



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Identification of therapeutic targets and antisense oligonucleotide mediated exon skipping based therapies in arthritis**

Elis, A.S.

### **Citation**

Elis, A. S. (2016, June 29). *Identification of therapeutic targets and antisense oligonucleotide mediated exon skipping based therapies in arthritis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/40898>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/40898>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/40898> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Elis, A.S.

**Title:** Identification of therapeutic targets and antisense oligonucleotide mediated exon skipping based therapies in arthritis

**Issue Date:** 2016-06-29

# Samenvatting



## *Samenvatting*

Rheumatoïde artritis (RA) is een chronische ontsteking van de gewrichten die leidt tot afbraak van kraakbeen en bot. Deze gewrichtsontsteking wordt voornamelijk veroorzaakt door de overproductie van ontstekings-signalstoffen (cytokinen) door verschillende typen immuuncellen.

Artritis is een autoïmuun ziekte die o.a. wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van auto-antilichamen. Deze auto-antilichamen vormen immuun complexen (IC) die ook een belangrijke rol spelen in gewrichtsontsteking omdat zij verschillende immuuncellen kunnen activeren door te binden aan Fc receptoren (FcR) die aanwezig zijn op het oppervlak van deze immuuncellen. Binding aan FcRs activeert een cascade van intracellulaire signalering die aanzet tot de afgifte van een aantal ontstekingsmediatoren. In dit proefschrift worden een aantal verschillende aspecten van artritis onderzocht beschreven dat is uitgevoerd om een beter inzicht te verkrijgen in de onderliggende moleculaire en cellulaire ziekte mechanismen en om nieuwe therapeutische strategieën te ontwikkelen.

Interleukin 1 (IL-1) is een van de belangrijkste pro-inflammatoire cytokinen. Verhoogde IL-1 productie speelt een belangrijke rol in de pathogenese van artritis. Het verminderen van IL-1 activiteit zou daarom een goede therapeutische strategie kunnen zijn. Voor dat doel onderzochten we een methode die antisense oligonucleotide (AON) gemedieerde 'exon skipping' wordt genoemd (Chapter 3). Deze methode maakt het mogelijk om een exon over te slaan ('skipping') gedurende het proces van pre-mRNA 'splicing'. De AONs binden aan het doel gebied in het gewenste exon en voorkomen daarmee dat het herkend wordt door de 'splicing' machinerie met als resultaat dat het exon wordt verwijderd uit het boodschapper RNA (mRNA) tesamen met de flankerende intronen. We hebben deze techniek toegepast om het exon dat codeert voor het transmembraan deel van 'IL-1 receptor accessory protein' (IL-1RAcP) te verwijderen. Dit resulteert in de vorming van een nieuwe oplosbare vorm van dat eiwit. IL-1RAcP is een onvervangbare sub-eenheid van de functionele IL-1 receptor (IL-1R). Het nieuw gevormde oplosbare IL-1RAcP eiwit zal functioneren als een remmende IL-1 'scavenger'. We hebben aangetoond dat dit skipping concept *in vitro* en *in vivo* werkt, terwijl we daarnaast hebben laten zien dat het nieuw gevormde eiwit functioneel is. We hebben in hepatocyten in de lever van de

muis IL-1RAcP specifieke AONs ingebracht om de productie van oplosbaar IL-1RAcP eiwit *in vivo* te verhogen. Om het transport naar en de opname door hepathocyten te bevorderen werden de AONs gekoppeld aan 'lipid nanoparticles'. Het succes van op AONs gebaseerde mRNA modulatie therapieën in de kliniek wordt in sterke mate bepaald door de effectiviteit van het transport in het lichaam naar het juiste celtype en/of weefsel van de oligonucleotiden. De in dit proefschrift beschreven experimenten tonen aan dat AON gemedieerde exon-skipping kan worden gebruikt om efficiënt de 'splicing' van IL-1RAcP pre-mRNA te moduleren waardoor een nieuwe oplosbare vorm van IL-1RAcP wordt gemaakt die een teveel aan IL-1 kan binden. Hiermee kunnen *in vivo* de niveau's van dit cytokine worden beheerst als een vorm van therapie in ontstekingsziekten zoals reumatoïde artritis.

