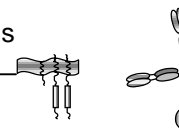




## ***General discussion and conclusions***

- I. INTRODUCTION**
- II. A MODEL FOR IGA-CD89 BINDING**
- III. IGA AND REGULATION OF CD89 EXPRESSION**
- IV. MECHANISMS INVOLVED IN SCD89 RELEASE**
- V. A POSSIBLE ROLE FOR CD89 AND OTHER FC-ALPHA-RECEPTORS IN IGAN**
- VI. CONCLUDING REMARKS**
- VII. REFERENCES**



## I. INTRODUCTION

Unraveling the mechanisms of interaction between receptors and their ligands provides a powerful tool in understanding the immune system. Fc receptors represent a link between humoral and cellular immune responses (1). Immune complexes, when bound to FcR-positive leukocytes, trigger cellular functions to clear potentially dangerous antigens from our body (2). However, relatively little is known about the specific interactions between IgA and CD89, the only well characterized Fc $\alpha$ R. The present thesis is focused upon the interactions between this prototypic IgA receptor and different molecular forms of IgA, as well as on the functional consequences of these interactions (chapter 2, 3 and 4). Furthermore, a possible role for CD89 in the IgA-associated disease IgA nephropathy (IgAN) was investigated (chapter 5 and 6).

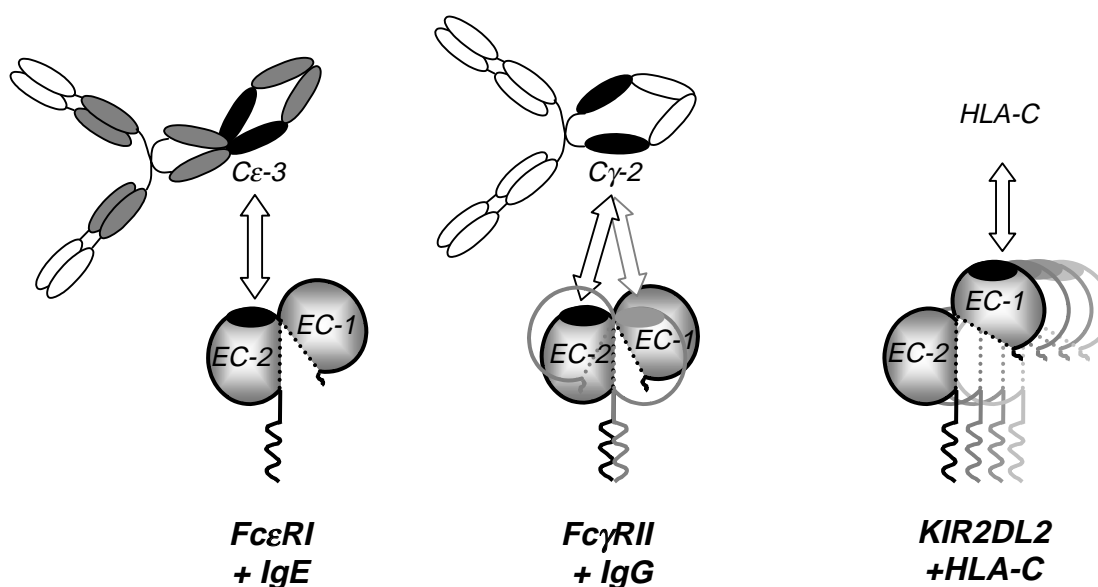
Based on the localization of the immunoglobulin-binding region of CD89 in the membrane-distal EC1 domain (chapter 2), a model for the CD89 protein and its binding to IgA is proposed (part II). Demonstration of an IgA-induced increase of CD89 expression and subsequent release of sCD89 (chapter 3) raises the question of how IgA affects CD89 surface expression. Properties of circulating IgA and structural organization of cell membrane-bound CD89 molecules are discussed (part III). Furthermore, we evaluate additional mechanisms involved in sCD89 release and demonstrate the presence of sCD89 in circulation (part IV).

Monomeric IgA, isolated from patients with IgAN shows a reduced binding to CD89 (chapter 5). The role of CD89 in the clearance of IgA and newly developed methods to study the role of pIgA and IgA-IC in IgAN will be discussed. Finally, binding of IgA to mesangial cells, which is independent of CD89 (chapter 6), has been attributed to a newly defined molecule (part V).

## II. A MODEL FOR IGA-CD89 BINDING

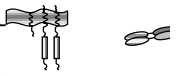
The domains of the IgA Fc-tail that are involved in binding to CD89 have been mapped in detail to the Leu<sup>257</sup>-Gly<sup>259</sup> region in C $\alpha$ 2 and the Pro<sup>440</sup>-Phe<sup>443</sup> region in C $\alpha$ 3 (3). The regions on CD89 that interact with the C $\alpha$ 2 and C $\alpha$ 3 area are less well characterized. Chimeric receptors have been constructed, by exchanging complete domains between CD89 and its bovine homologue, bFc $\gamma$ 2R (4), and expressed on COS-1 cells (5). Binding of IgA to these chimeric receptors was only detected when the EC1 domain of CD89 was present (5). The observation that mAb's which were able to inhibit IgA binding to CD89, only recognized chimeric receptors containing the EC1 domain, confirmed these findings. (5).

Based on data from the crystal structure of KIR2DL2 (6), a receptor with approximately 35 % amino acid homology to CD89, we have generated a three-dimensional CD89 model (Figure 4 of the introduction). Using this model for CD89, new point mutations were made in the IgA binding domain to identify the amino acid residues directly responsible for IgA binding. Preliminary results mapped the IgA binding site within CD89, to the tip of EC1 (7). Binding in the EC1 region is different from other Fc receptors (Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, and Fc $\epsilon$ RI), in which the ligand binding site is in domain 2, rather than domain 1 (8). This change may reflect the proposed divergent evolutionary pathway of Fc $\alpha$ RI from a distinct common genetic precursor (4,9). Recently, the crystal structures of Fc $\epsilon$ RI, Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIb, (summarized in Figure 1) were solved (10-12).



