervision von Herrn Dr. rer. nat. Falko Apel und PD Dr. med. Tobias Alexander.

Literaturrecherche: Die Literaturrecherche erfolgte primär durch mich. Hilfreiche Anregungen bekam er durch PD Dr. med. Tobias Alexander.

Erstellung der Publikation: Das Manuskript der Publikation (76) wurde von mir verfasst. Die Abbildung 1 habe ich mithilfe des Programms GraphPad PRISM 8.0.2 (Fig. 1A und B) und mithilfe des Programms FlowJo 10.6.1 (Fig. 1C und D) erstellt. Die Figures 2-5 und S1 habe ich mithilfe des Programms GraphPad PRISM 8.0.2 erstellt. Die Formatierung der Figures 1-5 wurde gemeinsam mit PD Dr. med. Tobias Alexander festgelegt. Fig. S2 habe ich selbst erstellt, ohne dass eine Formatierungshilfe von PD Dr. med. Tobias Alexander nötig war. Die Tables 1 und S2 stammen von mir. PD Dr. med. Tobias Alexander hat mir dabei bei der Berechnung der *P-Values* von **Age** (median, IQR) und

Female (n, %) geholfen. Das mehrfache Korrekturlesen erfolgte wesentlich durch mich in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Tobias Alexander und Herrn Dr. rer. nat. Falko Apel.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplar(e) der Publikation(en)

PLOS ONE

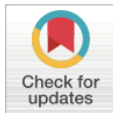
RESEARCH ARTICLE

Increased levels of immature and activated low density granulocytes and altered degradation of neutrophil extracellular traps in granulomatosis with polyangiitis

Spyridon Lipka^{1,2}, Lennard Ostendorf^{2,3,4}, Udo Schneider⁴, Falk Hiepe^{2,4}, Falko Apel^{1,5}, Tobias Alexander^{2,4*}

1 Department of Cellular Microbiology, Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany, 2 Deutsches Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ Berlin)—a Leibniz Institute, Autoimmunology Group, Berlin, Germany, 3 Department of Nephrology and Intensive Care Medicine—Charité—Universitätsmedizin Berlin, Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and the Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany, 4 Department of Rheumatology and Clinical Immunology—Charité—Universitätsmedizin Berlin, Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and the Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany, 5 Department of Biology, Humboldt University, Berlin, Germany

* tobias.alexander@charite.de



OPEN ACCESS

Citation: Lipka S, Ostendorf L, Schneider U, Hiepe F, Apel F, Alexander T (2023) Increased levels of immature and activated low density granulocytes and altered degradation of neutrophil extracellular traps in granulomatosis with polyangiitis. PLoS ONE 18(3): e0282919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919>

Editor: Pierre Bobé, Université Paris-Saclay, FRANCE

Received: October 4, 2022

Accepted: February 24, 2023

Published: March 15, 2023

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919>

Copyright: © 2023 Lipka et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Abstract

Granulomatosis with Polyangiitis (GPA) is a small vessel vasculitis typically associated with release of neutrophil extracellular traps (NETs) by activated neutrophils. In this study, we further aimed to investigate the contributions of neutrophils and NETs to the complex disease pathogenesis. We characterized the phenotype of neutrophils and their capacity to induce NETs. In addition, the level of circulating NETs, determined by neutrophil elastase/DNA complexes, and the capacity of patient sera to degrade NETs were investigated from blood samples of 12 GPA patients, 21 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and 21 healthy donors (HD). We found that GPA patients had significantly increased levels of low-density granulocytes (LDGs) compared to HD, which displayed an activated and more immature phenotype. While the propensity of normal-density granulocytes to release NETs and the levels of circulating NETs were not significantly different from HD, patient sera from GPA patients degraded NETs less effectively, which weakly correlated with markers of disease activity. In conclusion, increased levels of immature and activated LDGs and altered degradation of circulating NETs may contribute to pathogenesis of GPA, potentially by providing a source of autoantigens that trigger or further enhance autoimmune responses.

Introduction

Granulomatosis with polyangiitis (GPA) is a pauci-immune vasculitis that affects small- and medium-size vessels [1]. It commonly affects the upper respiratory tract and in severe cases the lung and kidneys [2]. The immunopathogenesis of GPA is complex, involving cellular and soluble mediators of both the innate and the adaptive immune system [3]. The hallmark of the

Funding: This work was supported by core funding by the Max Planck Institute of Infection Biology, provided by the Max Planck Gesellschaft, and the Leibniz Science Campus Chronic Inflammation (www.chronischeentzuendung.org). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: No authors have competing interests

disease are antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), which are detectable in the vast majority of patients [4]. In GPA, ANCAs are mostly directed against the neutrophil protease proteinase 3 (PR3) [5], a serin protease with antimicrobial effects that is normally stored in granules of neutrophils [6]. These ANCAs have been shown to activate neutrophils to produce reactive oxygen species (ROS) and proteolytic enzymes, resulting in necrotizing vessel inflammation [7].

Recent studies have implicated neutrophils in the pathogenesis of GPA, particularly low-density granulocytes (LDGs) that displayed disease-specific characteristics [8] and transcriptional dysregulation [9,10]. Furthermore, LDGs in GPA and systemic lupus erythematosus (SLE) are more prone to spontaneously release NETs than neutrophils from healthy blood donors [11–14], and are regarded as a major source of NETs in ANCA-associated vasculitis (AAV) [15]. NETs result from a regulated necrotic death called NETosis, which is characterized by the extrusion of chromatin associated with antimicrobial molecules into the extracellular space [16]. They contain various proteins with proinflammatory characteristics, such as high-mobility group box 1 (HMGB1), neutrophil elastase (NE), and, notably, myeloperoxidase (MPO) and PR3 [17]. While NETs are commonly induced by pathogens during immediate host defence [18,19], immune complexes [20] and PR3- and MPO-ANCA are also capable of inducing NETosis [21].

It was previously shown that NETs were present in inflamed tissues, including glomeruli in kidney biopsies [21] and affected skin lesions [22] of AAV patients. In addition, NET-associated proteins and structures have been detected in the circulation of patients (reviewed in [15]), but the precise role of NETosis in GPA remains to be determined. It has been proposed that NETs contribute to vessel inflammation directly by damaging endothelial cells [12,23] and indirectly by triggering adaptive immune responses leading to generation of ANCAs [15]. NETs are degraded in the blood by an enzyme called DNase 1, an exonuclease found in serum [24]. Thus, overabundance of NETs in AAV may not only result from enhanced production but also from impaired clearance. Initial reports have already indicated a less efficient degradation of NETs in AAV due to impaired DNase 1 activity [12,25]. While the source of PR3 inducing the production of ANCA in GPA is not clearly identified, it is possible that PR3 contained within NETs [26] may play a role.

Herein, we further delineated the role of neutrophils and NETs in the complex immunopathogenesis of GPA. We found that levels of peripheral blood LDGs were significantly increased in GPA patients compared to healthy controls, and displayed an activated and more immature phenotype. The propensity of neutrophils to undergo NETosis was not enhanced when normal-density granulocytes (NDGs) were incubated *in vitro* and NETs, determined by DNA/NE complexes, were not significantly elevated in sera from GPA patients. However, the capacity of GPA sera to degrade NETs was significantly impaired in our cohort of patients and correlated with clinical and serologic markers of disease activity, implicating netting neutrophils as critical component for the disease pathogenesis of GPA.

Methods

Patients and controls

The study population included 12 patients with granulomatosis with polyangiitis (GPA) who fulfilled the 2017 Provisional ACR/EULAR classification criteria for GPA [27]. Their demographics disease characteristics of patients are provided in Table 1. 21 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) meeting the 2019 EULAR/ACR classification criteria [28] and 21 healthy controls served as control. The study was approved by the Institutional Review Board

Table 1. Patient characteristics.

