



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The Anti-Citrullinated Protein Antibody immune response and its effector functions in Rheumatoid Arthritis

Kempers, A.C.

Citation

Kempers, A. C. (2020, January 30). *The Anti-Citrullinated Protein Antibody immune response and its effector functions in Rheumatoid Arthritis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/83485>

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/1887/83485>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/83485> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kempers, A.C.

Title: The Anti-Citrullinated Protein Antibody immune response and its effector functions in Rheumatoid Arthritis

Issue Date: 2020-01-30

Y

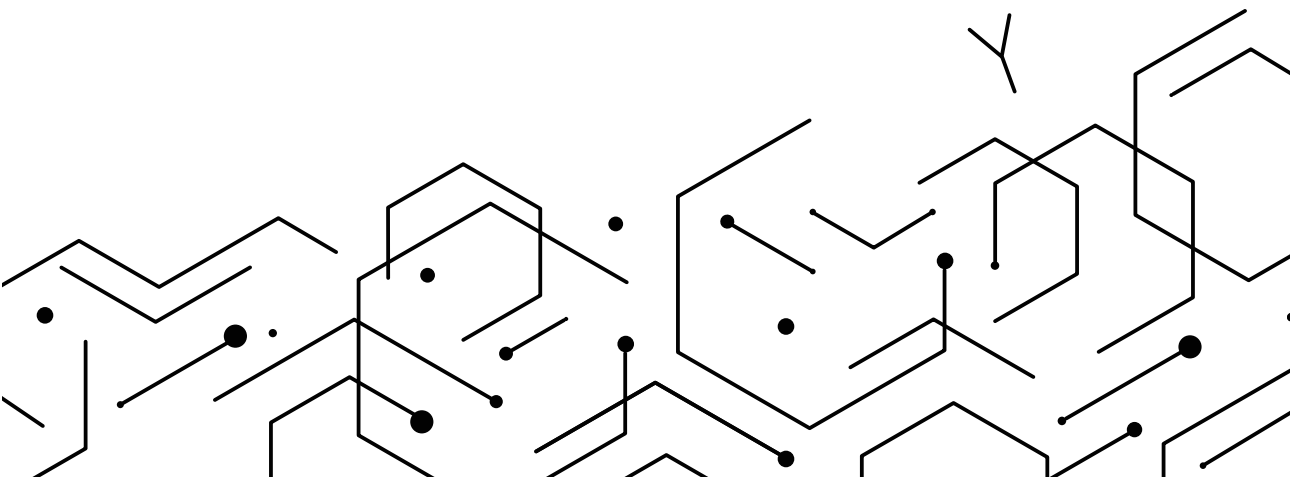
Y

CHAPTER 8

Nederlandse samenvatting

Y

Y



Reumatoïde artritis (RA) is een chronische auto-immuunziekte gekenmerkt door ernstige gewrichtsontstekingen. Dit kan leiden tot schade aan het kraakbeen en bot. Alhoewel er tegenwoordig medicijnen bestaan die de ontsteking kunnen verminderen of terugdringen, is er nog geen therapie die reumatoïde artritis kan voorkomen of genezen. Het is daarom van belang om een beter inzicht te krijgen in het ontstaan en de ontwikkeling van de immuunrespons in RA.

