



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting autoimmunity in renal diseases: focus on neutrophil extracellular traps and autoreactive B-cells

Dam, L.S. van

Citation

Dam, L. S. van. (2022, February 22). *Targeting autoimmunity in renal diseases: focus on neutrophil extracellular traps and autoreactive B-cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3275833>

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/1887/3275833>

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

9

Appendices

- A Nederlandse samenvatting
- B Curriculum vitae
- C List of publications
- D Congress presentations and prizes
- E Dankwoord

A

Nederlandse samenvatting

NEDERLANDSE SAMENVATTING

ANCA geassocieerde vasculitis (AAV) en systemische lupus erythematosus (SLE) zijn zeldzame auto-immuunziekten die inflammatie in verschillende organen in het lichaam kunnen veroorzaken. Dit zal op den duur leiden tot ernstige gezondheidsproblemen en een verkorte levensduur. Patiënten kunnen zich presenteren met verschillende klachten: van relatief milde huid en gewrichtsklachten tot levensbedreigende nierziekten, longbloedingen en/of neurologische verschijnselen. De nierbetrokkenheid in deze ziekten wordt glomerulonefritis genoemd. Dit proces kenmerkt zich door ontsteking van de nierfilters waardoor de nierfunctie vermindert en eiwitten weglekken in de urine. AAV en SLE patiënten hebben ook vaak algemene griepachtige verschijnselen zoals vermoeidheid, koorts, spierpijn en gewichtsverlies.

De oorzaak van deze ziekten is niet geheel bekend, maar (een combinatie van) genetische-, omgevings-, hormonale factoren, en/of doorgemaakte infecties spelen een rol in het ontstaan van deze ziektes.

In het algemeen zijn de behandeldoelen voor deze patiënten remissie van ziekte, het voorkomen van schade aan de organen en het minimaliseren van medicatie gerelateerde bijwerkingen. De behandeling bestaat uit inductietherapie om de ziekte in remissie te brengen met daarna een onderhoudsbehandeling om de ziekte langdurig rustig te houden. AAV en SLE zijn wat betreft hun klinische presentatie, ziekte mechanisme en prognose twee uiteenlopende ziektebeelden die hieronder nader worden toegelicht.

Systemische lupus erythematosus

De prevalentie van SLE is 1-25 per 100.000 personen per jaar, met een hogere ratio vrouwen (9:1). De ziekte begint meestal als patiënten tussen de 20 en 40 jaar oud zijn. SLE wordt gekarakteriseerd doordat het immuunsysteem reageert op lichaamseigen materiaal en antistoffen maakt tegen verschillende onderdelen van het lichaam, waarvan de meest bekende gericht is tegen DNA (anti-DNA). Voor SLE zijn er wel tot 180 verschillende antistoffen beschreven, welke in verschillende combinaties aanwezig kunnen zijn. De antistoffen kunnen samen met de stoffen die ze herkennen (antigenen), immuuncomplexen vormen. Deze immuuncomplexen kunnen vervolgens neerslaan in verschillende organen, waarbij ze een hevige ontstekingsreactie op gang brengen. Waaronder ook in de nieren, wat leidt tot glomerulonefritis, wat ook wel lupus nefritis wordt genoemd.



De standaardbehandeling voor alle SLE patiënten is hydroxychloroquine. Daarnaast hangt de behandeling af van de ernst van de klachten. Patiënten met milde ziekte, zoals huid en/of gewricht betrokkenheid, kunnen behandeld worden met methotrexaat of azathioprine. Patiënten met ernstige orgaanbetrokkenheid (nier, hart, long, zenuw) wordt aanbevolen om behandeld te worden met intensieve immunosuppressieve middelen zoals mycofenolaat mofetil (cellcept) of cyclofosfamide in combinatie met methylprednisolon en daarna een afbouwschema prednison.