	Healthy donors	GPA	SLE	P Value
Number	21	12	21	
Age (median, IQR)	30 (20–56)	58 (52–76)	34 (18–52)	HD vs. GPA $P < 0.001$ HD vs. SLE $P = 0.162$
Female (n, %):	20 (95.0)	5 (46.0)	20 (95.0)	HD vs. GPA $P < 0.001$ HD vs. SLE $P = 1.00$
Clinical manifestations (n, %)				
Renal involvement	0	8 (66.7)	4	
Head/Neck	0	7 (58.3)	0	
Pulmonary	0	8 (66.7)	0	
ANCA status				
PR-3 positivity (n, %)	-	9 (75.0)	0	
MPO positivity (n, %)	-	0 (0)	0	
BVAS (median score, range)	-	6.5 (0–18)	-	
SLEDAI-2K (median score, range)	-	-	(2–24)	
Immunosuppressive and biologic medications (n, %)	0	GC: 11 (91.7) AZA: 2 (16.7) MTX: 5 (41.7) RTX: 3 (25)	GC: 18 (85.7) HCQ: 14 (66.7) AZA: 5 (23.8) MMF: 8 (38.1) MTX: 2 (9.5) CsA: 1 (4.8) BEL: 1 (4.8)	
Daily prednisolone dosage (mg) (median, range)	0	13.5 (0–50)	10.0 (0–100)	

Demographic and serological data of GPA and SLE patients. Abbreviations: AZA, Azathioprine; BEL, Belimumab; BVAS, Birmingham Vasculitis Activity Score; CsA, Cyclosporin A; GC, Glucocorticoids; HCQ, Hydroxychloroquine; MMF, Mycophenolate Mofetil; MPO, Myeloperoxidase; MTX, Methotrexate; PR3, proteinase 3; RTX, Rituximab; SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000. Statistical analysis comparing differences in age was performed using the Mann-Whitney test, sex differences with the chi-square test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919.t001>

of the Charité – University Medicine Berlin (EA 1/372/13) and written informed consent was obtained by all participants prior to enrolment in the study.

Cell preparation and separation

Neutrophils were freshly isolated from peripheral blood as previously described [29]. Briefly, heparinized peripheral blood was layered on Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich) and centrifuged at 800g for 20min. After collecting and washing both the PBMC and neutrophil layer, the latter was subsequently layered on a discontinuous Percoll-gradient (Cytiva). After centrifugation at 800g for 20min, NDGs were harvested and washed before further analysis.

Flow cytometry

To investigate the phenotype of neutrophils, freshly isolated NDGs and LDGs were incubated with the following antibodies for 30 minutes on ice: CD10-PerCP-Cy5.5 (clone HI10a, BD Pharmingen, 25µg/mL), CD15-PE-Vio770 (clone VIMC6), CD16-VioGreen (clone REA423), CD33-FITC (clone REA775), CD62L-VioBlue (clone 145/15), CD63-PE (clone REA1055) and CD66b-APC (clone REA306), all Miltenyi Biotec, Germany. Flow cytometry was performed using the MACSQuant® flow cytometer (Miltenyi Biotec, Germany). Data analysis was performed with FlowJo software (TreeStar, CA, version 10.6.1). To determine the absolute numbers of NDGs from peripheral blood, Truecount™ tubes (BD Biosciences) were used according to the manufacturer's instructions after staining full blood with CD45-FITC (clone REA747), CD16-VioGreen (clone REA423) and CD19-APC (clone REA675, all Miltenyi

Biotec) and lysis with immediate fixation using the Fix/Lyse Solution (Invitrogen). In contrast, absolute numbers of LDGs were determined by calculating the percentage of CD15⁺ LDGs contained in the PBMC-layer from the absolute number of CD45⁺ PBMCs as determined by Truecount assessment.

NETosis assay

NET-production of peripheral blood neutrophils was determined *in vitro* as previously described [30]. Briefly, freshly isolated neutrophils were plated on coverslips and treated with 100 nM PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, Sigma Aldrich) in RPMI containing 0.05% human serum albumin (HSA, Gibco® ThermoFisher) or left untreated. After fixation with 2% PFA (paraformaldehyde) at 2 and 4h, the coverslips were washed and permeabilized with 0.5% TritonX-100/PBS for 5 min. Subsequently, cells were incubated for 2h with an anti-chromatin antibody (PL2-3, produced in house), a rabbit-anti-neutrophil-elastase-antibody (Calbiochem, Merck). After washing, goat anti-mouse Alexa568, goat anti-rabbit Alexa488 and Hoechst 3342 (all ThermoFisher) were added and incubated for 1 hour on ice. After several washing steps, immunofluorescence microscopy was performed using the Evos FL Auto 2 fluorescent microscope from Invitrogen. Images were analysed using ImageJ as described before. Briefly using the settings and thresholds described by Brinkmann et al. [30] the NET-rate was calculated as: NET-rate = 100*Objects counted (chromatin channel)/Objects counted (Hoechst channel).

NET ELISA and Proteinase-3 ELISA

A previously developed ELISA, detecting DNA/NE complexes, was used to determine the amount of circulating NETs in peripheral blood [31]. Briefly, 50 µl cryopreserved EDTA-plasma from patients was added to anti-neutrophil elastase (NE)-precoated plates using the human anti-NE ELISA kit (Hycult Biotech, HK319-01). After incubation at room temperature for 2h on the shaker with agitation at 300 rpm, plates were washed with ELISA wash-buffer (PBS, 0.05% Tween-20). Subsequently, 50 µl of anti-DNA-POD-antibodies (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche) were added and incubated for 1 hour. After washing and developing with ABTS and stopping with H₂SO₄, plates were measured in a microplate reader (VersaMax microplate readerTM, Molecular Devices). A standard curve was created by a serial dilution using isolated NETs from HD previously stimulated with PMA. The level of NETs was determined using the NanoDrop 2000 device, measuring the amount of DNA at a wavelength of 280 nm. All analyses were performed in duplicate, and mean values were reported.

Anti-Proteinase 3 (PR3) antibodies were analyzed from freshly obtained serum samples in our central laboratory facility (Labor Berlin). Quantitative assessment of IgG antibodies directed against PR3 was performed by ELISA (ORG 618, Anti-PR3 hs, ORGENTEC Diagnostika, Germany).

DNase 1 assay

The capacity of donor sera to degrade NETs was investigated as previously described [24]. Briefly, 0.4 µg NETs, induced with PMA in freshly isolated neutrophils from a healthy donor, were incubated with 50 µl of patient serum (25%) in the presence of 1U/ml Deoxyribonuclease 1 (DNase 1) or left untreated as negative control. The amount of DNA was determined at $t_0 = 0$ h and after incubation at $t_1 = 4,5$ h and overnight ($t_2 = 21$ h) with the Quant-iTTM PicoGreenTM dsDNA Assay-Kit (ThermoFisher). After calculating the percentages $P_1 = (t_1/t_0) * 100\%$ and $P_2 = (t_2/t_0) * 100\%$, the percentage of degraded NETs was defined at t_1 as $(100 - P_1) \%$ and at t_2 as $(100 - P_2) \%$. The positive control (NETs treated with DNase 1) was set to be 100%

of degraded NETs and the data were normalized accordingly. All analyses were carried out in triplicate, and mean values were reported.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 8.0.2 (San Diego, CA). For comparison of data between the patient groups, we used the Kruskal-Wallis test with Dunn's Correction for multiple testing. Correlation analysis of LDG frequencies, NET-production and NET-degradation with clinical and serologic disease markers was performed using Spearman correlation.

Results

LDGs are increased in GPA and display an immature and activated phenotype

We first investigated the number and phenotype of both low-density granulocytes (LDGs) and normal-density granulocytes (NDGs), freshly isolated from the peripheral blood of GPA patients, by flow cytometry. We found significantly increased levels of CD15⁺SSC^{hi} LDGs [8,32–34] in GPA patients compared to HD (median 7.7% vs 2.6%, $P = 0.020$) (Fig 1A), while the absolute number of LDGs did not differ (Fig 1B). The gating strategy is shown for one representative HD (Fig 1C) and one GPA patient (Fig 1D). Likewise, frequencies and absolute numbers of circulating CD16⁺ NDGs were not significantly different between HD and GPA patients, when analyzed from whole blood samples (S1A Fig). To assess whether GPA neutrophils differed phenotypically from neutrophils of HD, we investigated their surface expression of markers associated with activation, differentiation, adhesion and degranulation. Compared to HD, LDGs from GPA patients showed a more immature phenotype, reflected by significantly lower expression levels of CD10 (MFI 2288 vs 4576, $P = 0.039$, Fig 2A). In contrast, levels of CD33, another marker associated with immaturity, were not differentially expressed (Fig 2C). Furthermore, LDGs in GPA expressed significantly higher levels of CD66b (MFI 55605 vs 9724, $P = 0.006$), indicating a more activated phenotype (Fig 2F). However, other markers associated with activation (CD16, Fig 2B), adhesion (CD62L, Fig 2D) and degranulation (CD63, Fig 2E) were not differentially expressed between GPA and HD, emphasizing the unique nature of these LDGs. Similarly, NDGs of GPA patients expressed lower amounts of CD10 (Fig 2A) and higher amounts of CD66b (Fig 2F), indicating a more general alteration of granulocyte phenotypes in GPA.