In een gezonde toestand biedt het immuunsysteem bescherming tegen pathogenen onder andere door het produceren van antilichamen door B cellen. In het geval van RA is deze respons niet gericht tegen pathogenen maar tegen lichaamseigen eiwitten waardoor er een zogenoemde auto-immuun reactie ontstaat. Ongeveer 50-80% van de RA patiënten heeft één of meerdere types autoantilichamen gericht tegen verschillende lichaamseigen eiwitten, waaronder ook post-translationeel gemodificeerde eiwitten zoals ACPA (anti-citrullinated proteïne antilichamen). Deze ACPA herkennen eiwitten die gecitrullineerd zijn vanuit een proces waarin een positief geladen aminozuur arginine door enzymen omgezet wordt naar een neutrale citrulline. Belangrijk is dat ACPA zeer specifiek zijn voor RA en sterk geassocieerd worden met de intensiteit van artritis. Mensen met ACPA en beginnende gewrichtsklachten (artralgie) hebben een verhoogde kans op het ontwikkelen van RA. ACPA positieve RA patiënten hebben vaak een ernstige ziektebeloop met veel gewrichtsschade en een lagere kans op remissie dan ACPA negatieve RA patiënten. Ook hebben verschillende studies aangetoond dat de ACPA respons verschilt van gebruikelijke antilichaam responsen (zoals bijvoorbeeld bij een anti- vaccin respons) wat zich uit in een opvallend lage aviditeit van ACPA, in het gebrek van aviditeit rijping, veranderende suikerstructuren (glycosylering) in het constante gedeelte van het antilichaam en uitgebreide glycosylering in het variabele gedeelte van het antilichaam. Daarnaast bevorderen ACPA verschillende biologische effector functies *in vitro* welke geassocieerd worden met het induceren van ontstekingsprocessen *in vivo*. Deze observaties hebben geleid naar een aanname dat de immuunrespons tegen gecitrullineerde antilichamen een cruciale rol zou kunnen spelen in de pathofysiologie van RA. Echter is het nog niet bekend hoe de ACPA respons ontstaat en hoe ACPA exact bijdragen aan ziekteontwikkeling. Met de studies beschreven in dit proefschrift hebben wij als doel meer inzicht te krijgen in de herkomst en functie van ACPA, ACPA glycosylering en B cellen in de pathogenese van RA.

Recentelijk is een twee-staps model beschreven voor de ontwikkeling van ACPA-positieve RA. Hierin wordt gesuggereerd dat de immunologische tolerantie tegen gecitrullineerde eiwitten allereerst verbroken wordt door bijvoorbeeld omgevings- en genetische factoren zoals roken en HLA-DR genen. Het doorbreken van deze tolerantie kan bijvoorbeeld

veroorzaakt worden door een identieke aminozuur sequentie in deze HLA-DR genen, genaamd de 'shared epitope'. De hypothese is dat dit epitoom een voorkeur heeft voor neutraal geladen gecitrullineerde antigenen en zodoende kan leiden tot de productie van ACPA. Hierna kan het nog jaren duren voordat er klinische symptomen ontstaan en zich RA ontwikkelt (asymptomatische fase). Na een bepaalde, nog onbekende, tweede/additionele trigger kunnen de B cellen specifiek voor gecitrullineerde antigenen, hulp ontvangen van T-cellen wat zorgt voor de maturatie en verbreding van de initiële ACPA respons. Hierdoor kan er een ontstekingsgerichte auto-immuun respons ontstaan die sterk geassocieerd wordt met het ontstaan van artritis.

In zowel de asymptomatische initiatie fase als in ontwikkelde ziekte, is het grotendeels onbekend hoe en waar B cellen die ACPA tot expressie brengen, worden gegenereerd en onderhouden. Uit eerdere bevindingen is het bekend dat er zich circulerende antilichaamproducerende B cellen, zogenoemde plasmablasten en plasma cellen, bevinden in het bloed van ACPA positieve RA patiënten. Wanneer deze plasmablasten en plasma cellen *ex vivo* gekweekt worden zijn zij in staat om spontaan ACPA te produceren zonder dat hierbij extra stimulaties voor nodig zijn. Daarnaast zijn er bevindingen gedaan dat ACPA-IgM op een overvloedig niveau aanwezig is in het synoviale vocht, de plaats van de ontsteking. Dit duidt op een actieve immuun respons tegen gecitrullineerde antigenen in RA. Om plasmablasten en plasma cellen die zich op de plaats van ontsteking bevinden te karakteriseren en om te onderzoeken of het synoviale compartiment een overlevingsomgeving kan bieden, bestuderen we B cellen vanuit het synoviale vocht van RA patiënten. In **hoofdstuk 2** laten we zien dat het synoviale vocht een hogere frequentie cellen bevat die spontaan ACPA-IgG produceren ondanks dat de gemiddelde B cel aantallen minder zijn dan in bloed. Wanneer de totale synoviale cel populatie zonder stimulatie gekweekt werd, bleef de spontane ACPA-IgG productie opvallend stabiel gedurende een langere periode in de tijd, soms wel tot zes maanden, vergeleken met cellen vanuit het bloed. Dit toont aan dat het synoviale compartiment een niche kan vormen waarin een omgeving wordt gecreëerd die de overleving van ACPA B cellen verlengt en daardoor de blijvende productie van ACPA ondersteunt. Deze bevindingen zijn belangrijk omdat het laat zien dat het synoviale vocht actief bijdraagt aan een continue ACPA B cel immuunrespons die chronische synoviale ontsteking kan bevorderen.

