

Cover Page



Universiteit Leiden



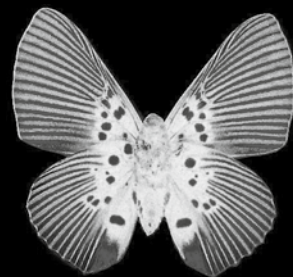
The handle <http://hdl.handle.net/1887/19077> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Cohen, Danielle

**Title:** Clinical significance of C4d in SLE and antiphospholipid syndrome

**Date:** 2012-06-13

# NEDERLANDSE SAMENVATTING



## Het complementsysteem

In het humane immuunsysteem neemt complement een bijzondere plaats in. Dit systeem werkt samen met antistoffen en fagocyten bij de afweer tegen micro-organismen en is waarschijnlijk evolutionair een van de oudste verdedigingssystemen in de biologie. In tegenstelling tot lymfocyten, hoeft complement niet te 'leren' hoe om te gaan met micro-organismen; het werkt direct vanaf de geboorte.

Normaal gesproken is het complementsysteem in een niet-geactiveerde staat aanwezig als een aantal verschillende plasma-eiwitten in het bloed. De verschillende complementeiwitten worden gecodeerd door letters en cijfers, zoals C1, C3 of C4, afhankelijk van hun plaats in het systeem. Activatie, en daarmee het ontstaan van een kettingreactie aan acties en interacties tussen deze eiwitten, kan plaatsvinden na binding van complementeiwitten aan antilichamen en immuuncomplexen. Dit wordt de klassieke route genoemd. Het complementsysteem kan ook rechtstreeks geactiveerd worden door directe interactie tussen complement eiwitten met het celoppervlak van pathogenen (de zogenaamde 'Mannose Binding Lectin' of MBL route). Uiteindelijk leidt deze kettingreactie tot de vorming van anaphylatoxinen, stoffen die fagocyterende cellen aantrekken, en de vorming van het zogenaamde 'membrane attack complex', een ingenieus complex van eiwitten dat binnen enkele seconden tot destructie van de celwand van de 'target-cell' kan leiden.

Als verdedigingsmechanisme is het complementsysteem uiterst effectief en onmisbaar. Echter, wanneer het immuunsysteem zich tegen het eigen organisme keert en auto-antistoffen gevormd worden, speelt het complementsysteem een fundamentele rol bij het ontstaan van ongewenste weefselschade. Zowel de fysiologie als de rol van complement in auto- en alloimmuniteit worden in meer detail besproken in de algemene inleiding van dit proefschrift (**hoofdstuk 2**).



## C4d

C4d is een molecuul dat als afsplitsproduct overblijft na activatie van C4, een eiwit dat een belangrijke rol speelt in de klassieke route van het complementsysteem. Hoewel C4d voor zover bekend geen biologische functie heeft, beschikt het over een belangrijke eigenschap: Het molecuul C4d vormt een covalente verbinding (een zeer stabiele verbinding tussen twee moleculen waarbij electronen gedeeld worden) met celoppervlakken of celmembranen. Hierdoor blijft C4d langdurig gebonden –veel langer dan antilichamen zelf- en kan door immunohistochemische technieken gemakkelijk in beeld gebracht worden. Onder de microscoop kan men doordat C4d als een soort spoor op de plaats delict achterblijft, ‘zien’ waar in het weefsel antistoffen complement hebben geactiveerd en schade hebben veroorzaakt. Het onderzoeken van de aanwezigheid van C4d in weefsel geeft daardoor in de eerste plaats inzicht in ziektemechanismen, maar kan ook als diagnosticum gebruikt worden. Als diagnostische test wordt C4d sinds de jaren '90 gebruikt om antilichaam gemedieerde afstoting van getransplanteerde organen aan te tonen.

In de algemene inleiding (**hoofdstuk 2**) wordt C4d geïntroduceerd aan de lezer. In de algemene discussie van het proefschrift (**hoofdstuk 8**) wordt de geschiedenis, de huidige stand van zaken en toekomst van C4d als biomarker verder uitgewerkt.

## Dit proefschrift

In dit proefschrift wordt de rol van C4d uitgediept in andere klinische settings dan orgaantransplantatie - waar het tot nu toe onderzocht en gebruikt werd. Waar C4d in getransplanteerde organen een indicator is van schade door alloantistoffen (eigen antistoffen gericht tegen vreemd weefsel) berust dit proefschrift op de hypothese dat in ziekten waar autoantistoffen geproduceerd worden (eigen antistoffen gericht tegen eigen weefsel) C4d eveneens van betekenis zou kunnen zijn.