NDGs in GPA display no enhanced NETosis *in vitro*

Neutrophils from patients with GPA have been reported to generate NETs more robustly than healthy individuals [32,33]. These studies most commonly investigated LDGs, which appear in the peripheral blood mononuclear cell layer of density-separated blood. To assess the capability of neutrophils to undergo NETosis in our cohort of patients, we purified NDGs from peripheral blood and measured their ability to produce NETs spontaneously and after stimulation with PMA. Representative immunofluorescence images displaying netting neutrophils are provided in S1B Fig. Without stimulation and after stimulation with PMA for 2 and 4 hours, respectively, no significant differences in the quantity of NET formation were observed (Fig 3), indicating that NDGs in GPA have no added propensity to produce NETs *in vitro* in our cohort of patients.

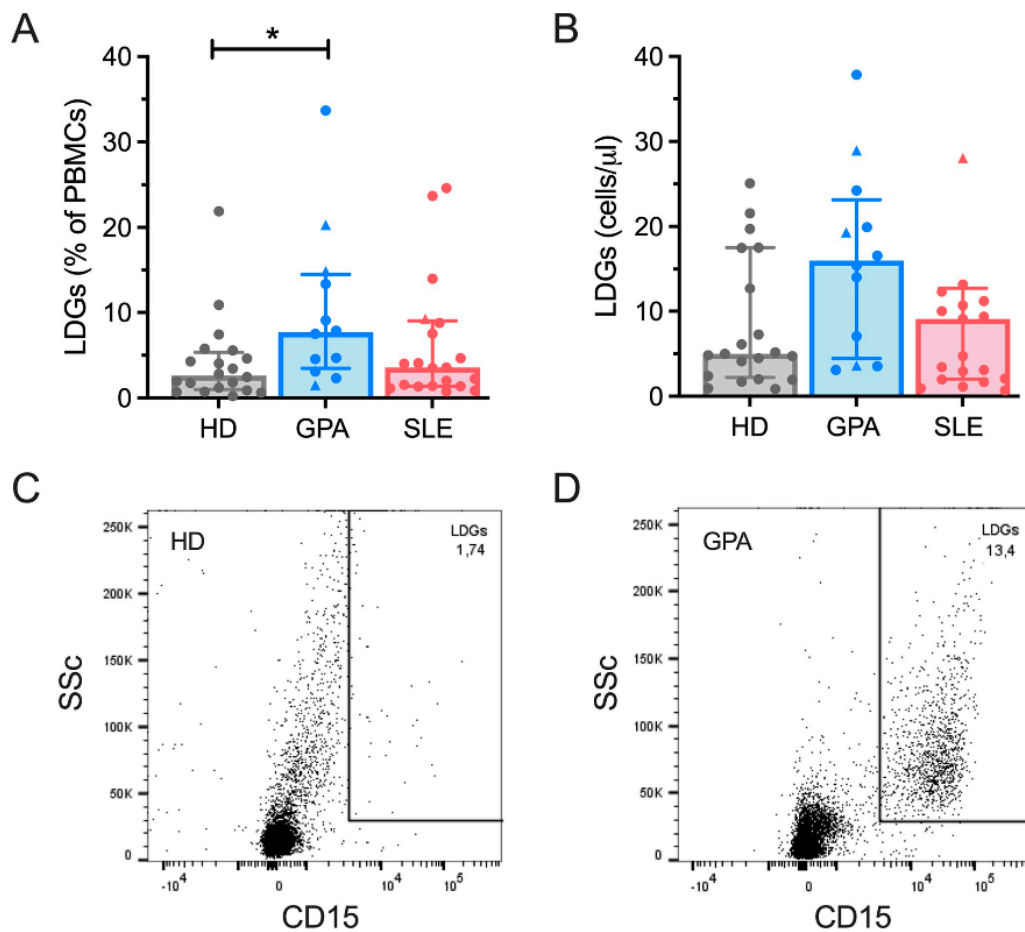


Fig 1. Quantification of LDGs. Percentage (A) and absolute numbers (B) of LDGs in peripheral blood (HD, n = 21; GPA, n = 12; SLE, n = 21). LDGs were defined as CD15⁺SSC^{hi} cells in the PBMC-layer of Percoll-separated blood by FACS, as previously reported (33). Each dot represents one measured patient sample. Patients receiving prednisolone dosages of ≥ 20 mg daily (3 patients with GPA and one patient with SLE) are indicated by triangles. Bars indicate median, error bars represent interquartile range. Data were analyzed by Kruskal-Wallis-test ($\alpha = 0.05$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Representative figures for the detection of LDGs in a healthy donor (C) and a patient with GPA (D) are provided.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919.g001>

Circulating NETs were not increased in GPA patients

Previous studies identified increased levels of NET remnants in the circulation of AAV patients, defined either as nucleosome/MPO complexes [21,35], total DNA or DNA/MPO complexes [36], or as mitochondrial DNA [37]. In this study, we measured the content of circulating NETs by using a previously developed ELISA detecting DNA/NE complexes, which was validated in a cohort of patients with *P. falciparum* malaria infection [31]. By using this assay, we found no increased levels of NETs isolated from EDTA-plasma of GPA patients compared to control groups (Fig 4A).

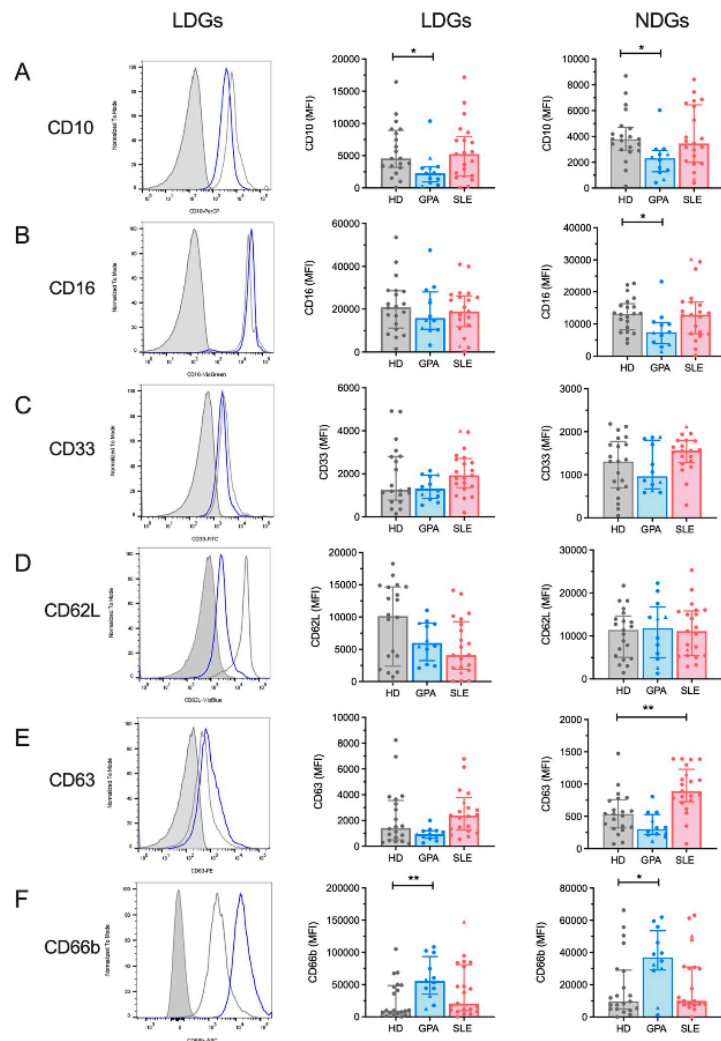


Fig 2. Phenotypic analysis of LDGs and NDGs. Surface markers associated with (A,C) maturity (CD10, CD33), (B,F) activation (CD16, CD66b), (D) adhesion (CD62L) and (E) degranulation (CD63) were measured on LDGs and NDGs (HD, n = 21; GPA, n = 12; SLE, n = 21) by flow cytometry. Patients receiving prednisolone dosages of ≥ 20 mg daily (3 patients with GPA and one patient with SLE) are indicated by triangles. Representative histograms of LDGs with respective FMO control stainings (grey filled curve) for a healthy donor (grey line) and a GPA patient (blue line) are shown. Each dot represents one measured patient sample. Median values \pm IQR are presented. Data were analysed by the Kruskal-Wallis-test ($\alpha = 0.05$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919.g002>