ANCA-geassocieerde vasculitis

ANCA-geassocieerde vasculitis is de verzamelnaam voor granulomatosis met polyangiitis (GPA), microscopische polyangiitis (MPA), en eosinofiele GPA. De incidentie is 20 per 1.000.000 personen, en komt ongeveer even vaak voor bij mannen en vrouwen, meestal op middelbare leeftijd. De ziekte wordt gekenmerkt door een ontsteking van de vaatwand van de kleine vaten die kan leiden tot schade in de belangrijke organen zoals de nieren, longen, hart, keel-neus-oor (KNO) gebied en het neurologische systeem. Autoantistoffen tegen neutrofiel cytoplasmatische antigenen (ANCA's), waaronder proteinase-3 (PR3) of myeloperoxidase (MPO), zijn kenmerkend voor GPA en MPA en spelen een pathogene rol bij de ziekte. De huidige standaardbehandeling van ernstige ANCA geassocieerde vasculitis met orgaanbetrokkenheid is rituximab of cyclofosfamide in combinatie met prednison als remissie-inductie therapie en herhaaldelijke rituximab infusen als onderhoudsbehandeling.

Neutrofiel extracellulaire traps

Neutrofielen zijn de meest voorkomende witte bloedcellen in ons lichaam die een belangrijke rol spelen als eerstelijns verdediging tegen bacteriën, virussen en andere ziekteverwekkers. Bij een infectie trekken neutrofielen andere immuun cellen aan en activeren deze. Neutrofielen hebben daarnaast verschillende manieren om zelf ziekteverwekkers aan te vallen, door middel van fagocytose of degranulatie. Daarnaast kunnen neutrofielen hun eigen DNA uit spuwen om ziekteverwekkers te vangen en te doden. Dit proces wordt NETose (NETs = neutrofiel extracellulair traps) genoemd. NETs staan naast hun fysiologische rol in de afweer bekend om hun rol in het ziektemechanisme van auto-immuunziekten zoals AAV en SLE. In zowel AAV als SLE werd al eerder een verhoogde productie en een verminderde afbraak van NETs gezien. NETs bevatten daarnaast verschillende autoantigenen waartegen antistoffen gemaakt worden, zowel in AAV (MPO en PR3) als in SLE (DNA). NETs zijn daardoor in staat om een autoimmunreactie te stimuleren en kunnen ook directe glomerulaire inflammatie en schade veroorzaken. Specifiek in SLE, kunnen NETs samen met de NET-gerichte autoantistoffen, immuuncomplexen vormen die de ontstekingsreactie verder aanwakkeren.

Overzicht van de hoofdstukken in dit proefschrift

Het doel van dit proefschrift was om meer inzicht te krijgen in de ziektemechanismen van renale autoimmuunziekten, waaronder AAV en SLE, met name gericht op de rol van NETs, autoantistoffen en autoreactieve B-cellen. Het doel hiervan is om de monitoring van autoimmuniteit, individuele behandelingen en de klinische zorg voor deze patiënten te verbeteren.

In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift is de huidige kennis over de rol van NETs in AAV en SLE samengevat. In deze review wordt beschreven hoe NETs worden geïnduceerd en wat hun bijdrage is in het ziektemechanisme van AAV en SLE. Daarnaast wordt besproken hoe NETs het beste onderzocht kunnen worden en hoe deze bestreden kunnen worden, met een overzicht van toegepaste behandelingen die een effect op NETs lieten zien. Het is belangrijk dat er een specifieke, gevoelige en objectieve methode wordt gebruikt om NETs te kwantificeren. Op het moment zijn er verschillende manieren om NETs te kwantificeren. **Hoofdstuk 3** bevat een protocol om NETs te kwantificeren op een snelle en gevoelige manier met driedimensionale immunofluorescentie confocale microscopie, welke door onze onderzoeksgroep ontwikkeld is. Dit protocol is goed toepasbaar om NETs te kwantificeren in patiënten en ook om eventuele behandelingen te evalueren.