**Figure 1.** Schematic diagram of the ectodomains of the  $\alpha$ -chains of Fc $\epsilon$ RI, Fc $\gamma$ RII and KIR2DL2 and their presumed interaction with the Fc regions of IgE and IgG, and the HLA molecule. Fc $\epsilon$ RI is shown as a monomer, Fc $\gamma$ RIIa as a dimer and KIR2DL2 as a multimer. The arrows indicate their putative binding sites.

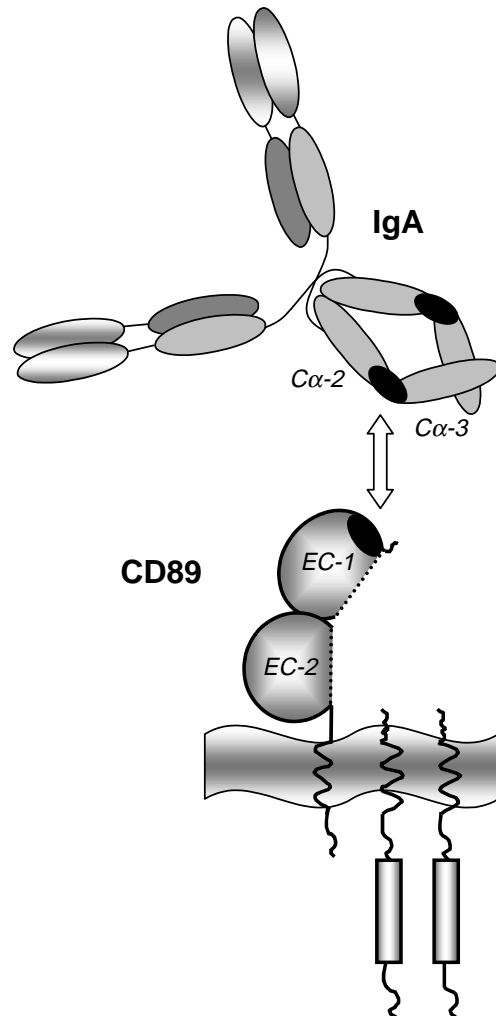
The Fc $\epsilon$ RI structure shows that the EC1 and EC2 domains have a highly bent formation and interact over a broad interface with each other (10). Homologous configured structures were found for Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIb, in which a tight network of hydrogen bonds was noted between the EC1 and EC2 domains, that resulting in a rigid structure (11,12). For Fc $\gamma$ RIIa, it was demonstrated that dimers are formed, most likely increasing the affinity for IgG. Since Fc $\gamma$ RIIa lacks a  $\gamma$ -chain dimer signaling subunit, it is speculated that the receptor needs dimerization for proper functioning (11). Similar to Fc $\epsilon$ RI, the EC1 and EC2 domains of both Fc $\gamma$ RIIa and



Fc $\gamma$ RIIb are folded in such a way that the EC2 domain seems accessible for IgG binding (13).

The observation that IgA binds to the tip of EC1 makes it unlikely that CD89 shows a similar structural bending. If this latter case occurred, the IgA binding site would lie very close to the plasma membrane, which would leave little room for large IgA polymers to bind. Therefore, it is proposed that the EC1 domain points away from the membrane (Figure 2). Solving the crystal structure of CD89 should prove that the Fc $\alpha$ RI structure is organized differently from other Fc receptors.

Using the recombinant soluble CD89 molecule, attempts were made to crystallize the protein (van den Elsen, J., Gros, P., 1997 unpublished data). The high degree of glycosylation on CD89, a process that results in multiple isoforms, has hampered the formation of CD89 crystals. Using a recombinant CD89 molecule lacking these potential glycosylation sites, or *E.coli* expression systems, hopefully will circumvent the restrictions to the crystallization of CD89.



**Figure 2. Schematic diagram of the ectodomains of the  $\alpha$ -chain of Fc $\alpha$ RI, CD89 and its presumed interaction with the Fc region of IgA. The arrows indicate their putative binding site.**

### III. IGA AND REGULATION OF CD89 EXPRESSION

We have demonstrated that IgA can increase the surface expression of CD89 *in vitro* (14). In addition, prolonged exposure of CD89 expressing monocytic cells to isolated IgA, induced the release of a soluble form of CD89, sCD89. Both findings clearly demonstrate that IgA can regulate the turnover of CD89, but it is most likely that different mechanisms are involved with each regulatory step.

Understanding the organization of CD89 expression on the cell surface will help to explain its functional properties. It has been demonstrated that CD89 associates with FcR  $\gamma$ -chain through a charge based mechanism, thus connecting the receptor to intracellular signaling pathways (15,16). *In vitro* experiments showed

that the association of CD89 with the  $\gamma$ -chain dimer was essential for receptor function. However CD89 surface expression could be established in the absence of the  $\gamma$ -chain. In contrast, experiments using CD89 transgenic mice crossed with  $\gamma$ -chain knock out mice, showed a complete lack of CD89 surface expression on leukocytes (17). At present it is not clear how this presumed discrepancy can be explained, but both situations represent artificial and non-physiologic conditions (transfectants and transgenes, respectively). It has not been excluded that CD89 might associate with other proteins, in a manner, which shields the positive charge similar to that described for DAP-12 protein (18). Interestingly, recent data indicate that on monocytes and neutrophils, CD89 is present in a form with or without the  $\gamma$ -chain (19). Both forms might have different functions, such as degrading IgA antibody complexes (with  $\gamma$ -chain), or recycling serum IgA (without  $\gamma$ -chain).