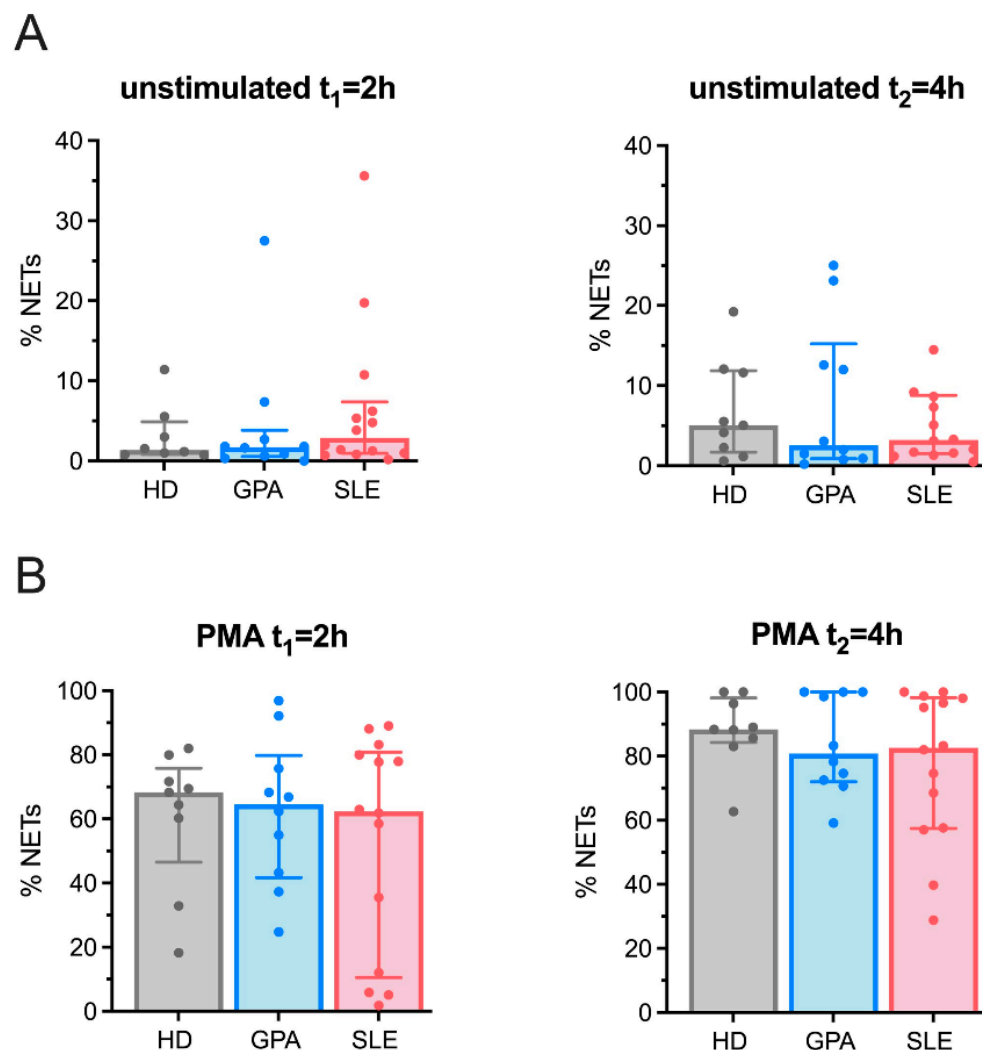


Fig 3. Quantification of NET-production *in vitro*. Freshly isolated NDGs were either (A) left untreated or (B) stimulated with 100nM PMA for 2 and 4 hours, respectively. The ability of NDGs to produce NETs was determined using immunofluorescence and a semiautomatic quantification in HD (n = 9), GPA (n = 10) and SLE (n = 14). Representative images are shown in S1B Fig and a detailed description of patient demographics is provided in S1 Table. Each dot represents one measured patient sample. Median values \pm IQR are presented. Data were analysed by the Kruskal-Wallis-test ($\alpha = 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919.g003>

Sera of GPA patients degrade NETs less efficiently than sera of HD

NET degradation involves digestion by macrophages and degradation by DNase 1, an endonuclease found in peripheral blood [24]. A previous study from our group demonstrated that a

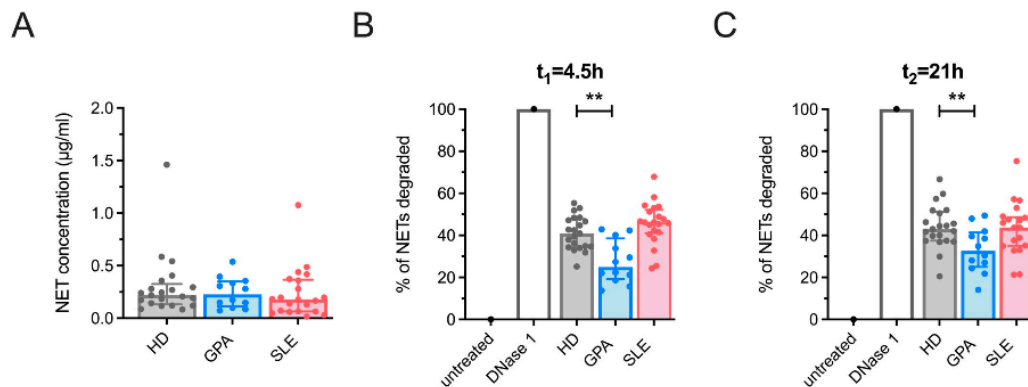


Fig 4. Quantification of NETs isolated from peripheral blood and DNase 1 assay. (A) NET-concentrations were determined by a NET-ELISA in EDTA-plasma (HD, n = 21; GPA, n = 12; SLE, n = 21). NET degradation activity of DNase 1 in serum was determined after t₁ = 4.5 h (B) and t₂ = 21 h (C) in HD, n = 21; GPA, n = 12; SLE: n = 21. Median values ± IQR are presented. Data were analysed by Kruskal-Wallis-test ($\alpha = 0.05$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919.g004>

subset of SLE patients degraded NETs poorly due to impaired serum DNase 1 function [24]. To determine the ability of patient sera to degrade NETs in GPA, we isolated NETs released by PMA-stimulated neutrophils from a healthy donor and incubated them with patient sera. The quenching of picogreen-fluorescence served as readout for NET degradation. We found that sera of the GPA-patients degraded NETs less efficiently than HD after incubation for 4.5 and 21 hours, respectively (Fig 4B and 4C), suggesting an underlying clearance deficiency in GPA.

DNase 1 degrading ability correlates inversely with clinical parameters of GPA

To investigate the potential biologic implications of the detected neutrophil alterations in GPA, we correlated our findings with clinical and serologic features of the disease. We found that the impaired degradation of NETs weakly correlated inversely with the Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS), a clinical score that measures clinical activity of vasculitis ($r = -0.582$, $P = 0.051$), and with serum levels of anti-PR3, which are associated with disease activity ($r = -0.627$, $P = 0.034$) (Fig 5A). These findings might be confounded by glucocorticoid therapy, as there was a similar trend of reduced NET degradation in patients with higher prednisolone dosage. In contrast, neither NET-concentration in plasma (Fig 5B) nor capacity of NGDs to form NETs after PMA stimulation (Fig 5C) or frequency of peripheral blood LDGs (Fig 5D) significantly correlated with disease markers investigated.

