



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Tolerance and immune regulation in rheumatoid arthritis**

Dekkers, J.S.

### **Citation**

Dekkers, J. S. (2019, October 1). *Tolerance and immune regulation in rheumatoid arthritis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/78949>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/78949>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/78949> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Dekkers, J.S.

**Title:** Tolerance and immune regulation in rheumatoid arthritis

**Issue Date:** 2019-10-01

# Chapter 10

**Nederlandse Samenvatting**

Reumatoïde artritis (RA) is een chronische, systemische, auto-immuunziekte die wordt gekenmerkt door een chronische ontsteking van de synoviale gewrichten en de aanwezigheid van auto-antistoffen in het bloed. Belangrijk voor de klinische praktijk zijn anti-gecitrullineerde eiwit antilichamen (ACPA) en reuma factor (RF). Deze twee antilichamen zijn een onderdeel van de 2010 American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism classificatiecriteria voor RA. ACPA binden aan eiwitten die een post-translationele modificatie hebben ondergaan. Citrullinatie is een chemische verandering waardoor het aminozuur arginine wordt omgezet in citrulline. Deze chemische verandering wordt gekatalyseerd door de zogenaamde peptidylarginine-de-iminase (PAD) enzymen. RF herkent het Fc gedeelte van IgG, een onderdeel betrokken bij complement activatie. Zowel ACPA als RF zijn diagnostische markers voor RA en de aanwezigheid van deze markers is voorspellend voor het ontwikkelen van RA. ACPA en RF kunnen lange tijd aanwezig zijn in het bloed van patiënten, zelfs jaren voordat symptomen ontstaan en RA zich klinisch manifesteert. De aanwezigheid van ACPA verhoogt bij patiënten met gewrichtsklachten de kans op de ontwikkeling van RA aanzienlijk, terwijl bij gediagnosticeerde RA patiënten de aanwezigheid van deze auto-antistoffen een meer agressief karakter van de ziekte voorspelt.

Naast ACPA zijn er recent ook andere RA-specifieke auto-antistoffen ontdekt die gericht zijn tegen post-translationeel gemodificeerde eiwitten. Deze antistoffen worden collectief beschreven als anti-gemodificeerde eiwit antistoffen (AMPA). AMPA kunnen naast citrulline ook gericht zijn tegen andere eiwit modificaties als homocitrulline en acetylysine. De aanwezigheid van verschillende AMPA in RA suggereert een gezamenlijke biologische oorsprong. Net als citrullinatie zijn carbamylatie en acetyllatie post-translationele modificaties die onder normale omstandigheden voorkomen. Desondanks vormt slechts in een deel van de mensen, en met name RA patiënten, auto-antistoffen tegen eiwitten met deze modificaties. Het is dus van essentieel belang om te begrijpen waarom mensen antistoffen ontwikkelen die gericht zijn tegen dergelijke eiwitmodificaties die onder normale condities ook plaatsvinden.

Carbamylatie is een posttranslationele modificatie waarbij lysines worden gemodificeerd in homocitrullines onder invloed van cyanaat. De moleculaire structuur van homocitrulline lijkt veel op die van citrulline en is slechts één methyleen groep langer dan citrulline. Antistoffen gericht tegen gecarbamyleerde eiwitten worden beschreven als anti-gecarbamyleerde eiwit antilichamen (anti-CarP). Anti-CarP antistoffen komen voor bij circa 45% van de patiënten met een vroege vorm van RA. Daarnaast kunnen deze antistoffen ook gevonden worden bij proefdiermodellen met artritis. Kort geleden zijn antistoffen tegen acetylysine geïdentificeerd als RA-specifieke AMPA. Deze antistoffen zijn aantoonbaar in het bloed bij 40% van de RA patiënten, met name in de ACPA positieve groep.

Het doel van dit proefschrift was om de onderliggende immunoregulatie en doorbreking van tolerantie tegen gemodificeerde eiwitten in RA te ontrafelen. AMPA zijn kenmerkend voor RA en worden verondersteld een rol te spelen in de onderliggende pathogenese.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we gebaseerd op verschillende studies dat auto-immuniteit tegen gecitrullineerde eiwitten al reeds in een preklinische fase van RA aanwezig is. Daarnaast laten de studies zien dat de ACPA respons zich verder ontwikkelt over tijd en dat adequate behandeling van artritis kan leiden tot een andere samenstelling van ACPA of lagere titers. Auto-immuniteit kan ontstaan als gevolg van falen of doorbreken van mechanismen die aan de basis liggen van zelf tolerantie van B-cellen, T-cellen of beide.

