



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Complement biology in health and disease

Lubbers, R.

### Citation

Lubbers, R. (2021, January 21). *Complement biology in health and disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/139216>

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/1887/139216>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/139216> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Lubbers, R.

**Title:** Complement biology in health and disease

**Issue Date:** 2021-01-21



# **ADDENDUM**

**NEDERLANDSE SAMENVATTING**

**CURRICULUM VITAE**

**LIST OF PUBLICATIONS**

**ACKNOWLEDGEMENTS**



## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het complementsysteem is een integraal onderdeel van het immuunsysteem en draagt bij aan weefselhomeostase. Het complementsysteem werd lange tijd gezien als een eenvoudige proteolytische cascade van eiwitten om binnendringende pathogenen te bestrijden, maar het complementsysteem is veel complexer gebleken en onze kennis en begrip van het complementsysteem breidt zich nog steeds uit. Dit proefschrift rapporteert over de lokale complementproductie en de mogelijke betekenis van complementeiwitten buiten de traditionele activiteiten van het complement systeem. Hierbij richten de studies in dit proefschrift zich op C1q bij auto-immuniteit en tuberculose (TB), alsmede op de biologie van intracellulair C3.

### **Complementcomponent C1q wordt lokaal geproduceerd door geïsoleerde articulaire chondrocyten**

Ontstekingen en immuunreacties van het aangeboren immuunsysteem kunnen bijdragen aan de ontwikkeling en progressie van artrose (OA). Chondrocyten zijn het enige celtype in gewrichtskraakbeen en produceren extracellulaire matrixmoleculen. Hoe inflammatoire mediators chondrocyten bereiken, is nog niet geheel bekend. Eerdere studies hebben aangetoond dat chondrocyten mRNA tot expressie brengen dat voor complement-eiwitten zoals C1q codeert, wat duidt op lokale eiwitproductie. De C1q eiwitproductie was nog niet overtuigend aangetoond. **Hoofdstuk 2** beschrijft de analyses van de chondrocyten uit kraakbeen, die werden geïsoleerd van patiënten die een totale knie vervanging ondergingen vanwege artrose. De geïsoleerde chondrocyten waren in staat om C1q *ex vivo* te produceren en uit te scheiden, en waren ook in staat om C1q *ex vivo* te binden. Omdat chondrocyten C1q konden uitscheiden en binden, is onderzocht of incubatie *in vitro* met C1q de RNA-expressie van verschillende complement- en collageengenen zou kunnen beïnvloeden. In een kleinschalig proefopzet hebben we aangetoond dat incubatie met 100 µg / ml C1q gedurende 24 uur de expressie van *MMP13* en de *COLL2:COLL10* verhouding negatief beïnvloedde. Daarom concluderen we dat C1q eiwit tot expressie kan worden gebracht en uitgescheiden door menselijke articulaire chondrocyten en dat C1q kan binden aan chondrocyten die de relatieve collageenexpressie beïnvloeden.

### **Complement C3-splitsing door Cathepsin-L leidt tot vorming van C3a-desArg en is niet essentieel voor overleving van een HAP-1-cel lijn**

Er is recent een nieuwe intracellulaire rol beschreven voor complementeiwit C3 aanwezig in CD4+ T-cellen. Intracellulair C3 kan worden gesplitst door Cathepsin-L (CTSL), resulterend in signalering door C3a via de intracellulaire C3aR. Er werd verondersteld dat deze intracellulaire C3-route cruciaal is voor de overleving van CD4+ T-cellen. De studies beschreven in **Hoofdstuk 3** verkenden de aanwezigheid van het C3 eiwit in cellysaten, de CTSL-splitsingsplaats in C3 en de overleving van C3-deficiënte cellen. We konden C3 niet detecteren in cellysaten zonder dat de cellen eerst C3

hadden opgenomen na incubatie met NHS voorafgaand aan lysis. De analyse van C3-splitsing door CTSL *in vitro* door massaspectrometrie gaf aan dat de C3-splitsing door CTSL resulteert in de vorming van C3ades-Arg, aangezien het arginine nog steeds was gehecht aan het N-uiteinde van het C3b-molecuul. Dit is een interessante bevinding, aangezien uit eerder onderzoek was gebleken dat intracellulair C3 na CTSL knip via C3a de C3aR zou activeren. C3ades-Arg kan de C3aR echter niet binden, wat aangeeft dat de veronderstelde intracellulaire route niet zou kunnen voorkomen. Daarnaast genereerden we een C3-deficiënte HAP-1-cellijn met behulp van CRISPR/Cas9. Er werden geen verschillen waargenomen met betrekking tot proliferatie, morfologie en metabolisme tussen de wildtype en C3-deficiënte HAP-1-cellijnen. Samengevat, onze proeven laten zien dat de verwerking van C3 door CTSL waarschijnlijk C3a-desArg genereert en niet C3a, en verder dat C3 of de afgeleide producten niet essentieel zijn voor de overleving van een cel in een HAP-1 cellijnmodel.