Discussion

There is a growing body of evidence that LDGs and NETs contribute to the pathogenesis of systemic autoimmune diseases, such as AAV [15,38]. In this study, we further investigated the role of neutrophils and NETs in the complex immune dysregulation of GPA and found that LDGs were significantly increased in peripheral blood and displayed a more immature and activated phenotype in GPA compared to healthy controls. Furthermore, while neither NET formation of NDGs nor circulating NETs were elevated, patient sera from GPA patients degraded NETs less effectively compared to HD. The impaired NET degradation inversely

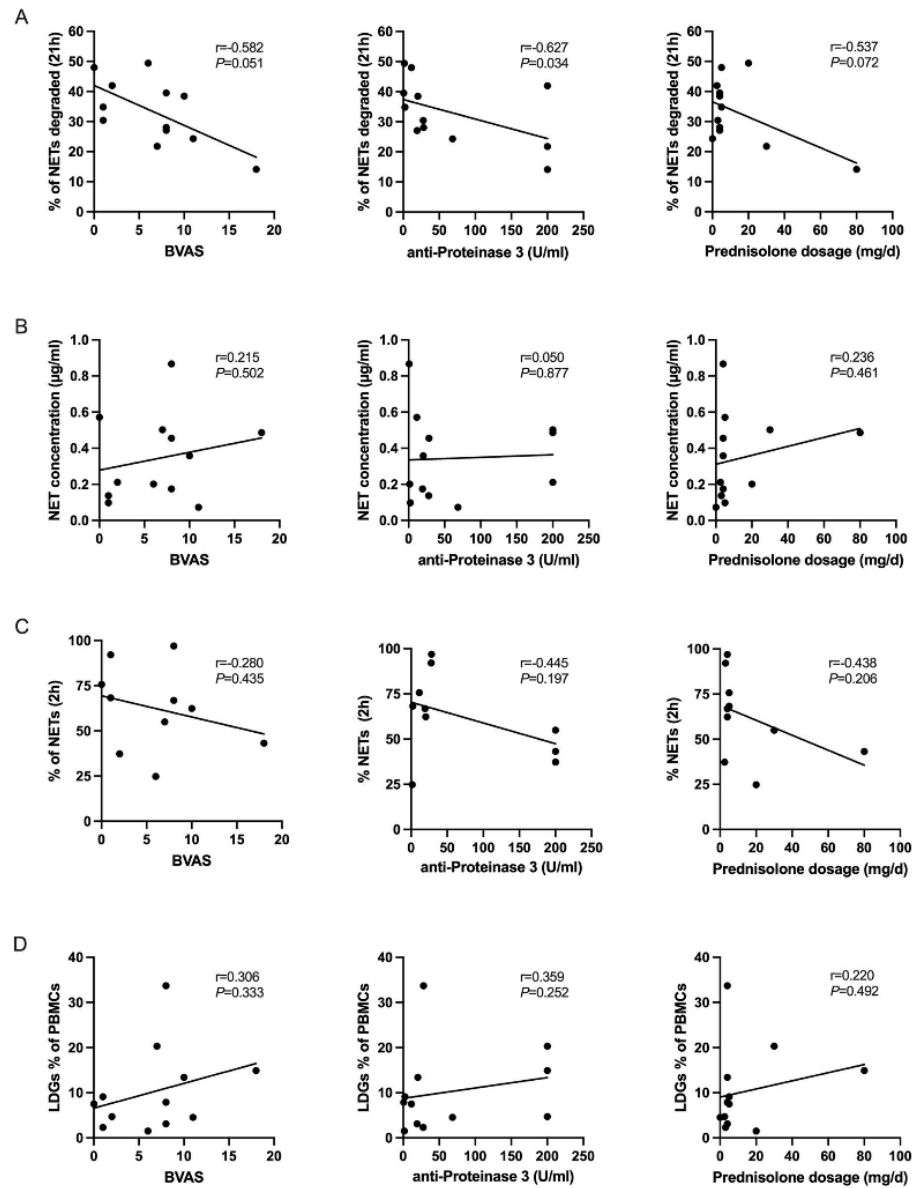


Fig 5. Correlation of NET-degradation, NET-concentration, NET formation of NDGs, and peripheral blood LDG levels with clinical and serologic activity measures in GPA, as well as daily prednisolone dosage. Spearman-correlations of (A) NETs-degradation-activity after 21 hours of incubation, (B) NET-concentration in peripheral blood as measured by ELISA, (C) frequency of NET formation of NDGs after 2h of PMA stimulation and (D) LDG levels in peripheral blood with BVAS, anti-PR3 titer in serum, as well as daily prednisolone dosage. Each dot represents one measured patient sample. Correlation-coefficient and *P*-value are depicted in the figure ($\alpha = 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919.g005>

correlated with clinical and serologic activation markers of GPA, such as BVAS scores and serum ANCA levels, implicating a potential role in the immunopathogenesis of the disease.

Our data confirm and extend previous findings. Particularly, increased frequencies of circulating LDGs were previously reported by several groups investigating AAV [8,32] and linked to disease activity [8,39,40]. In line with these notions, our cohort of GPA patients was characterized by high clinical and serologic disease activity despite treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs), by means of elevated BVAS-scores and c-ANCA levels, and comprised a 3-fold higher fraction of LDG within PBMC compared to HD. Although the precise mechanisms contributing to the overabundance of LDGs in AAV remain elusive, recent data suggest that they are highly heterogeneous in phenotype and function, and predominantly display features of hyperactivity and immaturity, distinct from their NDG counterparts [8,39,40]. In accordance with these findings, LDGs in our GPA patients were characterized by significantly decreased expression levels of the maturity marker CD10 and increased levels of the activation marker CD66b, while displaying normal expression levels of markers associated with immaturity (CD33), activation (CD16), adhesion (CD62L) and degranulation (CD63), emphasizing the unique nature of LDGs in GPA. Notably, heterogeneous populations of both immature and activated neutrophils have also been described in patients with Graft versus Host disease [41], HIV infection [42], multiple sclerosis [33], and SLE [43], suggesting common immunologic pathways under systemic activation of neutrophils and/or an “emergency granulopoiesis”, a process leading to increased release of neutrophils from the bone marrow during sepsis [44]. Similar mechanisms might therefore account for presence of such neutrophils in GPA.

Previous studies clearly linked neutrophils in GPA with more intense NETosis *in vitro*, particularly LDGs [11,12,15,39,40]. We now investigated the NET formation potential of NDGs, as they are by far the most abundant group of neutrophils in the circulation and because purification of LDGs with magnetic cell sorting (MACS), as described by other groups [43], has several limitations. Surprisingly, in contrast to previous reports, we found no increased propensity of NDGs to undergo NETosis, neither spontaneously nor upon stimulation. This discrepancy may be attributed to different methods of NET-detection, the influence of immunosuppressive therapies or the heterogeneity of clinical manifestations of included patients.

In addition to the presence of NETs in inflamed tissues from AAV patients [21,45], it has been demonstrated that these patients also have increased levels of NET-associated components in the circulation [46–54], both in active disease and remission [36]. In these studies, NETs were defined as nucleosome/MPO complexes [15,21], total DNA or DNA/MPO complexes [36], or as mitochondrial DNA [37]. We now measured the amount of circulating NETs by using a previously developed ELISA detecting DNA/NE complexes, that was previously used by our group to demonstrate increased NET release in patients with *P. falciparum* malaria infection [31]. By applying this method, we detected no significant differences in neutrophil-derived NETs in GPA-patients compared to HD and SLE. This was somewhat surprising in view of the fact that NE, in addition to MPO, has been demonstrated to regulate the formation of NETs [55], and previous studies measuring NE observed a correlation between NE and disease activity in AAV [56].

Increased NET formation must be balanced against clearance mechanisms, which involve macrophages, dendritic cells, and DNase 1 [57,58]. By incubating netting neutrophils derived from healthy donors with patient sera, we found that the degradation of NETs was significantly impaired in GPA patients compared to HD. These findings confirm previous data demonstrating a reduced DNA-degradation capacity in GPA [12], microscopic polyangiitis (MPA) [25] and SLE [12,24]. This effect could result from a reduced DNase 1 activity, as previously reported in MPA [25] and SLE patients [24,25]. However, whether this is linked to inherited

defects, like mutations [59] or polymorphisms [60] in DNase 1, predisposing to disease development, or the consequence of systemic inflammation and autoantibody formation remains unclear. Previous studies in SLE already indicated that antibodies binding to NETs significantly impaired DNase 1 degradation of NETs *in vitro* [24]. Reciprocally, studies in AAV suggested that ANCA may support the clearance of NETs, possibly through opsonisation and the formation of immune complexes [35].

Although GPA patient serum was deficient in NET degradation, NET levels were not elevated in GPA plasma. This could indicate that other pathways of NET degradation were activated that contribute to immunopathology, e.g. NET clearance by macrophages or mDCs. Macrophages for instance, have been described to degrade NETs in healthy donors [57]. In addition, this discrepancy may be explained by the accumulation of NETs in inflamed tissue lesions as described before in the kidney or even the lungs of patients [45,61]. Further research is required to confirm these notions.

Inhibition or degradation of NETs could resemble an interesting novel treatment target in AAV. For example, enhanced NETosis may be disrupted therapeutically with administration of DNase 1, which has been shown to be safe and tolerable in SLE patients [62] and discussed as potential treatment in AAV [63]. Other potential agents include the NE inhibitors Alvelestat and BAY 85–8501, as recently discussed as therapeutic option in MPO-AAV [63]. Future studies are warranted to evaluate the contributions of netting neutrophils to the pathogenesis of AAV and to identify novel therapeutic interventions from these disturbances.