It is tempting to hypothesize that the  $\gamma$ -chain dimer, with two negative charges, associates with two Fc $\alpha$ RI  $\alpha$ -chains. However, IgA binding studies performed with CD89 and CD89/ $\gamma$ -chain transfectants demonstrated that IgA binding shows a similar affinity (20). This IgA binding makes it unlikely that the  $\gamma$ -chain is responsible for Fc $\alpha$ R dimers, since this structural dimerization would probably increase the binding affinity. However, other associations or interactions might result in complexes of CD89 molecules. Experiments using CD89 transgenic mice, crossed with CR3 knock outs, showed that CD89 mediated ADCC was ablated when CR3 was not present (17). This result is similar to the finding that CR3 is involved in Fc $\gamma$ R function (21,22).

Next to receptor aggregation through association with other proteins, ligand-induced receptor aggregation is a critical step in receptor-mediated signaling (23,24). We and others have observed that pIgA is more efficient in triggering CD89 function (20) and has a higher affinity for CD89 binding as compared to mIgA (25). In circulation, high levels of IgA molecules (approximately 2 mg/ml) constantly surround CD89 expressing cells. This IgA concentration raises the question of whether or not circulating leukocytes expressing CD89 are constantly activated. Under normal physiologic circumstances, the majority of IgA (> 85 %) is in a monomeric form. Therefore, both forms of IgA might compete for the available IgA binding sites and thereby balance receptor activation. The recognition of a potential antigen, followed by the increase of circulating IgA-IC's, could shift the balance in a cell from a resting state to one of CD89 activation. We propose that the increased level of IgA-IC's increases CD89 surface expression, co-incident with an increased effector function. The release of sCD89, as observed in this



thesis might contribute to the down modulation of this response and to the re-establishment of a resting state in the leukocytes.

#### **IV. MECHANISMS INVOLVED IN SCD89 RELEASE**

Release of soluble receptors has been suggested to represent a universal mechanism of receptor regulation (26). A 30 kD soluble CD89 molecule, released in a FcR  $\gamma$ -chain dependent manner from monocytic cells, was observed after CD89 crosslinking with its ligand, IgA. Evidence for presence of sCD89 in circulation, would strengthen our hypothesis that release of a soluble form of CD89 is an actual mechanism for downregulating CD89 function *in vivo*. The detection of sCD89 in circulation with an ELISA system has proved difficult. Only 5% of sera tested showed low levels of sCD89 in ELISA. However, when we used Western blotting, all sera tested contained a 30 kD sCD89. The observation that sCD89 isolated from U937 cells binds to IgA (14), suggests that in circulation sCD89 might be bound to IgA. Alternatively, we can not exclude that it also binds to other serum proteins, a feature, which prevents detection in ELISA. The detection of sCD89 in plasma indicates that shedding occurs *in vivo*, presumably through prolonged activation of CD89 expressing cells to IgA.

The studies presented in this thesis showed the cellular release of sCD89 after CD89 crosslinking by antibodies or IgA, or after pharmacologic activation of the cells. We found that also the inflammatory cytokine TNF $\alpha$  could induce the release of sCD89 as well.

Previous studies have shown that the compound suramin, can downregulate CD89 surface expression (27). We have shown that this agent induces the release of a 30 kD soluble CD89 molecule. Suramin has been shown to inactivate PKC (28,29) and induced the release of a soluble hepatocyte growth factor receptor, in addition, suramin can oligomerize proteins, such as complement components C8 and C9 (30,31). Presumably, suramin induced aggregation of CD89 receptors could be involved in the observed shedding of CD89. Suramin has been used as an anti-cancer and anti-parasitic drug. It will be interesting to investigate whether treatment of patients with suramin results in increased sCD89 serum levels.

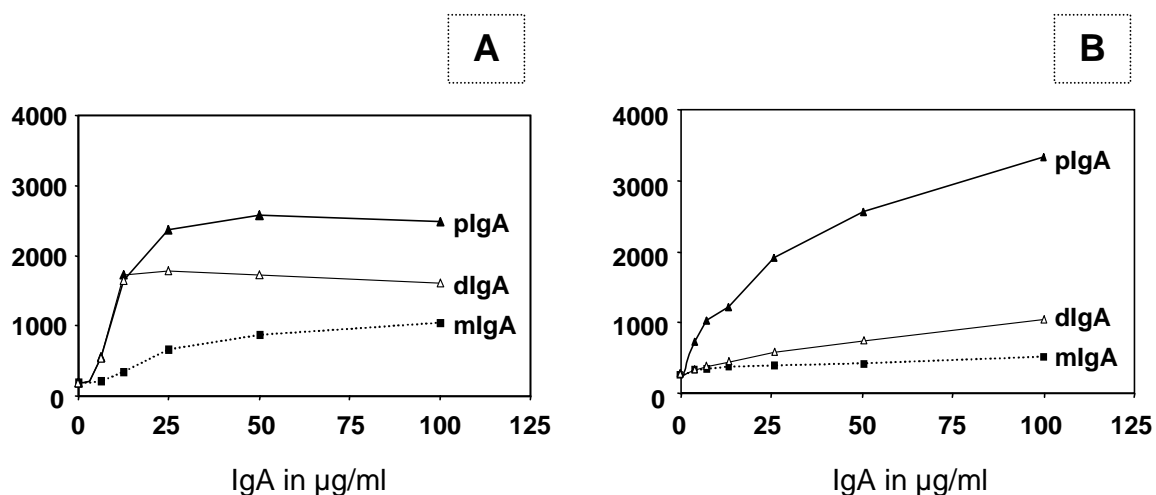
#### **V. A POSSIBLE ROLE FOR CD89 AND OTHER FC-ALPHA-RECEPTORS IN IGAN**

IgA nephropathy is the most common form of primary glomerulonephritis (32). More than thirty years after its initial characterization (33), it is still unclear how IgA1 deposition in the mesangial area is mediated.