### **Complement component C1q als serum biomarker om actieve tuberculose te detecteren**

Tuberculose (TB) is een grote wereldwijde bedreiging voor de gezondheid, welke wordt veroorzaakt door infectie met *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). De diagnose van actieve TB wordt bemoeilijkt door het ontbreken van specifieke biomarkers die actieve TB ziekte onderscheiden van andere (long) ziekten of latente TB-infectie. Vroege diagnose en behandeling van TB is belangrijk om de overdracht van de infectie te verminderen en sterfte door ziekte te voorkomen. Onlangs zijn complement componenten naar voren gekomen als kandidaat-biomarker voor actieve TB. Op basis van geïntegreerde resultaten van humane genexpressie uit de literatuur, werden verhoogde niveaus gevonden van RNA-moleculen die coderen voor de verschillende C1q-ketens en *SERPING1* (coderend voor de C1-esterase-remmer (C1-INH)) bij actieve TB. Daarom hebben we de eiwitniveaus voor C1q (**hoofdstuk 4**) en C1-INH (**hoofdstuk 5**) geanalyseerd. In de studies beschreven in **Hoofdstuk 4** hebben we C1q eiwitniveaus gemeten in vier geografisch verschillende TB-cohorten uit Italië, Gambia, Korea en Zuid-Afrika. De C1q serumconcentraties waren verhoogd bij patiënten met actieve TB in vergelijking met alle relevante controlepopulaties. Belangrijk is dat longitudinale follow-up van TB patiënten tijdens de behandeling aan het licht bracht dat de C1q serumconcentraties normaliseerden naar die van endemische controles. Dit geeft aan dat de verhoging van C1q geassocieerd was met ziekte en niet intrinsiek was voor de individuen. Om het potentieel van C1q als biomarker voor actieve TB verder te evalueren, werden de C1q serumconcentraties van patiënten met actieve TB ziekte vergeleken met die van patiënten met aandoeningen waarvoor differentiële diagnoses in de klinische praktijk moeilijk te stellen zijn. Patiënten met actieve TB vertoonden significant hogere circulerende C1q serumconcentraties in vergelijking met patiënten met sarcoïdose of patiënten met longontsteking. Evenzo werden hogere C1q serumconcentraties gevonden bij patiënten met actieve TB in vergelijking met patiënten met lepra, die werden geanalyseerd als aanvullende controle. De verhoging van C1q



is dus waarschijnlijk geen weerspiegeling van een algemene respons op ontsteking. Bovendien werd C1q eiwit lokaal aangetroffen op een verhoogd niveau in de longen van TB patiënten (n=3) in vergelijking met controles. In analogie met humane TB werd C1q ook gevalideerd als biomarker voor TB ziekte bij resusapen, zowel in serum als in bronchoalveolaire lavage (BAL). Verhoogde C1q concentraties werden alleen waargenomen bij dieren waar er sprake was van progressie naar actieve ziekte en niet bij de dieren die de infectie onder controle hadden. Samengevat waren de C1q serumconcentraties verhoogd bij patiënten met actieve TB in vergelijking met latente TB in vier onafhankelijke cohorten. Daarom stellen we voor dat de toevoeging van C1q metingen aan huidige biomarkerpanels een meerwaarde kan bieden bij de diagnose van actieve TB.