Het moment waarop klinische RA plaatsvindt gaat gepaard met de verbreding van de ACPA immuun respons. Deze maturatie van ACPA in serum titer, isotypes en antigeen herkenning is vermoedelijk gebaseerd op een T-cel afhankelijk proces, ook gezien het hoog aantal mutaties in het variabele gedeelte. Deze maturatie is merkwaardig te noemen aangezien de gemiddelde aviditeit van ACPA laag is. In een normale situatie overleven

alleen B cellen met de hoogste affiniteit voor hun antigeen het maturatie proces. Gezien deze lage aviditeit, is er een mogelijkheid dat ACPA een ander overlevingssignaal hebben waardoor zij toch geselecteerd worden voor verdere maturatie. Recentelijk is aangetoond dat het variabele gedeelte van ACPA een grote hoeveelheid suikerstructuren, Fab glycanen, bevat. Deze glycanen kunnen worden geïntroduceerd in een selectief proces gedurende de maturatie van antilichamen. Om te bepalen of Fab glycanen een rol kunnen spelen in het T-cel afhankelijk proces gedurende de ontwikkeling van de ACPA-specifieke B cel responsen, onderzoeken we in **hoofdstuk 3** welke van de ACPA deze Fab glycanen dragen. Hierbij hypothetiseren we dat ACPA-IgM geen additionele Fab glycanen zou bevatten aangezien glycanen voornamelijk worden geïntroduceerd middels mutaties in het variabele gedeelte gedurende het maturatie proces naar IgG. Er waren inderdaad geen aanwijzingen voor Fab glycanen op ACPA-IgM te vinden. Dit in tegenstelling tot ACPA-IgG die, met uitzondering van ACPA-IgG3, een duidelijke verschuiving in moleculair gewicht liet zien wat duidt op de aanwezigheid van glycanen. Deze resultaten wijzen erop dat Fab glycosylatie een specifieke eigenschap van ACPA-IgG in RA is. De introductie van glycanen in het variabele gedeelte van ACPA kan mogelijk bijdragen aan het verbreken van tolerantie checkpoints en aan de maturatie van gecitruillineerde antigeen specifieke B cellen in RA. Samen met andere bevindingen die aantonen dat glycanen in het variabele deel door een selectief proces worden geïntroduceerd en er een sterke HLA-associatie met ACPA-positieve RA is, bevestigt onze uitkomst daarmee de betrokkenheid van T-cel afhankelijke hulp in de maturatie van de ACPA respons.

Om vervolgens te bepalen hoe ACPA kunnen bijdragen aan RA pathogenese, richtten we ons op het IgG-Fc domein (het constante gedeelte) van ACPA in de maturatie fase van de ACPA respons. De stabiliteit en biologische activiteit van dit IgG-Fc domein wordt beïnvloed door *N*-glycosylatie structuren en is nauw betrokken bij verschillende biologische effector functies, waaronder de activatie van immuun cellen via Fc gamma receptoren (FcγR). IgG glycanen zijn zeer dynamisch en kunnen, afhankelijk van fysiologische en pathologische condities, uit verschillende suikerstructuren bestaan. In RA hebben ACPA-IgG een ander Fc-glycosylatie patroon dat gekarakteriseerd wordt door een lage galactosylering en sialylering vergeleken met IgG vanuit het serum. Dit effect is sterker bij ACPA-IgG op de plek van de ontsteking, waarvoor synoviaal vocht als proxy kan dienen. Terwijl het nog bepaald moet worden of en hoe dit afwijkende Fc glycosylatie patroon exact invloed heeft op de biologische effector functies van ACPA, hebben recentelijke muizenstudies wel aangetoond dat zulke Fc-glycosylatie veranderingen inderdaad het ontstaan van artritis kunnen induceren. In **hoofdstuk 4, 5 en 6** worden studies beschreven die zich richten op de biologische effector functies van ACPA in