One factor might be the increased levels of circulating IgA, observed in patients, which have been explained by both a high production rate in the bone marrow (34,35) and by a low elimination rate in the liver (36,37). We showed a reduced binding of IgA from patients with IgAN to CD89 (38). This finding might result in defective clearance, thus contributing to the higher IgA levels in patients with IgAN. Interestingly, especially the circulating mIgA seems to account for the decreased IgA binding to CD89 observed in serum of IgAN patients. It is most likely that structural abnormalities in the IgA molecule are responsible for this effect. Human IgA1 has an O-glycosylated hinge region, being a rare feature for circulating proteins. A reduction of galactosyl residues in the hinge region of serum IgA obtained from patients with IgAN has been described (39-41). It has been suggested that this aberrant galactosylation is caused by a functional defect in  $\beta$ -1,3-galactosyltransferase activity in B-lymphocytes (42). Structural changes caused by altered glycosylation of the hinge region of IgA1, could influence mIgA binding to the Fc $\alpha$ R. It could be anticipated that such changes would have a higher impact on the binding of monomeric than of polymeric IgA, explaining our observations with patient serum.

Nevertheless, predominantly pIgA1 and IgA-IC's are thought to be of pathogenic importance in IgAN (36,43). Eventhough much work has been performed in order to identify these IgA-IC's, the difficulty to isolate and characterize these complexes requires attention. We developed a system to specifically isolate these circulating IgA complexes and study their properties. In an ELISA system using recombinant sCD89, we showed that this protein binds the different forms of IgA, a finding similar to the CD89 transfected cell model (20,38). We then produced of a chimeric protein containing the human IgG1 Fc-tail, fused with the extracellular part of CD89 (Fc(CD89)<sub>2</sub>). In an ELISA system, we found that the "dimeric" Fc(CD89)<sub>2</sub> molecule binds predominantly to polymeric IgA and larger aggregates and to a lower extent to dimeric and monomeric IgA (Figure 3). Preliminary data using radio-labeled Fc(CD89)<sub>2</sub> shows that specific precipitation of polymeric IgA and IgA containing-immune complexes can be obtained. This finding suggests that Fc(CD89)<sub>2</sub> might be a powerful new tool to isolate and study circulating IgA-immune complexes in IgA associated diseases. Although the mechanisms by which pIgA and IgA-IC are deposited in the renal mesangium remain controversial, CD89 or other Fc $\alpha$ R's could be involved. In contrast to earlier suggestions of others, detailed analysis using our new CD89 reagents revealed a lack of CD89 expression on cultured human mesangial cells (44).





**Figure 3.** Dose and size dependent binding of mlgA, dlga and plga preparations to the recombinant soluble CD89 protein (A) and the chimeric Fc(CD89)<sub>2</sub> protein (B).

In addition kidney sections were also negative for mesangial CD89 expression. In our laboratory we developed a new mAb, 72G12, which was raised against IgA binding proteins isolated from neutrophil membranes. This mAb, when tested on mesangial cells stained positive and was able to inhibit IgA binding to them. Preliminary results showed that both IgA and 72G12 precipitate an 83 kD protein from mesangial cell membranes (45), thus suggesting the presence of a new and yet to be characterized Fc $\alpha$ -Receptor.

## VI. CONCLUDING REMARKS

The work described in this thesis has contributed to a better understanding of the interactions between IgA and the prototypic Fc $\alpha$ RI, CD89. We have generated a detailed model of the interaction between the different forms of IgA and the EC1 domain of CD89. IgA tightly regulates CD89 surface expression on monocytic cells, and is able to induce the release of a soluble form of CD89. Levels of sCD89 in circulation could be a measure for IgA-mediated monocyte/macrophage activation. It will be a major challenge to establish the exact molecular structure of CD89 and to unravel the mechanisms involved in the regulation of CD89 receptor shedding. Our studies provide new possibilities for the investigation of IgA deposition in the renal mesangium in patients with IgAN, which might give new insights into renal handling of IgA and IgA-IC in relation to disease.