## C4d in SLE en antifosfolipiden syndroom

**DEEL 1: C4D EN THROMBOTISCHE COMPLICATIES** De studies in dit proefschrift zijn daarom voornamelijk verricht in patiënten met Systemische Lupus Erythematosus (SLE) en antifosfolipiden syndroom, twee autoimmuunziekten waar autoantistoffen een cruciale rol spelen. De antistoffen die deze patiënten aanmaken, circuleren in het bloed en komen op allerlei plekken in het lichaam terecht. Daar waar ze binden of neerslaan, kan –onder andere via activatie van het complement systeem- schade ontstaan. Patiënten met deze ziekten hebben derhalve symptomen in alle orgaansystemen, waarvan de nieren, de huid, en waarschijnlijk ook de hersenen frequent aangedaan raken. De achtergrond, kliniek en epidemiologie van SLE en antifosfolipiden syndroom komen respectievelijk aan de orde in de algemene inleiding (**hoofdstuk 2**) en in een overzichtsartikel over antifosfolipiden syndroom (**hoofdstuk 3**).

In de daarop volgende hoofdstukken wordt de rol van C4d in de nieren (**hoofdstuk 4**) en hersenen (**hoofdstuk 5**) van patiënten met SLE en antifosfolipiden syndroom onderzocht. Het blijkt dat in beide organen de aanwezigheid van C4d sterk geassocieerd is met trombose in de kleine bloedvaten (microtrombotische schade). Wanneer C4d aanwezig is in glomeruli in de nier, is er een sterkere kans ook glomerulaire microthrombi aan te treffen. Een C4d-kleuring op een nierbiopt van een patiënt met SLE of antifosfolipiden syndroom zou in de toekomst mogelijk consequenties kunnen hebben voor de risico-inschatting van patiënten op het ontwikkelen van thrombotische microangiopathie, en zelfs op eventuele behandeling met antistolling en/of complementremmers.

In de hersenen van patiënten met SLE en antifosfolipiden syndroom blijkt C4d sterk aan te kleuren in arteriolen en venulen in de cortex. Deze vaatjes hebben vaak een verdikte wand, zonder de aanwezigheid van lymfocyten, wat een inflammatoir proces suggereert. Bij patiënten met veel C4d depositie, zijn vaker microthrombi te detecteren in vergelijkbare kleine vaatjes, en tevens zijn er vaker



aanwijzingen voor micro-infarcten en ischemische schade. Tot nu toe was het onbekend hoe auto-antistoffen in het brein van SLE patiënten zouden kunnen leiden tot deze vorm van thrombo-ischemische schade. **Hoofdstuk 5** geeft een mogelijke verklaring hiervoor, namelijk complement activatie op het cerebrale endotheel met vaatwandveranderingen en microthrombose als gevolg.

**DEEL 2: C4D EN ZWANGERSCHAP** In het volgende deel van het proefschrift ligt de nadruk op zwangerschap en herhaalde miskramen. Niet alleen omdat bekend is dat patiënten met SLE en antifosfolipiden syndroom gecompliceerde zwangerschappen doormaken, maar ook omdat de zwangerschap in het algemeen sommige immunologische overeenkomsten vertoont met transplantatie, waar C4d immers voor het eerst beschreven werd. Wanneer een zwangerschap resulteert in een vroege of latere miskraam, zou dit geïnterpreteerd kunnen worden als een vorm van ‘afstoting’ van de lichaamsvreemde foetus. Deze gedachtengang was het uitgangspunt om de rol van C4d te onderzoeken in placenta's van patiënten met SLE en antifosfolipiden syndroom (**hoofdstuk 6**) en in patiënten met herhaalde miskramen zonder duidelijke oorzaak (**hoofdstuk 7**).

De placenta is een orgaan dat ontstaat tijdens de zwangerschap en een cruciale rol speelt bij het in stand houden van de zwangerschap, het faciliteren van groei van de foetus door voedingsstoffen naar de circulatie van het kind te transporteren (en afvalstoffen af te voeren) en het verschaffen van immunologische tolerantie van de foetus. De placentaire vlokken zijn bekleed door syncytiotrophoblast, de cellaag die het grensvlak vormt waarop het maternale bloed in contact komt met foetaal weefsel.