relatie tot hun Fc glycaan compositie en onderzoeken we of een ontstekingsomgeving de Fc glycosylatie patronen van antilichamen kunnen beïnvloeden.

In ACPA-positieve RA worden ACPA in overvloed uitgescheiden als IgG moleculen en er wordt aangenomen dat deze immunocomplexen vormen die een interactie kunnen aangaan met immuun cellen. In deze context zijn FcγR gemedieerde effector mechanismen waarschijnlijk het meest relevant in synoviale ontsteking. FcγR zijn signaleringreceptoren die in verschillende combinaties en hoeveelheden op immuun cellen te vinden zijn. Deze immunoreceptoren, in de vorm van activerende receptoren FcγRI, FcγRIIA/C and FcγRIIIA en de inhiberende receptor FcγRIIb, herkennen de Fc staart van IgG antilichamen en kunnen een variatie van cellulaire effector activiteiten induceren aangezien cellen die FcγR tot expressie brengen verschillende biologische functies hebben. Om mogelijke effector mechanismen van ACPA-IgG te identificeren, analyseren we in **hoofdstuk 4** de binding van ACPA-IgG aan individuele FcγR. Hierbij maken we gebruik van een gestandaardiseerd *in vitro* systeem van CHO cellijnen die getransfecteerd zijn met een enkele FcγR en van gegeneerde ACPA immunocomplexen (IC). Onze bevindingen laten zien dat ACPA-IgG IC voornamelijk aan FcγRI binden. Wanneer we deze binding met blokkerende antilichamen bestuderen bij neutrofielen, een celtipe met een hoge FcγRI expressie na IFN-γ stimulatie en die veel voorkomt in RA, blijkt dat ongeveer 30% van de neutrofiel binding met ACPA IgG IC gemedieerd was door FcγRI. Dit suggereert een rol voor FcγRI op geactiveerde neutrofielen als relevante receptor voor ACPA-IC in de context van synoviale ontsteking, in aanvulling op de al bekende ACPA effector functies die gemedieerd worden via FcγRIIA. Gezien de enorme aanwezigheid van geactiveerde neutrofielen die FcγRI tot expressie brengen in het synoviale vocht van RA patiënten en de overvloedige aanwezigheid van ACPA-IgG IC in het synoviale vocht, is het aannemelijk dat FcγRI activatie van neutrofielen door ACPA-IC belangrijk is in RA. Deze bevindingen bieden een aanvullend argument voor een potentieel pathogene rol van ACPA-IgG in de synoviale ontsteking in RA.

De afwijkende expressie van glycanen in de Fc regio van ACPA kan ook de interactie met andere eiwitten beïnvloeden. In deze context beschrijft **hoofdstuk 5** studies die de interactie tussen ACPA-IgG en IgM reumafactoren (RF) onderzoeken. ACPA en IgM-RF worden vaak samen gevonden in de ziekteontwikkeling binnen RA. Er wordt gedacht dat IgM-RF een voorkeur heeft voor binding aan IgG moleculen met lage Fc galactosylatie levels, zoals bijvoorbeeld ACPA-IgG. Dit gaf aanleiding tot de vraag of RF een voorkeur heeft voor binding aan ACPA-IgG dan voor niet-citrulline specifiek IgG. In tegenstelling tot wat we verwachtten, heeft IgM-RF geen voorkeur voor binding aan ACPA-IgG of IgG met lage Fc galactosylatie boven gegalactosyleerd IgG. Dit geeft aan dat potentiële

conformatie veranderingen door de aanwezigheid van Fc-galactose geen invloed heeft op de RF binding en suggereert dat ACPA-IgG geen betere doelwitten zijn voor RF dan niet-citrulline specifiek IgG.