### **Analyse van de endogene complementregelaar C1-remmer, het product van *SERP-ING1*, bij actieve tuberculose**

We rapporteerden al in **Hoofdstuk 4** dat verhoogde C1q concentraties gebruikt kunnen worden als serum biomarker die actieve TB kan onderscheiden van latente TB en niet-TB-longinfecties of sarcoïdose. In serum vormt C1q een complex met C1r en C1s om het volledige C1-molecuul te genereren dat de klassieke route van het complementsysteem kan activeren. Belangrijk is dat het C1-complex wordt gereguleerd door een natuurlijke remmer, namelijk C1-INH. Transcriptionele biomarkersignaturen hebben aangegeven dat expressie van *SERPING1*, dat codeert voor de remmer C1-INH, onderscheid maakt tussen actieve en latente TB. De studies beschreven in **Hoofdstuk 5** waren gericht op het bepalen van serumniveaus van *SERPING1* gecodeerde C1-INH in vier geografisch diverse cohorten van patiënten met actieve TB, latente TB, ziektecontroles en patiënten die succesvol zijn behandeld voor TB. Het doel van deze studies was om een mogelijke toepassing als biomarker voor actieve TB te onderzoeken. De C1-INH-serumconcentraties waren significant verhoogd bij actieve TB patiënten in vergelijking met endemische controles in twee van de vier geanalyseerde cohorten. Bovendien nam in het Gambiaanse cohort met actieve TB-patiënten die in de loop van de tijd werden gevolgd, de verhoogde C1-INH serumconcentraties snel af bij het starten van de TB-behandeling. Het is interessant dat *SERPING1*-expressie consistent verhoogd is bij patiënten met actieve TB, terwijl het eiwitproduct C1-INH in slechts de helft van de cohorten blijkt te zijn verhoogd die in deze studie zijn geanalyseerd. Het is onduidelijk waarom C1-INH-verhoging werd waargenomen in slechts twee van de vier cohorten. Over het algemeen was C1q bij vergelijking van het C1q- en C1-INH-eiwitniveau in de verschillende geanalyseerde populaties uniform verhoogd in TB-cohorten, terwijl C1-INH in twee van de vier TB-cohorten de serumconcentratie was verhoogd. De observatie dat verhoogde C1-INH-serumconcentraties alleen werden gedetecteerd in cohorten van patiënten met actieve TB (maar niet bij patiënten met vergelijkbare klinische aandoeningen), en de observatie dat C1-INH snel afnam tijdens TB-behandeling, suggereert dat *Mtb* deze complementeiwitten actief reguleert. Een toename in C1q en C1-INH zou daarom een immuun-ontsnappingsmechanisme van *Mtb*

kunnen vertegenwoordigen dat immunosuppressieve acties van C1q mogelijk maakt, zonder de klassieke route van het complement systeem te versterken.

### **C1q concentraties in de circulatie en in de long als biomarker van progressieve ziekte bij experimentele niet-menselijke tuberculose bij primaten**

Voor het bestuderen van pathogeen-gastheerinteracties en preklinische evaluatie van vaccinkandidaten, word veel gebruik gemaakt van *Mtb*-infectiemodellen in niet-menselijke primaten (NHP). NHP, en met name makaken (*Macaca spp*), worden beschouwd als relevante modellen voor TB, vanwege hun nauwe fylogenetische verwantschap met de mens, genetische diversiteit en de grote gelijkenis in de pathogenese van TB. Makaken worden ingezet over het hele spectrum van TB-onderzoek, zowel bij de preklinische evaluatie van TB-vaccins en -therapieën als bij fundamenteel onderzoek naar de ontwikkeling van TB-ziekten. Proefdieronderzoek bij deze soorten heeft het voordeel dat ze gecontroleerde en nauwkeurige tijd-responscondities hebben met betrekking tot infectie. Afhankelijk van de makaka (onder)soort, de *Mtb*-stam en de blootstellingsdosis, bootst de manifestatie van tuberculose bij makaken de diversiteit na die bij mensen wordt waargenomen. Na het aantonen, gepresenteerd in **Hoofdstuk 4**, dat C1q verhoogd was na een hoge dosis TB-blootstelling in NHP, hebben we de diversiteit in TB-ziekteverschijnselen in NHP's benut om de dynamiek van C1q als een biomarker van TB-ziekte in meer detail te onderzoeken. De resultaten van deze studies worden gepresenteerd in **Hoofdstuk 6**. We hebben de systemische en pulmonale C1q-niveaus na experimentele infectie beoordeeld met een hoge of lage enkele dosis en met herhaalde limietdoses *Mtb*-blootstellingen van makaken. We laten zien dat toenemende C1q-niveaus, hetzij perifeer of lokaal, correleren met verhoogde tuberculose-pathologie en met verminderde overleving na blootstellingen met hoge of lage dosis *Mtb* bij verschillende makaken. Verhoging van C1q ging niet vooraf aan detectie van *Mtb*-infectie door een conventionele interferon-gamma-afgiftetest, wat de associatie met ziekteprogressie bevestigt, maar niet met TB-infectie als zodanig. Ten slotte, laten we zien dat pulmonale vaccinatie met Bacillus Calmette Guérin (BCG) ook resulteert in een tijdelijke toename van pulmonale C1q. Of deze lokale C1q-productie een rol speelt bij de bescherming tegen *Mtb*-infectie en ziekte, moet echter nog worden onderzocht. Onze waarnemingen bevestigen en ondersteunen C1q als een marker van progressieve TB-ziekte. Aangezien C1q gemakkelijk kan worden gemeten tijdens het verloop van *Mtb*-infectie, kan het daarom worden toegepast om de voortgang van de TB-ziekte te volgen in een omgeving met beperkte middelen.