In **hoofdstuk 6** werd duidelijk dat C4d in sommige placenta's van patiënten met SLE en antiphospholipiden syndroom veelvuldig aanwezig was op het foetomaternale grensvlak. In sommige placenta's bleef geen enkele vlok vrij van C4d. De zwangerschappen waarin dit fenomeen werd geobserveerd liepen veelal niet goed af. De aan-

wezigheid van C4d was sterk geassocieerd met intrauterine vruchtdood in een groep patiënten met SLE en antifosfolipiden syndroom. In placenta's van patienten met een normale zwangerschap, of patienten die een intrauterine vruchtdood doormaakten ten gevolge van aangeboren afwijkingen waarbij waarschijnlijk geen afstoting optrad, kwam C4d vrijwel nooit voor in de placenta. **Hoofdstuk 6** laat zien dat het waarschijnlijk is dat C4d in de placenta een uiting is van een sterke antilichaam-gemedieerde immuunrespons. Antifosfolipiden antistoffen zijn een zeer waarschijnlijke kandidaat, omdat bekend is dat deze een sterke affiniteit hebben voor trophoblast. Andere antistoffen die bij SLE patiënten aanwezig zijn zouden echter evengoed de veroorzaker kunnen zijn. Ook is het voorstelbaar dat inflammatie op het foetomaternale grensvlak leidt tot een dysfunctionele placenta, met slechte zwangerschapsuitkomsten tot gevolg. Toekomstig onderzoek zal uit moeten wijzen of C4d in een placenta van een patiënt met SLE of antiphospholipiden syndroom (therapeutische) consequenties heeft voor een volgende zwangerschap.

De bevindingen van **hoofdstuk 6** gaven aanleiding om in **hoofdstuk 7** in een populatie van patiënten met herhaalde miskramen zonder duidelijke oorzaak te inventariseren of een vergelijkbaar mechanisme hier eveneens een rol zou kunnen spelen. Hier bleken sterke aanwijzingen voor te bestaan – in een subgroep van patiënten met herhaalde miskramen was er sprake van sterk C4d positief miskraammateriaal. Omdat bij deze patiënten antifosfolipiden antistoffen uitgesloten waren, werd in serum gezocht naar de aanwezigheid van anti-HLA antistoffen. Deze bleken in een aantal vrouwen met C4d positief miskraammateriaal aanwezig te zijn. Deze combinatie doet erg denken aan ‘antilichaam gemedieerde afstoting’ bij transplantatie, waar eveneens een combinatie van anti-donor antistoffen en C4d in het donororgaan pathognomonisch is voor deze vorm van reëctie. **Hoofdstuk 7** biedt voornamelijk een nieuw pathofysiologisch inzicht in een populatie waar zeer vaak geen oorzaak wordt gevonden voor het optreden van herhaalde miskramen.



## Discussie en conclusie

In de algemene discussie van het proefschrift (**Hoofdstuk 8**) wordt allereerst de rol van C4d in een historisch kader geplaatst door middel van interviews met verschillende experts die een belangrijke bijdrage hebben geleverd aan het veld. Ontwikkelingen vanaf de eerste studies naar deze marker in de jaren '90 in getransplanteerde nieren, tot de voorzichtige stappen met C4d in nieuwe gebieden zoals autoimmuunziekten en zwangerschap zoals beschreven in dit proefschrift, komen aan de orde. Wellicht zijn nieuwe, sensitievere methoden denkbaar om antilichaam-gemedieerde rejectie aan te tonen. Deze komen in dit hoofdstuk aan de orde, en zijn voor sommigen reden om aan een toekomst voor C4d als biomarker te twijfelen.

Aan de andere kant opent de komst van verschillende complementremmende medicijnen (eculizumab) nieuwe deuren voor C4d als marker: Zouden hiermee patiënten geïdentificeerd kunnen worden die baat zouden kunnen hebben bij deze (zeer kostbare) middelen?

De bevindingen in dit proefschrift laten zien dat ook buiten de transplantatiewereld C4d van nut kan zijn bij het ontrafelen van antilichaam-gemedieerde ziektemechanismen, en uiteindelijk wellicht ook gebruikt kan worden als voorspellende biomarker voor trombotische en obstetrische complicaties. Prospectieve studies zullen nodig zijn om de haalbaarheid hiervan in de dagelijkse klinische praktijk te toetsen.