Ondanks dat de afwijkende Fc glycosylatie van ACPA-IgG geen effect op de RF binding heeft, blijft het opvallend dat het ACPA Fc glycosylatie patroon een meer ontstekingsgericht profiel ontwikkelt, ongeveer 3 maanden voor de diagnose van RA. Deze afwijkende Fc glycosylatie van ACPA-IgG blijkt verdere onderliggende gebeurtenissen te veroorzaken die zouden kunnen leiden tot het ontstaan van artritis, zoals recentelijk aangetoond met een muismodel. Als Fc glycosylatie een zo belangrijke factor is in het ontstaan van RA dan zou modulatie van de IgG Fc glycosylatie een van de mogelijke oplossingen kunnen zijn om ziekte verergering te voorkomen. **Hoofdstuk 6** beschrijft studies waarbij wordt gekeken naar de invloed van omgevingsfactoren die relevant zijn voor de ontwikkeling en/of maturatie van B en plasma cellen, zoals IL-10, op de Fc glycosylatie van IgG antilichamen. Na isolatie van antilichaam-uitscheidende B cellen (ASC) bestaande uit ontwikkelde plasmablasten en plasma cellen, en CD19-positieve cellen in afwezigheid van ASC vanuit tonsillen, kweekten we deze cellen in de aan- of afwezigheid van IL-10. Vanuit de supernatanten analyseerden wij de uitgescheiden IgG1 voor Fc glycosylatie. Bij de stimulatie van ASC met IL-10 observeerden wij lagere galactosylatie en sialylatie levels van IgG1 dan zonder IL-10 stimulatie. Opvallend was dat bij de IL-10 stimulatie van CD19-positieve cellen wij het tegenovergestelde effect zagen en hogere levels van galactosylatie en sialylatie waarnamen. Dit suggereert dat het modulerende effect van IL-10 afhankelijk is van de differentiatie status waarin de B cel zich bevindt. Belangrijk is dat deze data ook laten zien dat de Fc glycosylatie patronen van IgG1, geproduceerd door plasmablasten en plasma cellen, nog steeds gemodificeerd kunnen worden door micro-omgevingsfactoren, ondanks hun status als ver gedifferentieerde cellen. Deze micro-omgevingsfactoren kunnen mogelijk ook dezelfde factoren zijn die de ACPA-B cel respons in het synoviale compartiment in stand houden, zoals beschreven in **hoofdstuk 2**. Op deze manier kan de ACPA-Fc glycosylatie beïnvloedt worden door de synoviale omgeving die de blijvende productie van ACPA-IgG ondersteunt en die kan resulteren in een ontstekingsbevorderende fenotype van Fc glycanen. Plasma cellen die autoantilichamen uitscheiden zijn uitermate resistent tegen therapieën en zijn daarom moeilijk te behandelen. Deze studies tonen aan dat modulatie van IgG Fc glycanen door micro-omgevingsfactoren een mogelijkheid kan bieden tot interventie met de pathogenese van deze autoantilichamen.

Samenvattend benadrukt dit proefschrift het belang van de relatie tussen ACPA, ACPA glycosylatie en B cellen in RA, en geven we meerdere argumenten voor de contributie

van ACPA in de chronische ontsteking binnen RA. We laten zien dat ACPA glycosylatie en de omgeving waarin ACPA zich ontwikkelen een belangrijke rol spelen in het persisteren en de verdere ontwikkeling van de ACPA respons, de overleving van gecitrullineerde antigeen-gerichte B cellen en uiteindelijk in de maturatie van zowel ACPA als de ACPA immuun respons die daarmee actief bijdraagt aan het ontstekingsproces in RA.