Hoofdstuk 4 beschrijft een grote cohortstudie met AAV en SLE patiënten waarin het bovengenoemde protocol toegepast is om NETs te kwantificeren. In deze studie lieten we zien dat stoffen in het bloed van AAV en SLE patiënten het vormen van NETs stimuleerden. De mate van NET vorming associeerde voor beide ziekten ook met de ziekteactiviteit. Daarnaast toonde deze studie aan dat NETs van AAV patiënten intrinsiek verschilden met NETs van SLE patiënten, wat betreft de morfologie, kinetiek, inducerende stoffen en de compositie van de NETs. In AAV worden lytische NETs na een aantal uur gevormd, waarbij de neutrofiel kapot gaat, terwijl in SLE al na enkele minuten NETs vormen waarbij de neutrofielen clusteren en de neutrofiel heel blijft. In AAV werden de NETs getriggerd onafhankelijk van ANCAs, terwijl in SLE de immuuncomplexen NETs induceerden. Daarnaast hebben we aangetoond dat ROS en PAD4 belangrijk waren voor het vormen van NETs in AAV, terwijl deze in SLE geen rol speelden. AAV NETs kenmerkten zich verder door gecitrullineerde histonen, terwijl SLE NETs HMGB1 en geoxideerd mitochondrieel DNA bevatten en onderdeel waren van immuuncomplexen.

De conventionele behandeling van SLE patiënten betreft middelen die de afweer in brede zin onderdrukken, zoals prednison, cellcept en cyclofosfamide. Gezien het feit dat juist autoreactieve B-cellen, en de autoantistoffen die zij produceren de boosdoeners zijn in SLE, is de gedachte dat gerichte therapie op B-cellen effectief zou kunnen zijn. Van de verschillende B-cel therapieën is momenteel alleen belimumab officieel



geregistreerd (sinds 2017) voor de behandeling van SLE patiënten. Belimumab (BLM) is gericht tegen BAFF (B-cell activating factor), een cytokine wat B-cellen activeert. Andere therapieën die zich richten op B-cellen zouden ook potentieel effectief kunnen zijn in SLE, zoals rituximab (RTX), bortezomib (BTZ) en de combinatie RTX en BLM. Deze therapieën zijn alleen nog in kleine ongecontroleerde studies onderzocht waarin ze wel positieve effecten lieten zien.

In **hoofdstuk 5** zijn drie SLE cohorten onderzocht tijdens de behandeling met verschillende B-cell therapieën: 1) rituximab met belimumab 2) bortezomib en 3) rituximab. In deze studie is gekeken naar het effect van B-cel therapie op autoantistof niveaus, de vorming van immuuncomplexen en de hoeveelheid NETs voor en na behandeling. In deze translationele studie toonden we dat autoantistoffen daalden in elk cohort, maar het grootste effect werd gezien met RTX en BLM. Het verdwijnen van anti-C1q antistoffen associeerde met verminderde immuuncomplex vorming en ziekteactiviteit. Dit gebeurde het vaakst in SLE patiënten die behandeld werden met RTX en BLM, in mindere mate in RTX-groep en niet in de BTZ-groep.

RTX heeft dezelfde effectiviteit als cyclofosfamide, maar heeft een gunstiger bijwerkingsprofiel met minder toxiciteit. Echter, na remissie-inductie therapie met RTX, hebben AAV patiënten een relatief hoog risico op een terugkeer van ziekte als ze geen onderhoudsbehandeling krijgen. Daarom zou een goede biomarker die relapses in deze fase zou kunnen voorspellen, waardevol zijn. Verschillende studies hebben gesuggereerd dat monitoring van ANCAs en circulerende B-cellen mogelijk goede parameters zouden zijn om de behandeling te sturen. Maar, de voorspellende waarde van deze biomarkers staat nog ter discussie.