Our study has few limitations. Most importantly, the sample size of GPA patients was rather low and the study probably underpowered to draw reliable conclusions. In addition, the patient cohort was heterogeneous in terms of background DMARD therapies and clinical phenotypes of the disease. This is of importance in view of a recent publication demonstrating that distinct disease patterns in GPA are associated with differences in NET formation and NET content, where LDGs from patients with head and neck manifestations had a particularly higher propensity to undergo NETosis [11]. A potential caveat for the interpretation of our data may also result from significant difference in age and sex distribution between GPA patients and control cohorts. In this context, previous studies indicated sex differences in neutrophil biology. For example, transcriptome profiling from healthy young adult females had a more activated/mature neutrophil profile characterized by enhanced type I interferon pathway activity, compared to neutrophils from male donors [64].

In conclusion, we identified increased levels of LDGs in active GPA patients, phenotypically characterized by immature and activated properties, with reduced surface expression of CD10 and increased expression of CD66b. NDGs from GPA patients were not prone to undergo NETosis more robustly compared to those from HD, neither spontaneously, nor upon PMA-stimulation, and NET-containing components, determined by DNA/NE complexes, were not elevated in plasma of GPA patients. However, a reduced capacity of NET degradation was evident in GPA, which negatively correlated with markers of clinical and serologic activity of the patients. Together, our data further support a concept, by which NETs may provide a source of autoantigens, due to prolonged exposure, for the generation of PR3-producing B- and plasma cells, potentially triggering or enhancing chronic autoimmune responses in GPA. Although the precise molecular mechanisms contributing to neutrophil activation and NET formation remain to be determined, NETs may resemble a novel future therapeutic target that merits further investigation.

Supporting information

S1 Fig. A) Quantification of NDGs. (A) Frequencies of NDGs among PBMCs and (B) absolute numbers of NDGs were determined by flow cytometry (HD, n = 21; GPA, n = 12; SLE,

n = 21) using the Truecount method. NDGs were identified as CD16⁺SSC⁺ cells in whole blood. Each dot represents one measured patient sample. Patients receiving prednisolone dosages of ≥ 20 mg daily (3 patients with GPA and one patient with SLE) are indicated by triangles. Median values \pm IQR are presented. Data were analyzed by Kruskal-Wallis-test, no significant differences were determined. **B) Microscopy images of netting neutrophils.** Representative immunofluorescence images to identify NETs formed by normal-density granulocytes (NDG) from one healthy donor and one patient with GPA without stimulation (upper row) or after certain time-points after PMA stimulation.

(PDF)

S1 Table. Patient characteristics in which NETs have been investigated as depicted in Fig 3.

(PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Falk Hiepe, Falko Apel, Tobias Alexander.

Formal analysis: Spyridon Lipka.

Funding acquisition: Falko Apel.

Investigation: Spyridon Lipka, Lennard Ostendorf.

Methodology: Falk Hiepe, Falko Apel, Tobias Alexander.

Project administration: Spyridon Lipka.

Resources: Tobias Alexander.

Supervision: Lennard Ostendorf, Udo Schneider, Falk Hiepe, Falko Apel, Tobias Alexander.

Validation: Udo Schneider.

Writing – original draft: Spyridon Lipka, Tobias Alexander.

Writing – review & editing: Falk Hiepe, Falko Apel, Tobias Alexander.

References

1. Yates M, Watts RA, Bajema IM, Cid MC, Crestani B, Hauser T, et al. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016; 75: 1583–1594. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209133> PMID: 27338776
2. Kitching AR, Anders H-J, Basu N, Brouwer E, Gordon J, Jayne DR, et al. ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2020; 6: 71. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0204-y> PMID: 32855422
3. Nakazawa D, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2019; 15: 91–101. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0145-y> PMID: 30542206
4. Geetha D, Jefferson JA. ANCA-Associated Vasculitis: Core Curriculum 2020. *American Journal of Kidney Diseases*. 2020; 75: 124–137. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.04.031> PMID: 31358311
5. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013; 65: 1–11. <https://doi.org/10.1002/art.37715> PMID: 23045170
6. Martin KR, Witko-Sarsat V. Proteinase 3: the odd one out that became an autoantigen. *J Leukoc Biol*. 2017; 102: 689–698. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0217-069R> PMID: 28546501
7. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 4115–4119. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.11.4115> PMID: 2161532

8. Ui Mhaonaigh A, Coughlan AM, Dwivedi A, Hartnett J, Cabral J, Moran B, et al. Low Density Granulocytes in ANCA Vasculitis Are Heterogenous and Hypo-Responsive to Anti-Myeloperoxidase Antibodies. *Front Immunol.* 2019; 10: 2603. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02603> PMID: 31781107
9. Jones BE, Herrera CA, Agosto-Burgos C, Starmer J, Bass WA, Poulton CJ, et al. ANCA autoantigen gene expression highlights neutrophil heterogeneity where expression in normal-density neutrophils correlates with ANCA-induced activation. *Kidney International.* 2020; 98: 744–757. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.04.037> PMID: 32446935
10. Lyons PA, McKinney EF, Rayner TF, Hatton A, Woffendin HB, Koukoulaki M, et al. Novel expression signatures identified by transcriptional analysis of separated leucocyte subsets in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 1208–1213. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.108043> PMID: 19815495
11. Akiyama M, Zeisbrich M, Ibrahim N, Ohtsuki S, Berry GJ, Hwang PH, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Tissue-Invasive Monocytes in Granulomatosis With Polyangiitis. *Front Immunol.* 2019; 10: 2617. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02617> PMID: 31798577
12. Pruchniak M, Ostafin M, Wachowska M, Jakubaszek M, Kwiatkowska B, Olesinska M, et al. Neutrophil extracellular traps generation and degradation in patients with granulomatosis with polyangiitis and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2019; 52: 126–135. <https://doi.org/10.1080/08916934.2019.1631812> PMID: 31257985
13. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2011; 187: 538–552. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100450> PMID: 21613614
14. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011; 3: 73ra20. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001201> PMID: 21389264
15. Söderberg D, Segelmark M. Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Front Immunol.* 2016; 7: 256. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00256> PMID: 27446086
16. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007; 176: 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027> PMID: 17210947
17. Urban CF, Ermer D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLOS Pathogens.* 2009; 5: e1000639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639> PMID: 19876394
18. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004; 303: 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385> PMID: 15001782
19. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007; 13: 463–469. <https://doi.org/10.1038/nm1565> PMID: 17384648
20. Granger V, Peyneau M, Chollet-Martin S, de Chaisemartin L. Neutrophil Extracellular Traps in Autoimmunity and Allergy: Immune Complexes at Work. *Front Immunol.* 2019; 10: 2824. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02824> PMID: 31849989
21. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemerck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine.* 2009; 15: 623–625. <https://doi.org/10.1038/nm.1959> PMID: 19448636
22. Sangalotti S, Tripodo C, Chiodoni C, Guarnotta C, Cappetti B, Casalini P, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood.* 2012; 120: 3007–3018. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-416156> PMID: 22932797
23. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLOS ONE.* 2012; 7: e32366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366> PMID: 22389696
24. Hakkim A, Fünrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 9813–9818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909927107> PMID: 20439745
25. Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, et al. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25: 990–997. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013060606> PMID: 24385592

26. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Front Immunol.* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00081> PMID: 28220120
27. Luqmani, R, Merkel, P. New Classification Criteria for ANCA-Associated Vasculitis: Implication for Clinical Practice. Lecture, ACR/ARHP Annual Meeting. 2016.
28. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2019; 71: 1400–1412. <https://doi.org/10.1002/art.40930> PMID: 31385462
29. Aga E, Katschinski DM, Zandbergen G van, Laufs H, Hansen B, Müller K, et al. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology.* 2002; 169: 898–905. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.898> PMID: 12097394
30. Brinkmann V, Goosmann C, Kühn LI, Zychlinsky A. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front Immunol.* 2013; 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00413> PMID: 23316198
31. Knackstedt SL, Georgiadou A, Apel F, Abu-Abed U, Moxon CA, Cunningham AJ, et al. Neutrophil extracellular traps drive inflammatory pathogenesis in malaria. *Sci Immunol.* 2019; 4. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw0336> PMID: 31628160
32. Deng Y, Ye J, Luo Q, Huang Z, Peng Y, Xiong G, et al. Low-Density Granulocytes Are Elevated in Mycobacterial Infection and Associated with the Severity of Tuberculosis. *PLoS One.* 2016; 11: e0153567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153567> PMID: 27073889
33. Ostendorf L, Mothes R, van Koppen S, Lindquist RL, Bellmann-Strobl J, Asseger S, et al. Low-Density Granulocytes Are a Novel Immunopathological Feature in Both Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Front Immunol.* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02725> PMID: 31849944
34. Schenz J, Obermaier M, Uhle S, Weigand MA, Uhle F. Low-Density Granulocyte Contamination From Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients With Sepsis and How to Remove It—A Technical Report. *Front Immunol.* 2021; 12: 684119. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.684119> PMID: 34484182
35. Söderberg D, Kurz T, Motamedi A, Hellmark T, Eriksson P, Segelmark M. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. *Rheumatology (Oxford).* 2015; 54: 2085–2094. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev217> PMID: 26170375
36. Wang H, Sha L-L, Ma T-T, Zhang L-X, Chen M, Zhao M-H. Circulating Level of Neutrophil Extracellular Traps Is Not a Useful Biomarker for Assessing Disease Activity in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *PLoS One.* 2016; 11: e0148197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148197> PMID: 26840412
37. Surmiak MP, Hubalewska-Mazgaj M, Wawrzyccka-Adamczyk K, Szczeklik W, Musiał J, Sanak M. Circulating mitochondrial DNA in serum of patients with granulomatosis with polyangiitis. *Clin Exp Immunol.* 2015; 181: 150–155. <https://doi.org/10.1111/cei.12628> PMID: 25783562
38. Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2018; 14: 467–475. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0039-z> PMID: 29930301
39. Endo A, Komagata Y, Yamagishi K, Kawashima S, Arimura Y, Kaname S. Two distinct subsets of LDGs (low density granulocytes) in ANCA-associated vasculitis. *Modern Rheumatology.* 2021; 0: 1–25. <https://doi.org/10.1080/14397595.2021.1918883> PMID: 33896353
40. Grayson PC, Carmona-Rivera C, Xu L, Lim N, Gao Z, Asare AL, et al. Neutrophil-Related Gene Expression and Low-Density Granulocytes Associated With Disease Activity and Response to Treatment in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67: 1922–1932. <https://doi.org/10.1002/art.39153> PMID: 25891759
41. Matthews NC, Burton CS, Alfred A. Low-density neutrophils in chronic graft versus host disease (cGVHD) are primarily immature CD10- and enhance T cell activation. *Clin Exp Immunol.* 2021. <https://doi.org/10.1111/cei.13612> PMID: 33932293
42. Cloke T, Munder M, Taylor G, Müller I, Kropf P. Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection. *PLoS One.* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048939> PMID: 23152825
43. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol.* 2010; 184: 3284–3297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902199> PMID: 20164424
44. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nature Reviews Immunology.* 2014; 14: 302–314. <https://doi.org/10.1038/nri3660> PMID: 24751955

45. Yoshida M, Sasaki M, Sugisaki K, Yamaguchi Y, Yamada M. Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis. *Clin Kidney J.* 2013; 6: 308–312. <https://doi.org/10.1093/ckj/sft048> PMID: 26064491
46. Surmiak M, Hubalewska-Mazgaj M, Wawrzycka-Adamczyk K, Szczeklik W, Musiał J, Brzozowski T, et al. Neutrophil-related and serum biomarkers in granulomatosis with polyangiitis support extracellular traps mechanism of the disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2016; 34: S98–104. PMID: 27192020
47. Pepper RJ, Hamour S, Chavele K-M, Todd SK, Rasmussen N, Flint S, et al. Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2013; 83: 1150–1158. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.2> PMID: 23423260
48. Bruchfeld A, Wendt M, Bratt J, Qureshi AR, Chavan S, Tracey KJ, et al. High-Mobility Group Box-1 Protein (HMGB1) Is Increased in Antineutrophilic Cytoplasmic Antibody (ANCA)-Associated Vasculitis with Renal Manifestations. *Mol Med.* 2011; 17: 29–35. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00132> PMID: 20844833
49. Ohlsson S, Wieslander J, Segelmark M. Increased circulating levels of proteinase 3 in patients with anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibodies-associated systemic vasculitis in remission. *Clin Exp Immunol.* 2003; 131: 528–535. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02083.x> PMID: 12605707
50. Wibisono D, Csernok E, Lamprecht P, Holle JU, Gross WL, Moosig F. Serum HMGB1 levels are increased in active Wegener's granulomatosis and differentiate between active forms of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 1888–1889. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.119172> PMID: 20542962
51. Haubitz M, Schulzeck P, Schellong S, Schulze M, Koch KM, Brunkhorst R. Complexed plasma elastase as an in vivo marker for leukocyte activation in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1680–1684. <https://doi.org/10.1002/art.1780400918> PMID: 9324023
52. Baslund B, Petersen J, Permin H, Wiik A, Wieslander J. Measurements of proteinase 3 and its complexes with alpha 1-proteinase inhibitor and anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) in plasma. *J Immunol Methods.* 1994; 175: 215–225. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90364-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90364-6) PMID: 7930650
53. Henshaw TJ, Malone CC, Gabay JE, Williams RC. Elevations of neutrophil proteinase 3 in serum of patients with Wegener's granulomatosis and polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 104–112. <https://doi.org/10.1002/art.1780370116> PMID: 7907475
54. Wang C, Gou S-J, Chang D-Y, Yu F, Zhao M-H, Chen M. Association of circulating level of high mobility group box 1 with disease activity in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013; 65: 1828–1834. <https://doi.org/10.1002/acr.22187> PMID: 24591411
55. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010; 191: 677–691. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052> PMID: 20974816
56. Eberhard OK, Haubitz M, Brunkhorst FM, Klem V, Koch KM, Brunkhorst R. Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease (systemic lupus erythematosus/ systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis) and invasive bacterial infection. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1250–1256. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199707\)40:7<1250::AID-ART9>3.0.CO;2-A:7<1250::AID-ART9>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199707)40:7<1250::AID-ART9>3.0.CO;2-A:7<1250::AID-ART9>3.0.CO;2-A) PMID: 9214425
57. Lazzaretto B, Fadeel B. Intra- and Extracellular Degradation of Neutrophil Extracellular Traps by Macrophages and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2019 [cited 12 Jun 2021]. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800159> PMID: 31519860
58. Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BGJ, Thanabalasuriar A, Lee W-Y, Sanz M-J, et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun.* 2015; 6: 6673. <https://doi.org/10.1038/ncomms7673> PMID: 25809117
59. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2001; 28: 313–314. <https://doi.org/10.1038/91070> PMID: 11479590
60. Bodaño A, González A, Ferreiros-Vidal I, Balada E, Ordi J, Carreira P, et al. Association of a non-synonymous single-nucleotide polymorphism of DNASE1 with SLE susceptibility. *Rheumatology.* 2006; 45: 819–823. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel019> PMID: 16449364
61. O'Sullivan KM, Lo CY, Summers SA, Elgass KD, McMillan PJ, Longano A, et al. Renal participation of myeloperoxidase in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis. *Kidney International.* 2015; 88: 1030–1046. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.202> PMID: 26176828
62. Davis JC, Manzi S, Yarboro C, Rairie J, McInnes I, Averthelyi D, et al. Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus.* 1999; 8: 68–76. <https://doi.org/10.1191/096120399678847380> PMID: 10025601

63. O'Sullivan KM, Holdsworth SR. Neutrophil Extracellular Traps: A Potential Therapeutic Target in MPO-ANCA Associated Vasculitis? *Front Immunol.* 2021; 12: 635188. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635188> PMID: 33790907
64. Gupta S, Nakabo S, Blanco LP, O'Neil LJ, Wigerblad G, Goel RR, et al. Sex differences in neutrophil biology modulate response to type I interferons and immunometabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117: 16481–16491. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003603117> PMID: 32601182

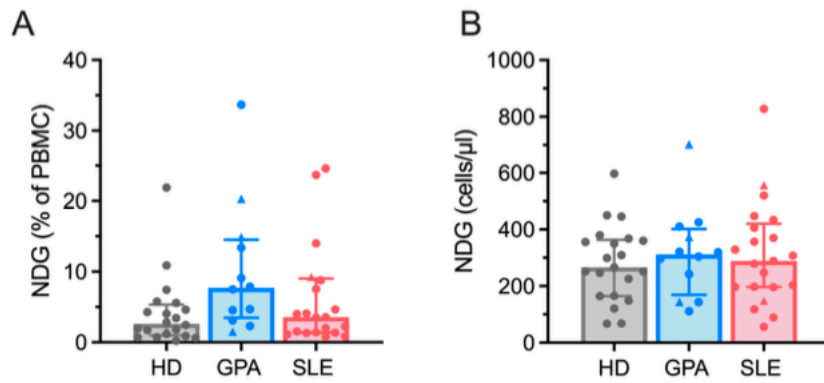


Figure S1A: Quantification of NDGs: (A) Frequencies of NDGs among PBMCs and (B) absolute numbers of NDGs were determined by flow cytometry (HD, n=21; GPA, n=12; SLE: n=21) using the Truecount method. NDGs were identified as CD16⁺SSC⁺ cells in whole blood. Each dot represents one measured patient sample. Patients receiving prednisolone dosages of ≥ 20 mg daily (3 patients with GPA and one patient with SLE) are indicated by triangles. Median values \pm IQR are presented. Data were analysed by Kruskal-Wallis-test, no significant differences were determined.