Fc $\gamma$  receptoren zijn receptoren op het oppervlak van de cel die binden aan het constante deel (Fc deel) van antistoffen (Ig) van de IgG klasse. De remmende receptor, Fc $\gamma$ RIIb, komt voor op bijna alle immuuncellen zoals macrofagen, neutrofielen, en B cellen en speelt op verschillende niveaus een rol in de regulatie van de afweer. Fc $\gamma$ RIIb op myeloïde cellen, moduleert de activatie van deze cellen door immuun complexen. Op B cellen is Fc $\gamma$ RIIb betrokken bij een negatief 'feedback' mechanisme dat de activatie, proliferatie en antistof productie van B cellen regelt. Daarom resulteert inactivatie van Fc $\gamma$ RIIb in ontregelde antistof productie en verhoogde activatie van myeloïde cellen. Dit resulteert in muizen in verhoogde gevoeligheid voor artritis. Het is echter niet duidelijk welke Fc $\gamma$ RIIb geassocieerde reactieketen een overheersende rol speelt. Om de celtype specifieke bijdrage van de remmende Fc $\gamma$ RIIb in de ontwikkeling van artritis te bepalen zijn uitgebreide analyses uitgevoerd, gebruikmakend van verschillende knock-out muizen waarin Fc $\gamma$ RIIb ontbreekt ofwel op alle cellen of uitsluitend op B cellen (CD19Cre), op dendritische cellen (CD11cCre) of op alle myeloïde cellen (c/EBP $\alpha$ Cre) zoals beschreven in hoofdstuk 4. Alleen muizen waarin Fc $\gamma$ RIIb op alle cellen ontbrak vertoonden een significante toename in incidentie en ernst van de ziekte in vergelijking met wildtype controle muizen. De muizen waarin Fc $\gamma$ RIIb uitsluitend ontbrak op alle myeloïde cellen lieten een toename in incidentie van de ziekte zien. Maar in de muizen waarin Fc $\gamma$ RIIb ontbrak exclusief op de B-cellen nam geen enkele ziekteparameter toe. Dit geeft aan dat Fc $\gamma$ RIIb op myeloïde cellen een dominante rol vervult in de gevoeligheid voor artritis in vergelijking met Fc $\gamma$ RIIb op B cells. Hoewel artritis

wordt gekenmerkt door de aanmaak van auto-antistoffen ontwikkelden in onze experimenten niet alle muizen met hoge auto-antistof titers artritis. Aanwezigheid van auto-antistoffen is een absolute voorwaarde, maar is niet voldoende voor de (volledige) ontwikkeling van de ziekte. Er zijn extra veranderingen in de afweer noodzakelijk zoals toename van signaalstoffen zoals cytokinen en chemokinen, en activatie van complement, die het gevolg kunnen zijn van infecties of andere invloeden van omgevingsfactoren.

De afwezigheid van Fc $\gamma$ RIIb verlaagt de drempelwaarde voor de activatie van myeloïde effector cellen zoals macrofagen en neutrofielen door de binding van immuuncomplexen aan de activerende Fc $\gamma$ R op hun celoppervlak. Er zijn daarom in Fc $\gamma$ RIIb KO muizen veel minder auto-antistoffen nodig voor het op gang brengen van een chronische ontstekingsreactie in artritis. Dat verklaart de toegenomen gevoeligheid voor artritis van de pan-myeloïde Fc $\gamma$ RIIb deficiënte muizen.

Activatie van complement draagt ook bij aan de pathologie van reumatoïde artritis. Het is door anderen aangetoond dat muizen, waarin complement factoren en complement receptoren zijn geïnactiveerd, resistent zijn voor artritis. CD55 is een remmer van complement activiteit maar tegelijkertijd een ligand voor de CD97 receptor. De rol van de interactie tussen CD55 en CD97 in de ontwikkeling van artritis werd onderzocht in hoofdstuk 5. Hoewel CD55 een remmer is van complement activiteit vertoonden muizen waarin CD55 ontbrak een verlaagde gevoeligheid voor collageen geïnduceerde artritis (CIA). Het blokkeren van de CD97–CD55 interactie door gebruik van een CD97 specifieke antistof vermindert eveneens de ernst van CIA. Bovendien vertonen muizen zonder functioneel CD97 een lagere incidentie en ernst van artritis. Tegenwoordig ondersteunen deze waarnemingen de hypothese dat interferentie met de binding van CD55 aan CD97 de ontwikkeling van artritis remt. Het is daarom belangrijk dat we alle details kennen van de rol van CD55 en CD97 en hun interactie in RA, omdat dit mogelijk een nieuw aangrijpingspunt zou kunnen zijn voor therapeutische interventie.