## VII. REFERENCES

1. van de Winkel J.G.J. and P.J. Capel. 1996. *Human IgG Fc Receptors*. R.G. Landes Company, Austin, TX,
2. Hulett, M. D. and P. M. Hogarth. 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* 57:1.
3. Pleass, R. J., J. I. Dunlop, C. M. Anderson, and J. M. Woof. 1999. Identification of residues in the CH2/CH3 domain interface of IgA essential for interaction with the human fcalpha receptor (FcalphaR) CD89. *J Biol Chem* 274:23508.
4. Zhang, G., J. R. Young, C. A. Tregaskes, P. Sopp, and C. J. Howard. 1995. Identification of a novel class of mammalian Fc gamma receptor. *J Immunol* 155:1534.
5. Morton, H. C., G. van Zandbergen, C. van Kooten, C. J. Howard, J. G. J. van de Winkel, and P. Brandtzaeg. 99 A.D. Localization of the immunoglobulin binding regions of the myeloid IgA Fc receptor (Fc alpha R, CD89) and bovine Fc gamma 2R to their membrane-distal EC1 domains. *J Exp Med* 189:1715.
6. Maenaka, K., T. Juji, D. I. Stuart, and E. Y. Jones. 1999. Crystal structure of the human p58 killer cell inhibitory receptor (KIR2DL3) specific for HLA-Cw3-related MHC class I. *Structure* 7:391.
7. Morton H.C. and P. Brandtzaeg. 1999. (UnPub)
8. Rigby, L., M.D. Hulett, R.I. Brinkworth, and P.M. Hogarth. 1997. IgE receptor (FcepsilonRI) function in mast cells and basophils. In M.M. Hamaway, ed. R.G.Landes Co., Austin, TX, p. 7.
9. Morton, H. C., M. van Egmond, and J. G. J. van de Winkel. 1996. Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Crit Rev Immunol* 16:423.
10. Garman, S. C., J. P. Kinet, and T. S. Jardetzky. 1999. The crystal structure of the human high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI alpha) *Annu Rev Immunol* 17:973-6:973.
11. Maxwell, K. F., M. S. Powell, M. D. Hulett, P. A. Barton, I. F. McKenzie, T. P. Garrett, and P. M. Hogarth. 1999. Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc gammaRIIa. *Nat Struct Biol* 6:437.
12. Sondermann, P., R. Huber, and U. Jacob. 1999. Crystal structure of the soluble form of the human fcgamma-receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO J* 18:1095.
13. Metzger, H. 1999. It's spring, and thoughts turn to...allergies. *Cell* 97:287.
14. van Zandbergen G., R. Westerhuis, N. K. Mohamad, van de Winkel J.G.J., Daha M.R., and C. van Kooten. 1999. Crosslinking of the human fc receptor for IgA (FcalphaRI/CD89) triggers FcR gamma chain dependent shedding of soluble CD89. *J Immunol* (In Press)
15. Pfefferkorn, L. C. and G. R. Yeaman. 1994. Association of IgA-Fc receptors (Fc alpha R) with Fc epsilon RI gamma 2 subunits in U937 cells. Aggregation induces the tyrosine phosphorylation of gamma 2. *J Immunol* 153:3228.
16. Morton, H. C., I. E. Van den Herik-Oudijk, P. Vosseveld, A. Snijders, A. J. Verhoeven, P. J. Capel, and J. G. J. van de Winkel. 1995. Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. *J Biol Chem* 270:29781.
17. van Egmond, M., A. J. van Vuuren, H. C. Morton, A. B. van Sriel, L. Shen, F. M. Hofhuis, T. Saito, T. N. Mayadas, J. S. Verbeek, and J. G. van de Winkel. 1999. Human immunoglobulin A receptor (FcalphaRI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR gamma chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood* 93:4387.
18. Tomasello, E., L. Olcese, F. Vely, C. Geourgeon, M. Blery, A. Moqrigh, D.



- Gautheret, M. Djabali, M. G. Mattei, and E. Vivier. 1998. Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12. *J Biol Chem* 273:34115.
19. Launay, P., C. Patry, A. Lehuen, B. Pasquier, U. Blank, and R. C. Monteiro. 1999. Alternative endocytic pathway for immunoglobulin A Fc receptors (CD89) depends on the lack of FcRgamma association and protects against degradation of bound ligand. *J Biol Chem* 274:7216.
20. Reterink, T. J., G. van Zandbergen, M. van Egmond, N. Klar-Mohamad, C. H. Morton, J. G. van de Winkel, and M. R. Daha. 1997. Size-dependent effect of IgA on the IgA Fc receptor (CD89). *Eur J Immunol* 27:2219.
21. Tang, T., A. Rosenkranz, K. J. M. Assmann, M. J. Goodman, J. C. Gutierrez-Ramos, M. C. Carroll, R. S. Cotran, and T. N. Mayadas. 1997. A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fcgamma receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *J Exp Med* 186:1853.
22. Brown, E. J., J. F. Bohnsack, and H. D. Gresham. 1988. Mechanism of inhibition of immunoglobulin G-mediated phagocytosis by monoclonal antibodies that recognize the Mac-1 antigen. *J Clin Invest* 81:365.
23. Germain, R. N. 1997. T-cell signaling: the importance of receptor clustering. *Curr Biol* 7:R640.
24. Qian, D. and A. Weiss. 1997. T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9:205.
25. Wines, B. D., M. D. Hulett, G. P. Jamieson, H. M. Trist, J. M. Spratt, and P. M. Hogarth. 1999. Identification of residues in the first domain of human Fcalpha receptor essential for interaction with IgA. *J Immunol* 162:2146.
26. Tedder, T. F. 1991. Cell-surface receptor shedding: a means of regulating function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:305.
27. Schiller, C., A. Spittler, M. Willheim, Z. Szepefalusi, H. Agis, M. Koller, M. Peterlik, and G. Boltz-Nitulescu. 1994. Influence of suramin on the expression of Fc receptors and other markers on human monocytes and U937 cells, and on their phagocytic properties. *Immunology* 81:598.
28. Balboa, M. A., J. Balsinde, D. A. Dillon, G. M. Carman, and E. A. Dennis. 1999. Proinflammatory macrophage-activating properties of the novel phospholipid diacylglycerol pyrophosphate. *J Biol Chem* 274:522.
29. Khaled, Z., D. Rideout, K. R. O'Driscoll, D. Petrylak, A. Cacace, R. Patel, L. C. Chiang, S. Rotenberg, and C. A. Stein. 1995. Effects of suramin-related and other clinically therapeutic polyanions on protein kinase C activity. *Clin Cancer Res* 1:113.
30. Saez, C., N. M. Thielens, E. S. Bjes, and A. F. Esser. 1999. Association of terminal complement proteins in solution and modulation by suramin. *Biochemistry* 38:6807.
31. Galvani, A. P., C. Cristiani, P. Carpinelli, A. Landonio, and F. Bertolero. 1995. Suramin modulates cellular levels of hepatocyte growth factor receptor by inducing shedding of a soluble form. *Biochem Pharmacol* 50:959.
32. D'Amico, G. 1987. The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy. *Q J Med* 64:709.
33. Berger, J. and N. Hinglais. 1968. Intercapillary deposits of IgA-IgG. *J Urol Nephrol* 74:694.
34. de Fijter, J. W., M. R. Daha, W. E. Schroeijers, L. A. van Es, and C. van Kooten. 1998. Increased IL-10 production by stimulated whole blood cultures in primary IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol* 111:429.
35. van den Wall Bake AW, M. R. Daha, J. Evers-Schouten, and L. A. van Es. 1988. Serum IgA and the production of IgA by

peripheral blood and bone marrow lymphocytes in patients with primary IgA nephropathy: evidence for the bone marrow as the source of mesangial IgA. *Am J Kidney Dis* 12:410.