In **hoofdstuk 6** hebben we dit verder onderzocht in een groot AAV patiënten cohort waarin patiënten behandeld werden met RTX. In deze studie hebben we retrospectief gekeken naar de relatie tussen opvlamming van ziekte en de ANCA-status en/of de terugkeer van B-cellen. In PR3-ANCA positieve patiënten, vond 96% van de ziekteopvlammingen plaats als PR3-ANCA persisteerde of terugkwam na de behandeling, vaak in combinatie met de terugkeer van B-cellen. De afwezigheid van PR3-ANCA en B-cellen was sterk voorspellend voor remissie. MPO-ANCA patiënten waren een relatief kleinere groep, waarin alle ziekteopvlammingen plaatsvonden als MPO-ANCA positiviteit persisteerde en B-cellen terugkwamen. Concluderend, toonde deze studie aan dat het monitoren van ANCA en B-cellen in AAV patiënten na RTX behandeling waardevol kan zijn als biomarker voor ziekteopvlammingen. Door deze immunomonitoring kunnen individuele behandelingen beter gestuurd worden waarmee potentiële ziekteopvlammingen voorkomen kunnen worden.

De terugkomst van ANCAs, welke dus vaak gepaard gaat met een opvlamming van de ziekte, suggereert dat er ondanks behandeling met RTX (minimale) residuale autoimmunititeit (MRA) aanwezig is. Om MRA beter te onderzoeken zijn B-cellen op een gedetailleerde manier onderzocht in AAV patiënten die behandeld werden met RTX met behulp van hoog-sensitieve flow cytometrie (HSFC) van EuroFlow en perifere bloed mononucleaire cel (PBMC) kweken (**hoofdstuk 7**). Deze studie liet zien dat na behandeling met RTX, circulerende B-cellen altijd aantoonbaar bleven met Euroflow HSFC ondanks significante reducties in het aantal circulerende B-cellen. Het type B-cellen dat detecteerbaar was waren voornamelijk de geheugen B-cellen en CD20 negatieve plasma cellen. ANCA titers waren voornamelijk geassocieerd met veranderingen in circulerende naïeve en geheugen B-cellen (class switched en dubbel negatieve B-cellen), maar niet met plasma cellen. De PBMC kweken toonden aan dat er in een aantal patiënten ook na RTX behandeling, nog ANCA-specifieke geheugen B-cellen aantoonbaar waren, welke indicatief zijn voor MRA.

Concluderend laten onze studies zien dat NETs een belangrijke rol spelen in het ziektemechanisme van AAV en SLE. In SLE patiënten kunnen NETs bestreden worden door het autoantistof repertoire te verminderen en dan met name de hoog-afide anti-DNA en anti-C1q autoantistoffen die belangrijk zijn voor immuuncomplex vorming. Deze autoantistoffen werden effectief bestreden door de gecombineerde behandeling met RTX en BLM in SLE patiënten. In AAV zijn de exacte triggers van NETs niet bekend, maar sommige studies laten wel zien dat ANCAs (MPO en PR3 antistoffen) NET formatie kunnen stimuleren. Het verminderen van ANCAs zou daarom effectief kunnen zijn. In zowel AAV en SLE patiënten zijn de aanwezigheid en/of terugkomst van autoreactieve B-cellen en relevante autoantistoffen belangrijke componenten van MRA. Specifiek de dubbel negatieve B-cellen lijken hierin een belangrijke rol te spelen, onder andere omdat deze cellen associeerden met de terugkomst van autoantistoffen in AAV en met relapses na behandeling in SLE patiënten. Minimale residuale autoimmunititeit kan persisteren na B-cel therapie, maar de klinische implicaties hiervan moeten nog verder worden onderzocht. Daarnaast rest de vraag of MRA gebruikt kan worden als immunomonitoring tool en om behandelingen meer te personaliseren. Onze studies tonen aan dat onderzoek naar de onderliggende processen van autoantistof vorming een preciezere reflectie geeft van de humorale autoimmunititeit in AAV en SLE patiënten.

Toekomstige studies zouden zich kunnen richten op de identificatie van ziekte-gerelateerde NET triggers en pathways in AAV en SLE. Daarnaast is het belangrijk om te kijken hoe dubbel negatieve B-cellen beïnvloed kunnen worden in AAV en SLE. Ten slotte, zou ook de identificatie van autoantigeen-specifieke B-cellen mogelijk leiden tot meer inzicht in de pathogenese van AAV en SLE.