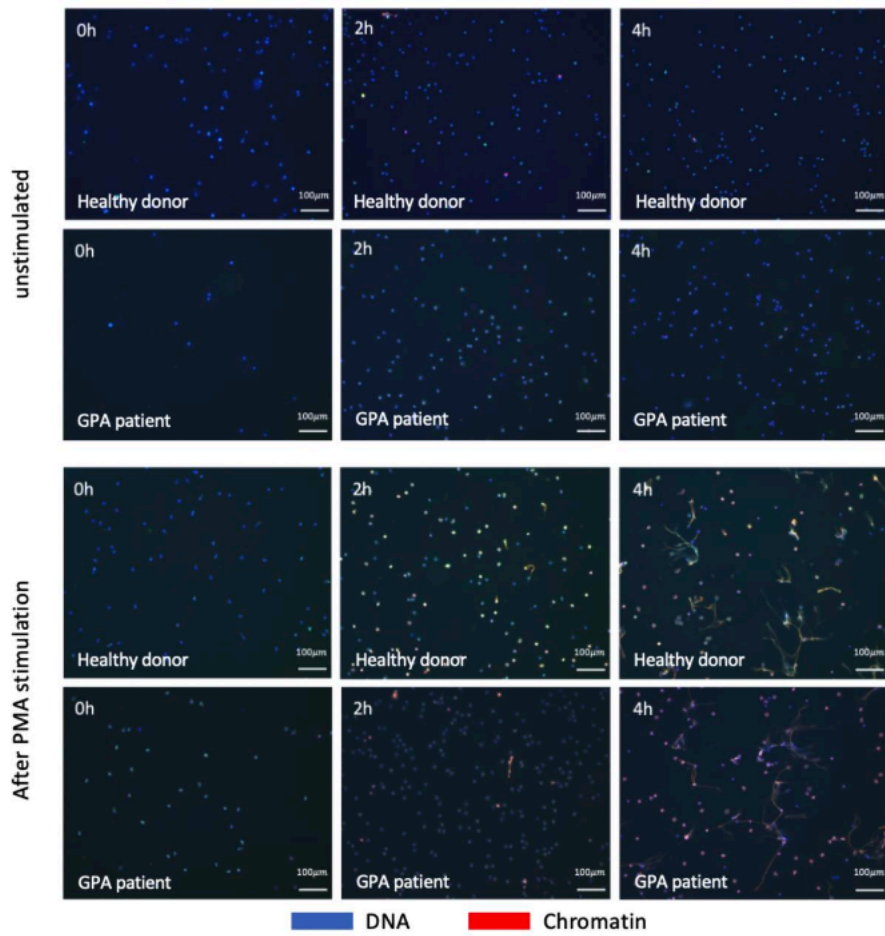


Figure S1B: Microscopy images of netting neutrophils. Representative immunofluorescence images to identify NETs formed by normal-density granulocytes (NDG) from one healthy donor and one patient with GPA without stimulation (upper row) or after certain time-points after PMA stimulation.

Table S2: Patient characteristics in which NETs have been investigated.

	Healthy donors	GPA	SLE	P Value
Number	9	10	14	
Age (median, IQR)	26 (22-29)	66 (57-70)	36 (30-46)	HD vs. GPA <i>P</i> <0.001 HD vs. SLE <i>P</i> =0.002
Female (n, %):	8 (88.89)	4 (40.0)	13 (92.86)	HD vs. GPA <i>P</i> <0.057 HD vs. SLE <i>P</i> =1.00
Clinical manifestations (n, %)				
Renal involvement	0	8 (66.7)	3 (21.4)	
Head/Neck	0	7 (58.3)	0 (0)	
Pulmonary	0	8 (66.7)	0 (0)	
ANCA status				
c-ANCA positivity (n, %)	-	9 (90.0)	0	
p-ANCA positivity (n, %)	-	0 (0)	0	
BVAS (median score, range)	-	6.5 (0-18)	-	
SLEDAI-2K (median score, range)	-	-	4 (2-24)	
Immunosuppressive and biologic medications (n, %)	0	GC: 10 (100) AZA: 2 (20) MTX: 5 (50) RTX: 3 (30)	GC: 12 (85.7) HCQ: 9 (64.3) AZA: 5 (35.7) MMF: 2 (14.3) MTX: 2 (14.3) CsA: 0 (0.0) BEL: 0 (0.0)	
Daily prednisolone dosage (mg) (median, range)	0	4.5 (2-50)	8 (0-20)	

Demographic and serological data of GPA and SLE patients, in which NETs have been investigated. Abbreviations: AZA, Azathioprine; BEL, Belimumab; BVAS, Birmingham Vasculitis Activity Score; CsA, Ciclosporin A; GC, Glucocorticoids; HCQ, Hydroxychloroquine; MMF, Mycophenolate Mofetil; MTX, Methotrexate; RTX, Rituximab; SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000. Statistical analysis comparing differences in age was performed using the Mann-Whitney test, sex differences with the chi-square test.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Spyridon Lipka, Lennard Ostendorf, Udo Schneider, Falk Hiepe, Falko Apel, Tobias Alexander: Increased levels of immature and activated low density granulocytes and altered degradation of neutrophil extracellular traps in granulomatosis with polyangiitis, PLoS ONE 18(3): e0282919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282919>

Danksagung

Das vorliegende Werk zu verfassen war ein langer und steiniger Weg, voller Herausforderungen und Unwägbarkeiten. Es war ein unbekannter Pfad, den es aus eigener Kraft zu bezwingen galt, ohne aufzugeben. Glücklicherweise erfuhr ich die Unterstützung einiger wunderbarer Menschen, denen ich nun die nachfolgenden Worte widmen möchte. Zunächst möchte ich meinen Betreuern Tobias Alexander und Prof. Falk Hiepe für diese einzigartige Gelegenheit danken, die sie mir gegeben haben. Ihrem tatkräftigen Einsatz, ihrer engen Betreuung und ihrem unermüdlichen Engagement habe ich viel zu verdanken.

Ich möchte auch Arturo Zychlinsky vom MPI für Infektionsbiologie meinen Dank aussprechen. Durch die einmalige Möglichkeit, in seinem Exzellenzlabor Forschung für meine Promotion durchzuführen, konnte ich wertvolle Erfahrungen sammeln. Ich danke auch dem gesamten Forschungsteam Zychlinsky für ihre freundliche Aufnahme und ihre zahlreichen Tipps während meines Forschungsaufenthalts.

Ein besonderer Dank gilt Falko Apel. Seine handfeste, entschlossene, unermüdliche und äußerst engagierte Unterstützung hat mir in schwierigen Zeiten den Rücken gestärkt. Ohne ihn wäre diese Reise um einiges schwieriger gewesen.

Ich möchte mich auch bei meinen Freund:innen Daniel, Sabina, Sophia und Chae bedanken, die mich durch diese schwierige Zeit begleitet und immer wieder aufgemuntert haben, wenn ich nicht mehr weiterwusste.

Rico, diese Zeilen sind dir gewidmet. Als mein Mitbewohner hast du vieles ertragen müssen. Als Freund hast du mich immer wieder aufgebaut. Deine Unterstützung über die Jahre hat für mich einen unschätzbaren Wert. Danke, dass du immer für mich da bist.

Ich danke meiner Familie, meinen Eltern und meinen Geschwistern Elena, Michael, Ruth, Johannes und Alexander. Ihr bringt mir unendliche Freude und Glück.

Abschließend möchte ich meinem Schatz, Felix, danken. Danke, dass du immer an meiner Seite bist. Deine unermüdliche Unterstützung, Geduld und Ausdauer bedeuten mir unendlich viel. Du und unsere drei Schätze Sim, Kit und Timmy machen mich unglaublich glücklich. Und der vierte, Vin, winkt von oben herab.