36. **Feehally, J. and A. C. Allen.** 1999. Pathogenesis of IgA nephropathy. *Ann Med Interne (Paris)* 150:91.

37. **Tomana, M., K. Matousovic, B. A. Julian, J. Radl, K. Konecny, and J. Mestecky.** 1997. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int* 52:509.

38. **van Zandbergen, G., C. van Kooten, N. K. Mohamad, T. J. Reterink, J. W. de Fijter, J. G. J. van de Winkel, and M. R. Daha.** 1998. Reduced binding of immunoglobulin A (IgA) from patients with primary IgA nephropathy to the myeloid IgA Fc-receptor, CD89. *Nephrol Dial Transplant* 13:3058.

39. **Tomana, M., J. Novak, B. A. Julian, K. Matousovic, K. Konecny, and J. Mestecky.** 1999. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest* 104:73.

40. **Feehally, J. and A. C. Allen.** 1999. Structural features of IgA molecules which contribute to IgA nephropathy. *J Nephrol* 12:59.

41. **Leung, J. C., P. Y. Poon, and K. N. Lai.** 1999. Increased sialylation of polymeric immunoglobulin A1: mechanism of selective glomerular deposition in immunoglobulin A nephropathy? *J Lab Clin Med* 133:152.

42. **Allen, A. C., P. S. Topham, S. J. Harper, and J. Feehally.** 1997. Leucocyte beta 1,3 galactosyltransferase activity in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 12:701.

43. **Chen, A., W. P. Chen, L. F. Sheu, and C. Y. Lin.** 1994. Pathogenesis of IgA nephropathy: in vitro activation of human mesangial cells by IgA immune complex leads to cytokine secretion. *J Pathol* 173:119.

44. **Westerhuis, R., G. van Zandbergen, N. A. M. Verhagen, N. Klar-Mohamad, M. R. Daha, and C. van Kooten.** 1999. Human mesangial cells in culture and in kidney sections fail to express Fc alpha receptor (CD89). *J Am Soc Nephrol* 10:770.

45. **Westerhuis, R., G. van Zandbergen, A.M. Woltman, et al.** 1999. A novel receptor for IgA expressed on human renal mesangium cells. (Un-Pub)

## ***Samenvatting***

- I. INLEIDING**
- II. DOEL VAN DIT ONDERZOEK**
- III. BINDING VAN IGA MET CD89**
- IV. DE ROL VAN FC RECEPTOREN IN IGA-NEFROPATIE**
- V. ALGEMENE CONCLUSIES**



## I. INLEIDING

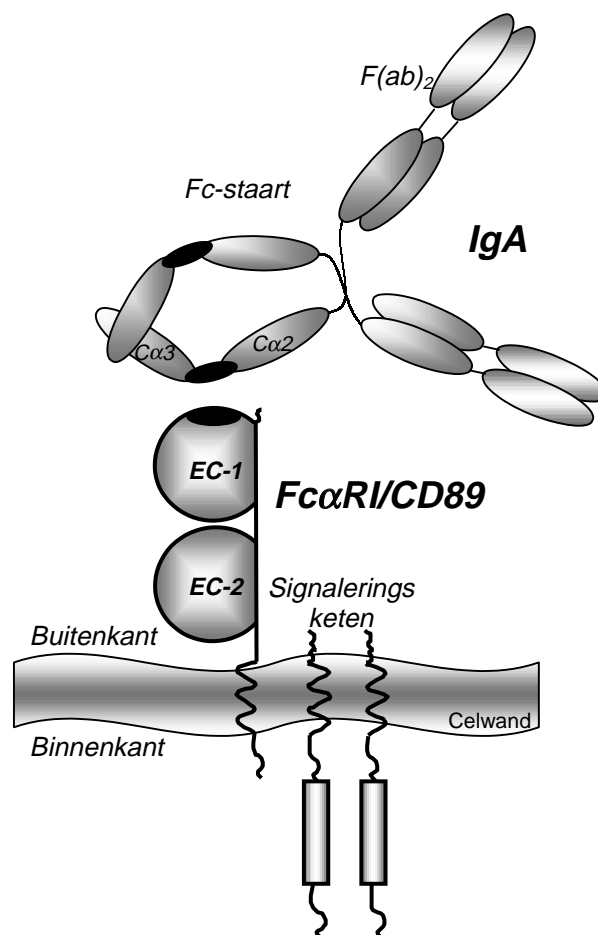
Ons lichaam wordt dagelijks blootgesteld aan potentiële ziektenverwekkers, zoals bacteriën, parasieten en virussen. Het afweersysteem voorkomt dat we ziek worden, en is voor deze taak uitgerust met een netwerk van gespecialiseerde organen, witte bloedcellen en afweerstoffen. Specifieke kenmerken van ziektenverwekkers, antigenen genaamd kunnen hiermee worden herkend en vernietigd.

Een antigeen herkende afweerstof, antistof genaamd, heeft twee delen, een kop deel en een staart deel (figuur 1).

Figuur 1. Dit schema laat de interactie tussen IgA en CD89 zien, aan de hand van al bekende gegevens en de in dit onderzoek naar voren gekomen bevindingen.

De antistof kop,  $F(ab)_2$  genaamd herkent en bindt een antigeen. Om zoveel mogelijk antigenen te herkennen kan het afweersysteem ongeveer 2 miljard verschillende antistoffen maken. Op de celwand van witte bloedcellen bevinden zich eiwitten, Fc Receptoren genaamd, die specifiek aan het staart gedeelte, het Fc-deel van antistoffen kunnen binden. Een antistof bindt dus enerzijds aan een antigeen, anderzijds wordt dit complex gebonden door Fc Receptoren, die witte bloedcellen activeren tot de vernietiging van de potentiële ziektenverwekker (figuur 1).