### **Complexe medische geschiedenis van een lupus patiënt met een samengestelde heterozygote mutatie in C1QC**

Genetische deficiëntie, veroorzaakt door homozygote mutaties in een van de C1q-genen, zijn zeldzaam en hangen sterk samen met de ontwikkeling van Systemische Lupus Erythematosus (SLE). C1q-deficiëntie is een zeldzame aandoening met iets meer dan 70 gedocumenteerde gevallen uit ten minste 45 verschillende families. Deze deficiënties





zijn allemaal het gevolg van homozygote mutaties in een van de drie C1q-genen, behalve in één geval met een samengestelde heterozygote mutatie in *C1QA*. Patiënten met C1q-deficiëntie hebben verschillende klinische presentaties en uitkomsten. De meest voorkomende diagnose is de diagnose van SLE bij vroege kinderjaren en terugkerende infecties. In **Hoofdstuk 7** beschrijven we een C1q-deficiënte patiënt met een samengestelde heterozygote mutatie in het *C1QC*-gen: c.100G> A p. (Gly34Arg); c.205C> T p. (Arg69X). De medische geschiedenis van deze patiënt was complex en omvatte verschillende infecties, SLE, cerebrale betrokkenheid, vaatproblemen en botlaesies. Deze patiënt werd gedurende meer dan tien jaar behandeld met vers ingevroren plasma (FFP). Hoewel de C1q-waarden en CP-activiteit relatief kortstondig waren, hielden de symptomatische verlichting en substantiële verbetering van de kwaliteit van leven na FFP-behandeling gedurende verschillende weken aan. In de loop van de tijd waren er ook verschillende bijwerkingen op de FFP-therapie. Ondanks deze bijwerkingen gaf de patiënte de voorkeur aan de FFP-therapie vanwege de vermindering van vermoeidheid, artralgie en het aantal infecties. Echter werd de FFP-behandeling uiteindelijk stopgezet vanwege een ernstige anafylactische reactie.

### **Carbamylatie vermindert de capaciteit van IgG voor hexamerisatie en complement activatie**

Post-translationele modificaties (PTM) van eiwitten na biosynthese komen veel voor in het menselijk lichaam en zijn belangrijk bij de regulering van activiteit, stabiliteit en vouwing van eiwitten. Ontregeling van PTM's is in verband gebracht met inflammatoire en auto-immuunziekten. Carbamylatie is de chemische omzetting van een positief geladen lysine in een ongeladen homocitrulline. Gecarbamyleerde eiwitten zijn vaak het doelwit van auto-antilichamen bij patiënten die lijden aan reumatoïde artritis (RA). Van verschillende eiwitten is gemeld dat ze *in vivo* worden gecarbamyleerd. Interessant genoeg werd gerapporteerd dat carbamylering van IgG invloed heeft op het vermogen om complement te activeren. Bovendien hebben cryo-elektronenmicroscopie-analyses aangetoond dat binding van C1q een hexamere rangschikking vereist van monomere IgG-complexen, die samenkomen via niet-covalente Fc:Fc-interacties. De studies beschreven in **Hoofdstuk 8** zijn uitgevoerd om de mogelijke rol van een prominente PTM, geassocieerd met reumatische ziekte, die wordt gevormd na carbamylering beter te begrijpen. Specifieker hebben we de interactie tussen gecarbamyleerd IgG bestudeerd in relatie tot het vermogen om het complementsysteem te activeren. We identificeerden verschillende peptiden van menselijke immunoglobulinen (inclusief IgG) die *in vivo* gecarbamyleerd waren in de synoviale vloeistof van RA-patiënten. We hebben bevestigd dat carbamylatie van IgG resulteert in een afname van het vermogen tot complement activatie, zowel in ELISA als in complement-afhankelijke cytotoxiciteitstesten (CDC). Desalniettemin, wanneer de gecarbamyleerde varianten werden gemengd met het niet-gemodificeerde IgG, was er geen dominant remmend effect op complementactivatie. CDC-activiteit is sterk afhankelijk van IgG1-hexameervorming en in de CDC-assay was het onduidelijk of ca-IgG's hexameren vormen

in aanwezigheid van niet-gemodificeerde IgG's. Daarom hebben we onderzocht of het effect van verminderde complementactivering door ca-IgG ook aanwezig is bij gebruik van voorgevormde ca-IgG-hexameren. Vervolgens analyseerden we het effect van carbamylatie op hexamerisatie en complement activatie door gebruik te maken van een drievoudige mutantvariant van de IgG1-DNP die het vermogen van het antilichaam om hexameren te vormen zowel in oplossing als op het celoppervlak (aangeduid als IgG1-DNP- RGY). Na carbamylatie was het IgG1-DNP-RGY niet langer in staat om in oplossing te hexameriseren. Dit geeft aan dat carbamylatie de Fc: Fc-interactie negatief beïnvloedt, en resulteert in het verlies van C1q-binding door IgG. Concluderend, het onvermogen van ca-IgG om het complementsysteem te activeren, is het gecombineerde effect van zowel verminderde binding van C1q aan de gemodificeerde Fc van IgG, als het verminderde vermogen van ca-IgG om hexameren te vormen.