**Hoofdstuk 3** beschrijft het onderzoek naar het doorbreken van B-cel tolerantie. Blootstelling van proefdieren aan gecarbamyleerde eiwitten leidde tot de productie van anti-CarP antistoffen in het bloed. Daarnaast vonden we dat deze geïnduceerde anti-CarP antistoffen kruisreactief waren tegen andere gecarbamyleerde eiwitten, waarmee we auto-immuniteit aantoonde. Deze observatie laat zien dat het doorbreken van zelf tolerantie van B cellen door gemodificeerde lichaamsvreemde antigenen kan leiden tot kruisreactieve antilichamen tegen gemodificeerde lichaamseigen eiwitten. Voor de volledige activatie en differentiatie van rijpe B cellen zijn twee signalen nodig (1) interactie van oppervlakte-immunglobuline op de B cel met het antigen en (2) co-stimulatie door middel van CD40L-CD40-interactie en cytokine productie door antigeen specifieke CD4+ T helper cellen. In **hoofdstuk 4** hebben we verder onderzoek gedaan naar het doorbreken van T cel tolerantie voor gecarbamyleerde auto-antigenen. Muizen werden gevaccineerd met gecarbamyleerd muizen albumine en niet-gemodificeerd albumine. Na vaccinatie met gecarbamyleerd albumine konden wij antigeen specifieke T cellen aantonen gericht tegen carbamyleerd albumine. Deze observatie ondersteunt de hypothese dat post-translationele modificaties kunnen fungeren als een “hapteen” (een klein molecuul wat kan dienen als epitoom en niet zelf in staat is om een antistofrespons op te wekken) en op deze manier een bijdrage leveren aan het ontstaan van AMPA.

**Hoofdstuk 5** beschrijft het onderzoek naar de basis van AMPA reacties en AMPA producerende B cellen. Om antistoffen te kunnen detecteren gericht tegen geacetyeerde eiwitten hebben we een ELISA opzet gebaseerd op geacetyleerd ovalbumine en fibrinogeen. In deze studies onderzochten wij of blootstelling aan één soort post-translationele modificatie kan leiden tot de ontwikkeling van antistoffen gericht tegen andere modificaties. Na vaccinatie met gecarbamyleerde eiwitten konden wij in het bloed niet alleen anti-CarP antistoffen aantonen maar ook antistoffen gericht tegen geacetyeerde eiwitten. Vervolgens immuniseerden wij muizen met geacetyeerde eiwitten. Naast ACPA konden wij ook antilichamen aantonen gericht tegen andere PTM. Vervolgens vroegen wij ons af of gezuiverd ACPA naast citrulline reactiviteit ook reactief is tegen geacetyeerde en gecarbamyleerde eiwitten. Door antistoffen in het bloed van RA patiënten gezuiverd voor citrulline reactiviteit te isoleren en testen vonden wij dat deze antistoffen kruisreactief

kunnen zijn voor zowel acetyllysine als homocitrulline. Deze data geven aan dat in het serum van RA patiënten naast antilichamen die uniek reageren met ofwel gecitrullineerde eiwitten ofwel gecarbamyleerde eiwitten ook kruisreagerende populaties antistoffen aanwezig kunnen zijn. Vroege en agressieve interventie bij RA patiënten kan botschade voorkomen en vroege remissie induceren. De aanwezigheid van autoantistoffen kan een bruikbare biomarker zijn om patiënten te identificeren die van bepaalde behandelstrategieën wellicht meer baat hebben.

In de studies beschreven in **hoofdstuk 6** onderzochten we de associatie tussen auto-antistof status en het bereiken van vroege remissie bij recent gediagnosticeerde RA patiënten behandeld met methotrexaat. Voor ons onderzoek maakten wij gebruik van de internationale METEOR database wat bestaat uit data van verschillende reumatologische centra wereldwijd. Op basis van data van 1,826 RA patiënten concludeerden wij dat ongeacht de antistof status methotrexaat effectief is als inductie therapie.