Op basis van het Fc deel worden de antistoffen in 5 klassen verdeeld, IgA, IgG, IgE, IgM en IgD. Voor elk van deze antistof klassen zijn er Fc Receptoren beschreven. De meeste antigenen komen het lichaam binnen via de slijmvliezen van mond, neus, long, darm en voortplantingsorganen. Het afweersysteem produceert hier vooral antistoffen van de IgA klasse. Voor dit type is een Fc Receptor beschreven, de  $Fc\alpha RI$  (ook wel CD89 genoemd). Er zijn een aantal ziekte bekend



waarbij de IgA moleculen een belangrijke rol spelen. Een voorbeeld is IgA nefropathie waar door onbekende oorzaak een neerslag van IgA of IgA-immuun complexen in de nier ontstaan, wat leidt tot ernstige beschadigingen en uiteindelijk noodzaakt tot niervervangende therapie.

## **II. DOEL VAN DIT ONDERZOEK**

In dit proefschrift hebben we in detail de interacties tussen IgA en zijn specifieke Fc Receptor CD89 bestudeerd. Ook hebben we de rol van CD89 in het ontstaan en de progressie van het IgAN ziektebeeld onderzocht. We hopen hiermee meer duidelijkheid te krijgen omtrent de rol van IgA en CD89 in het menselijk afweersysteem.

## **III. BINDING VAN IGA MET CD89**

Het tweede hoofdstuk beschrijft de interactie tussen IgA en CD89. De IgA-Fc staart bestaat uit 2 eiwit componenten, het C $\alpha$ 2 en het C $\alpha$ 3 domein. Recentelijk is aangetoond dat het gebied tussen C $\alpha$ 2 en C $\alpha$ 3 noodzakelijk is voor de IgA binding aan CD89. Andersom hebben wij in **hoofdstuk 2** aangetoond welk deel van de CD89 nodig is om IgA te herkennen.

Het CD89 eiwit bestaat uit 2 eiwit componenten, het EC-1 en het EC-2 domein. Een receptor die qua structuur erg lijkt op CD89 is de Fc $\gamma$ 2R, afkomstig uit een koe en specifiek voor koeien IgG. We hebben domeinen van CD89 en Fc $\gamma$ 2R uitgewisseld en deze “chimere” receptoren aan de buitenkant van een cel tot expressie gebracht. Binding van IgA toonde aan dat het EC-1 domein van CD89 essentieel was voor de herkenning van de IgA-Fc staart.

Een oplosbare vorm van de CD89 receptor, gemaakt via recombinant DNA technologie was gebruikt om in muizen de productie van antistoffen op te wekken. Deze standaard techniek leverde 5 specifieke antistoffen op die CD89 herkenden. Vier van deze antistoffen bleken door binding aan CD89 de herkenning van IgA te blokkeren. Gebruik makend van de chimere receptoren bleek dat deze vier blokkerende antistoffen elk specifiek aan het EC-1 domein van CD89 binden, precies in overeenkomst met de bevinding dat ook IgA bindt aan dit CD89 domein bindt (figuur 1).

IgA binding aan CD89 leidt tot activatie van het afweersysteem. De hoeveelheid CD89 receptoren aanwezig op de afweercellen kan mede bepalend zijn voor de mate van activatie. Het aantal CD89 receptoren wordt verhoogd wanneer dat nodig is, bv. bij het herkenning van IgA-antigen complexen. Weinig is bekend over het afremmen van de door CD89 gestuurde opruimreacties. In **hoofdstuk 3**





hebben we aangetoond dat de CD89 receptor na activatie met IgA van de celwand wordt verwijderd. Een oplosbare vorm van CD89 komt hierdoor in de circulatie terecht, waar het IgA-antigen complex kan binden. Dit mechanisme kan enerzijds zorgen voor een afname van CD89 op witte bloedcellen van met name het monocyt type, en anderzijds zorgen voor een afname van het aantal antigen-antistof complexen dat aan witte bloed cellen kan binden. De ontdekking van dit mechanisme, “shedding” genoemd, geeft nu voor het eerst indicaties hoe CD89 functie door IgA ook geremd kan worden.

Voor cel activatie is de CD89 receptor in de celwand geassocieerd met een ander eiwit, het “ $\gamma$ -keten” signalerings eiwit (figuur 1). Voor de bestudering van IgA binding aan CD89 werd een model ontwikkeld waarbij getransfecteerde muize cellen enkel het CD89 eiwit, of het CD89 eiwit samen met de  $\gamma$ -keten op de celwand tot expressie brachten. Op deze manier werd aangetoond dat voor IgA binding de  $\gamma$ -keten niet nodig is terwijl voor cel activatie de aanwezigheid van het signalerings eiwit essentieel is.

In de circulatie komt IgA voor in verschillende vormen. Naast een enkel, “monomeer” IgA (mIgA) molecuul (ongeveer 85% van het totale IgA) produceert het afweer systeem ook IgA vormen bestaande uit twee “dimeer” (dIgA) of meer dan twee “polymeer” IgA (pIgA) moleculen (samen ongeveer 15%). Het is niet precies bekend wat de rol is van deze verschillende IgA vormen. In **hoofdstuk 4** gebruiken hebben we getransfecteerde muis cellen gebruikt om IgA binding aan CD89 te bestuderen en laten we zien dat pIgA een hogere mate van binding vertoonden met CD89 in vergelijking tot mIgA. Daarna hebben we laten zien dat de binding van pIgA tot een hoge mate van cel activatie leidt terwijl mIgA in het geheel niet in staat leek de cel te activeren. Dit suggereert dat mIgA de CD89 receptor in rust houdt, totdat IgA grote concentraties antigen herkend en de hoeveelheid IgA-antigen complexen de overhand krijgen t.o.v. het mIgA en daarmee de rusttoestand veranderen in een algehele activatie van CD89 dragende witte bloedcellen.

