



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unravelling the anti-carbamylated protein antibody response in rheumatoid arthritis

Verheul, M.K.

Citation

Verheul, M. K. (2019, January 9). *Unravelling the anti-carbamylated protein antibody response in rheumatoid arthritis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/68199>

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/1887/68199>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/68199> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Verheul, M.K.

Title: Unravelling the anti-carbamylated protein antibody response in rheumatoid arthritis

Issue Date: 2019-01-09

Nederlandse Samenvatting

Reumatoïde artritis(RA) is een gecompliceerde, chronische auto-immuunziekte. In Hoofdstuk 1 wordt het huidige inzicht over het ontstaan en beloop van RA uiteengezet. Op dit moment is het niet bekend waardoor deze ziekte ontstaat, maar enkele omgevings- en genetische risicofactoren zijn wel bekend; bijvoorbeeld roken en HLA. Er zijn veel verschillende behandelmethodes ontwikkeld voor RA, maar deze zorgen nog niet voor volledige genezing. Om RA werkelijk te genezen, lijkt een zo vroeg mogelijke behandeling nodig. Het is daardoor van belang om de ziekte in een vroeg stadium te ontdekken. De huidige diagnose wordt gebaseerd op gewrichtsontsteking en biomarkers in serum, zoals autoantilichamen. Autoantilichamen die nu vooral worden gebruikt voor diagnose zijn reumafactor (RF) en antilichamen tegen gecitrullineerde eiwitten (ACPA). Naast deze autoantilichamen zijn er ook andere antilichamen aanwezig in RA en gerelateerde ziektes. In [Hoofdstuk 2](#) worden meerdere antilichamen beschreven die geschikt zouden kunnen zijn als biomarker voor RA. Eén van de meest bestudeerde antilichamen die op dit moment nog niet in de kliniek in gebruik is, is de groep antilichamen die carbamylatie herkent (anti-CarP antilichamen). In het eerste deel van dit proefschrift wordt daarom vooral aandacht besteed aan anti-CarP antilichamen, met een speciale focus op klinische relevantie, ook in vergelijking met ACPA en RF.

In [Hoofdstuk 3](#) wordt onderzocht of verschillende RA-specifieke antilichamen (RF, ACPA en anti-CarP antilichamen) ook aanwezig zijn in RA diermodellen. Verrassend genoeg waren anti-CarP antilichamen wel detecteerbaar in het collageen geïnduceerde arthritis model in rhesusapen, terwijl in ACPA en RF afwezig zijn in dit model. De anti-CarP antilichamen waren al aanwezig voor het begin van klinische symptomen. Het is hierbij wel belangrijk om te vermelden dat er apen waren met anti-CarP antilichamen maar zonder symptomen. Daarnaast waren niet alle zieke dieren positief voor anti-CarP antilichamen.

In [Hoofdstuk 4](#) wordt juist gekeken naar anti-CarP antilichamen in de mens. Alle eerdere metingen van anti-CarP antilichamen zijn uitgevoerd in de Kaukasische populatie. Dit hoofdstuk is echter het bewijs dat anti-CarP antilichamen ook in de Aziatische populatie van RA patiënten aanwezig zijn. De hoeveelheid patiënten positief voor anti-CarP antilichamen is vergelijkbaar in de Japanse en Kaukasische RA patiënten.

In [Hoofdstuk 5](#) worden studies beschreven naar de aanwezigheid van anti-CarP antilichamen en ACPA fijn-specificiteiten in RA patiënten. Van deze patiënten waren monsters van zowel voor als na de diagnose aanwezig. In de monsters voor diagnose is een hoger percentage personen positief voor de verschillende antilichamen, als dit wordt vergeleken met gezonde controles. Na de diagnose was een nog groter percentage van de monsters positief voor de verschillende antilichamen. Daarnaast was er een duidelijke associatie tussen de aanwezigheid van anti-CarP antilichamen en gewrichtsschade in dit cohort.

Autoantilichamen zoals anti-CarP antilichamen komen vaak in meerdere ziektes voor. Daarom wordt er in [hoofdstuk 6](#) gekeken naar anti-CarP antilichamen in condities met verhoogde carbamylatie, namelijk roken, nierfalen en chronische ontsteking. Het is duidelijk dat het percentage anti-CarP-antilichaam positieve patiënten hoger is bij RA dan in de andere bestudeerde groepen. De hoeveelheid patiënten positief voor anti-CarP antilichamen is wel licht verhoogd in nierfalen, vergeleken met gezonde controles.

Omdat anti-CarP antilichamen inmiddels in veel cohorten zijn gemeten werd in [hoofdstuk 7](#) een meta-analyse uitgevoerd. Het doel van deze studie was om te onderzoeken of anti-CarP antilichamen gebruikt kunnen worden voor de diagnose van RA of om te voorspellen wie er in de gezonde populatie RA zal ontwikkelen. Hierbij hebben we rekening gehouden met het gegeven dat ACPA en RF al in gebruik zijn in de kliniek. Om het effect van anti-CarP antilichamen op de diagnose van RA te bestuderen werden RA patiënten, ziektecontroles, eerstegraads familieleden en gezonde controles geïnccludeerd. In de meta-analyse wordt duidelijk dat ACPA en RF voldoende zijn om RA te diagnosticeren als patiënten zich bij de kliniek melden met klachten. De toevoeging van anti-CarP antilichamen lijkt in dit geval overbodig. Om de voorspelling van het ontwikkelen van RA te onderzoeken, werden pre-symptomatische personen geïnccludeerd, zoals in hoofdstuk 5. In dit geval is de combinatie van ACPA, RF en anti-CarP antilichamen vele malen beter dan de andere antilichaamcombinaties. Deze combinatie is daarom zeer interessant voor het voorspellen van RA ontwikkeling en mogelijk voor een zeer vroege diagnose van RA.