**Hoofdstuk 7** beschrijft het onderzoek gericht op de preklinische fase van de ziekte en de mogelijkheid voor preventieve behandelstrategieën voor RA. Recent onderzoek heeft aangetoond dat indien de behandeling van reumatoïde artritis binnen 12 weken na het ontstaan van klachten wordt gestart patiënten minder gewrichtsschade ontwikkelen en een grotere kans hebben op het bereiken van remissie. Hierop vormden wij de hypothese dat vroege interventie het ontstaan van chronische inflammatie en gewrichtsschade kan voorkomen en het ontstaan van ziekte kan voorkomen. Omdat de ziektefasen van artritis in proefdiermodellen duidelijk te karakteriseren zijn, besloten we om dit als model te gebruiken voor onze onderzoeksvraag. Door middel van een meta-analyse concludeerden wij dat zowel profylactische als preklinische behandelstrategieën kunnen leiden tot significante reductie van ziekte ernst.

De pathogenese van parodontitis en RA vertonen veel overeenkomsten, parodontitis wordt gekarakteriseerd door gingivitis en chronische inflammatie van het bot. Parodontitis kent een hogere prevalentie bij patiënten met RA en omgekeerd heeft RA een hogere prevalentie bij patiënten met parodontitis. Recent onderzoek toonde een verband aan tussen ACPA en de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), een bacterie geassocieerd met parodontitis, en zijn lytische toxine (leutoxine A, Ltx-A) bij individuen met een genetische predispositie.

In **hoofdstuk 8** staan de studies beschreven naar de associatie tussen HLA-SE allelen en ACPA positieve RA wat eerder werd beschreven voor een anti-LtxA antistof positieve subset. Wij hebben hiervoor analyses uitgevoerd op 594 sera van patiënten uit het Leiden Early Arthritis Clinic (EAC) cohort, bestaande uit patiënten met alle vormen van vroege artritis zoals die in de polikliniek voorkomen. Op basis van deze sera konden wij concluderen dat de aanwezigheid van anti-LtxA antistoffen (als maat voor blootstelling aan Aa) niet specifiek is voor RA maar dat deze antistoffen ook voorkomen bij andere vormen van vroege artritis. Daarnaast vonden wij geen associatie tussen de aanwezigheid van ACPA of HLA SE allelen.

Ten slotte staat in **hoofdstuk 9** een samenvatting en discussie van alle onderzoeksresultaten beschreven en de mogelijkheden voor onderzoek in de toekomst.

### **Conclusies en toekomstperspectieven**

De laatste jaren is er binnen het veld van RA een verschuiving opgetreden richting de vroege identificatie en vroege behandeling met als doel om de chroniciteit en zelfs de ontwikkeling van RA te voorkomen. Biologische markers als AMPA zijn niet alleen waardevol voor vroege identificatie maar kunnen inzicht leveren in de onderliggende immuun-regulatie en pathogenese. De beschreven onderzoeken in dit proefschrift geven inzicht in de rol van gemodificeerde eiwitten en doorbreking van tolerantie tegen gemodificeerde eiwitten, aspecten die kenmerkend zijn voor RA. In dit proefschrift staat beschreven dat auto-immuniteit tegen gecarbamyleerde eiwitten kan ontstaan als gevolg van het doorbreken van mechanismen die aan de basis liggen van zelf tolerantie zowel van B-cellen als T-cellen. Onze resultaten laten ook zien dat blootstelling aan andere gemodificeerde eiwitten kan leiden tot de productie van kruisreactieve antistoffen gericht tegen structureel andere modificaties. De methodologische aspecten in dit proefschrift hebben een fundament gelegd voor uitgebreidere studies naar de rol van post-translationele modificaties en het voorkomen van AMPA in patiëntengroepen. Toekomstige studies met monoklonale AMPA zouden meer inzicht kunnen geven in de mate van kruisreactiviteit en de mechanismen die aan basis van auto-immuniteit en tolerantiedoorbreking liggen. Het testen van monoklonale AMPA in proefdiermodellen van artritis kan inzicht geven in de rol van AMPA in het ontstaan van inflammatie en de ontwikkeling van artritis.

Samengevat, post-translationele modificaties en auto-antistoffen is een fascinerend en complex systeem. Toekomstige studies zullen gericht zijn om de “pathologische capaciteit” van de AMPA in kaart te brengen en de consequenties van de aanwezigheid van deze auto-antistoffen op het ziekteverloop van RA te achterhalen.