#### **IV. DE ROL VAN FC RECEPTOREN IN IGA-NEFROPATIE**

Patiënten met IgAN hebben door een tot nu toe onbekend defect deposities van IgA in hun nier. Met behulp van het model, beschreven in **hoofdstuk 4**, toonden we aan dat IgA van patiënten met IgAN een mindere mate van binding aan CD89 vertoonde, vergeleken met het IgA afkomstig van gezonde controles (**hoofdstuk 5**). Het verschil in binding wordt veroorzaakt doordat het monomere IgA van deze patiënten significant minder bindt aan CD89. Andere onderzoekers hebben

aangetoond dat er iets mis lijkt te zijn met de besuikering van het IgA molecuul in patiënten met IgAN. Deze defecten in de IgA structuur zouden kunnen verklaren waarom de binding aan CD89 minder efficiënt verloopt. De verlaagde binding van IgA aan CD89 heeft mogelijk een effect op de klaring van IgA en kan deels verklaren waarom patiënten met IgAN hogere IgA concentraties in hun circulatie hebben.

De expressie van een Fc Receptor voor IgA in de nier zou kunnen verklaren waarom IgA in de nier terecht komt. Met behulp van de antistoffen, beschreven in **hoofdstuk 2**, die specifiek CD89 herkennen, hebben we aangetoond dat op nierweefsel of op gekweekte niercellen geen CD89 voorkomt (**hoofdstuk 6**). Eerdere studies hadden de suggestie gewekt dat mesangiale cellen, een soort bindweefsel cellen belangrijk voor de functionele organisatie van de nier, CD89 tot expressie brengen. Onze studie toonde aan dat IgA inderdaad bindt en tot activatie leidt van deze cellen. Blokkerende CD89 antistoffen waren echter niet in staat deze binding te remmen. Een nieuwe antistof, opgewekt tegen een onbekend IgA bindend eiwit was wel in staat deze IgA binding te blokkeren. Gebruik makend van deze antistof en IgA, hebben we een nieuwe Fc Receptor voor IgA aangetoond op de celwand van mesangiale cellen. Vervolg onderzoek zal moeten uitwijzen wat dit voor een receptor is en welke rol deze “nieuwe” IgA receptor mogelijk zou kunnen spelen in het IgA gemedieerde afweer systeem.

## **V. ALGEMENE CONCLUSIES**

De bevindingen in dit proefschrift hebben er toe geleid dat we nu een gedetailleerd model kunnen maken van de interactie tussen CD89 en de verschillende vormen van IgA. Met de ontdekking van de oplosbare CD89 receptor hebben we mogelijk een nieuwe vorm van regulatie van CD89 functie gevonden. De verstoorde binding van IgA aan CD89 en de aanwezigheid van een eventuele nieuwe IgA Fc Receptor op mesangiale cellen, leveren nieuwe inzichten die kunnen bijdragen aan een beter begrip van het ontstaan en de ontwikkeling van de ziekte IgAN. In de toekomst kunnen onze bevindingen, tezamen met de uit dit onderzoek voortgekomen nieuwe materialen en methoden, een verdere bijdrage leveren aan het ontrafelen van het complexe IgA afweer systeem. Uiteindelijk zou dit kunnen leiden tot betere behandelmethoden van IgA-geassocieerde ziekten, zoals IgAN.

## **CURRICULUM VITAE**

De schrijver van dit proefschrift, Ger van Zandbergen, werd geboren op 18 juli 1971 te Drachten. In 1989 werd het Atheneum diploma behaald aan het Drachtster Lyceum, te Drachten. In datzelfde jaar begon hij aan zijn studie Scheikunde aan de Rijks Universiteit Groningen. Na twee jaar werd deze studie verwisseld voor de studie Biologie. Tijdens deze studie deed hij moleculair genetisch onderzoek op de afdeling moleculaire genetica van het Biologisch Centrum, te Haren, onder leiding van Dr. J. Kok en Prof. Dr. G. Venema. Vervolgens deed hij moleculair immunologisch onderzoek op de afdeling Klinische Immunologie van het Academisch Ziekenhuis, te Groningen, onder leiding van Dr. W. Helfrich and Prof. Dr. L. de Leij. Na het behalen van het doctoraal examen in 1995 is hij in dienst getreden bij de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO) als onderzoeker in opleiding bij de afdeling Nierziekten van het Leids Universitair Medisch Centrum (hoofd Prof. Dr. L.A. van Es, sinds 1 juli 1998 Prof. Dr. L.C. Paul). Het onderzoek onder leiding van Prof. Dr. M.R. Daha en Dr. C. van Kooten, in samenwerking met de afdeling Immunologie van Academisch Ziekenhuis Utrecht, onder leiding van Prof. Dr. J.G.J. van de Winkel, werd verricht in het kader van de projectsubsidie "Moleculaire en Functionele karakterisatie van de humane myeloïde Fc Receptor voor IgA, Fc $\alpha$ RI/CD89" (No. 901-12-214) en is in dit proefschrift samengevat.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

The last four years working in Leiden has been a great experience for which I thank all the people from the D3-P floor for creating a pleasant work environment. Especially, I thank Ngaisah, for being a great teacher and for thinking with me, making it almost impossible to fail. I also thank Rocco and Ralf for a great time in and outside the lab, Bert for listening to me all the time and cycling in front of me, Willeke for producing the Fc(CD89)2 protein and Mecheline for setting up a sensitive blotting system. Furthermore I am indebted to Angela, Mirjam and colleagues for secretarial assistance and I am grateful for the help, fun time and results produced with the technical assistance of Arnout, Nicole, Jolanda, Evert, Willeke and of course Francien. I thank all my friends and family for their support and just for being there. Finally, for Barbara and Vera, a thanks is not enough.