Op dit moment is er veel bekend over de klinische associaties van anti-CarP antilichamen, terwijl er veel minder bekend is over de antigenen waar deze antilichamen aan binden of over de antigenen die een anti-CarP antilichaam respons uitlokken. Dit is de focus van het tweede deel van dit proefschrift.

[Hoofdstuk 8](#) beschrijft studies die zich richten op de methodes voor detectie van gecarbamyleerde en gecitrullineerde eiwitten. Omdat de aminozuren behorende bij deze reacties erg op elkaar lijken kan het moeilijk zijn deze te onderscheiden. Veel van de commercieel verkrijgbare antilichamen tegen citrulline waren bijvoorbeeld ook in staat om gecarbamyleerde eiwitten te herkennen in zowel ELISA als western blot. De geteste anti-homocitrulline antilichamen hadden wel een voorkeur voor gecarbamyleerde eiwitten. Voor het meten van deze modificaties in een complexe eiwitmix lijkt massa spectrometrie echter essentieel voor het identificeren van gecarbamyleerde of gecitrullineerde eiwitten.

[Hoofdstuk 9](#) gaat verder in op mogelijke antigenen voor anti-CarP antilichamen. Op dit moment wordt gecarbamyleerd foetaal kalf serum (Ca-FCS) gebruikt in ELISA om anti-CarP antilichamen te detecteren. Deze eiwitmix wordt hier verder onderzocht. Eén van de eiwitten in deze mix die goed wordt herkend door anti-CarP antilichamen is gecarbamyleerd alpha-1-antitrypsine (Ca-A₁AT). Het blijkt dat assays gebaseerd op Ca-FCS en Ca-A₁AT beide gelijkwaardig zijn wat betreft de detectie van anti-CarP antistoffen en de identificatie van RA patiënten.

Daarnaast worden ook sommige van de Ca-A1AT peptides goed herkend door antilichamen, alhoewel dit minder universeel is dan de eiwitherkenning. Hoofdstuk 10 beschrijft studies die dieper in gaan op verschillende humane gecarbamyleerde eiwitten die als antigen herkend zouden kunnen worden door anti-CarP antilichamen. Massa spectrometrie wordt gebruikt om deze te identificeren in de gewrichten van RA patiënten en controles. Er werd verwacht dat carbamylatie verhoogd zou zijn in de gewrichten van RA patiënten, maar dat was niet het geval. Het aantal gecarbamyleerde peptides in RA en controles was vergelijkbaar. Opvallend genoeg was het aantal verschillende gecarbamyleerde peptides wel verhoogd in kraakbeen, vergeleken met synoviaal vocht en synovium. Een groot gedeelte van de geïdentificeerde gecarbamyleerde eiwitten konden ook worden herkend door anti-CarP antilichamen. Dit is een indicatie dat gecarbamyleerde eiwitten in de gewrichten van RA patiënten, vooral in kraakbeen, een mogelijk doelwit vormen voor anti-CarP antilichamen. In Hoofdstuk 11 wordt uiteindelijk gekeken naar verdere eigenschappen van anti-CarP antilichamen. De antilichamen kunnen veel verschillende gecarbamyleerde eiwitten herkennen en blijken zeer kruisreactief te zijn. De mate van kruisreactiviteit voor gecarbamyleerde eiwitten verschilt per patiënt. Als muizen geïmmuniseerd worden met een gecarbamyleerd eiwit zijn de resulterende antilichamen ook kruisreactief tegen andere gecarbamyleerde eiwitten. Bovendien zorgt immunisatie met een vreemd gecarbamyleerd eiwit voor het doorbreken van de immunologische tolerantie richting eigen gecarbamyleerde eiwitten. Hierdoor zou een immunologische reactie tegen een vreemd gecarbamyleerd eiwit kunnen zorgen voor een gevaarlijke autoimmuunreactie.

De mogelijke rol van anti-CarP antilichamen in de pathogenese van RA wordt bediscussieerd in Hoofdstuk 12. Hierbij kan gedacht worden aan complement-activatie door antilichaambinding in het gewricht of aan een rol voor de anti-CarP positieve B cellen. Daarnaast worden suggesties gedaan voor het verdere onderzoek naar anti-CarP antilichamen. Vanuit een klinisch perspectief is het belangrijk om meer onderzoek te doen naar anti-CarP antilichamen in relatie tot het voorspellen van RA, bijvoorbeeld met grote prospectieve studies. Daarnaast zijn er nog vele onbekende factoren met betrekking tot de ontwikkeling, functie en rol van anti-CarP antilichamen. Het zal erg ingewikkeld zijn om dit verder uit te zoeken, maar dit kan wel belangrijke informatie opleveren over de ontwikkeling en mogelijke behandeling van RA.