



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Bitter Sweet Symphony: the impact of sugars on autoimmunity**

Kissel, T.

### **Citation**

Kissel, T. (2022, December 1). *Bitter Sweet Symphony: the impact of sugars on autoimmunity*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3492105>

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/1887/3492105>

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

## Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift richt zich op de chronische, vaak levenslange en veelvoorkomende auto-immuunziekte Reumatoïde Artritis (RA). Ons immuunsysteem beschermt tegen bacteriële, virale en parasitaire infecties, maar kan soms ontsporen en zich richten tegen het eigen lichaam. Bij RA zorgt dit ervoor dat immuuncellen zoals T-cellen, B-cellen en macrofagen het gewrichtsweefsel infiltreren. Dit kan leiden tot gewrichtsontsteking en uiteindelijk schade aan kraakbeen en bot. Ondanks de recente vooruitgang in de identificatie van betrokken genetische en omgevingsfactoren, is de onderliggende oorzaak van de auto-immunreactie bij RA onbekend. Tot 80% van de mensen met RA hebben specifieke antilichamen (oplosbare B-cel-receptoren) die zijn gericht tegen lichaamseigen eiwitten. Deze auto-antilichamen ontstaan doordat het immuunsysteem onvoldoende onderscheid maakt tussen lichaamseigen en lichaamsvreemde moleculen. De frequente aanwezigheid van auto-antilichamen bij mensen met RA en de effectiviteit van B-celgerichte behandelingen suggereren dat de onderliggende autoreactieve B-cel activiteit een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van de ziekte.

De verschillende klassen van auto-antilichamen die kenmerkend zijn voor de ziekte worden beschreven in de algemene inleiding (**Hoofdstuk 1**). RA wordt gekenmerkt door autoantilichamen die gericht zijn tegen post-translationele modificaties (PTM's). Dit zijn biochemische veranderingen van aminozuren die optreden na de vertaling van RNA naar eiwitten. Het grootste deel van de ziektespecifieke autoantilichamen bij mensen met RA zijn gericht tegen citrulline [anti-citrullinated protein antilichamen (ACPA)]. Citrulline ontstaat na een enzymatische omzetting van het aminozuur arginine. Naast ACPA worden ook auto-antilichamen tegen "gecarbamylerde" of "geacetylerde" eiwitten gevonden bij mensen met RA [anti-gecarbamylerd protein antilichamen (ACarPA), respectievelijk anti-geacetylerd protein antilichamen (AAPA)]. Beide modificaties ontstaan na verandering van het aminozuur lysine. In eerdere studies is vastgesteld dat de verschillende autoantilichamen gelijktijdig voorkomen bij RA-patiënten. Dit wijst op kruisreactiviteit van één auto-antilichaamklasse tegen verschillende PTM's. Naast de reactiviteit van ACPA tegen verschillende PTM's hebben deze auto-antilichamen nog een ander belangrijk kenmerk. Zij dragen suikerstructuren (glycanen) in het gedeelte van het antilichaammolecuul dat verantwoordelijk is voor binding aan de gemodificeerde eiwitten. Glycanen bestaan uit afzonderlijke suikers (monosachariden). Deze zijn aan elkaar gebonden en vormen samen ketens. Antilichamen van klasse G, ook wel immunoglobulinen G (IgG) genoemd, dragen normaliter alleen glycanen in het constante domein (Fc) van de antilichaammolecuul. ACPA IgG-moleculen dragen echter ook glycanen in de antigeenbindende regio's (variabele domeinen). De studies die staan beschreven in dit proefschrift zijn gericht op een beter begrip van de kenmerken van de RA-specifieke autoreactieve B-celreactie, hoe deze kenmerken bijdragen aan de ontsporing van het immuunsysteem en hoe de autoreactieve B-cellen kunnen ontsnappen aan de strikte controlemechanismen in ons lichaam die normaliter de ontwikkeling van auto-immuniteit voorkomen.

In **Hoofdstuk 2** is de stand van de huidige literatuur beschreven over de controlemechanismen die de ontsporing van autoreactieve B-cellen voorkomen. Om ziekteverwekkers op te ruimen, worden deze door ons immuunsysteem als lichaamsvreemd herkend. Lichaamseigen eiwitten worden daarentegen door het immuunsysteem geaccepteerd (zelftolerantie). De ontwikkeling van zelftolerantie gebeurt in de thymus en het beenmerg. Ook op andere plaatsen in het lichaam, zoals in lymfeklieren, bevinden zich verschillende controlemechanismen die ontsporing van het immuunsysteem voorkomen. In dit hoofdstuk richten we ons specifiek op deze “perifere” controlemechanismen die ervoor zorgen dat potentieel autoreactieve B-cellen geen auto-immuniteit veroorzaken. Hier belichten wij de antigeenpresentatie door folliculaire dendritische cellen (FDC’s), somatische hypermutatie (SHM), een mechanisme waarbij het immuunsysteem zich verbetert door mutaties aan te brengen in de variabele domeinen van de B-celreceptor (BCR), en kruisreactiviteit van T/B-cel-receptoren op zelf- en lichaamsvreemde eiwitten. Er wordt benadrukt dat autoreactieve B-cellen die voorkomen bij mensen met RA potentieel zijn ontsnapt aan deze zelftolerantie door kruisreactiviteit met lichaamsvreemde moleculen en de aanwezigheid van variabele domein glycanen (VDG).

De studies beschreven in **Hoofdstuk 3** ondersteunen de hypothese dat de drie auto-antilichamen die kenmerkend zijn voor RA (ACPA, ACarPA en AAPA) kruisreageren en dus mogelijk tot één familie van antilichamen behoren. Daarom hebben wij de term anti-gemodificeerde proteïne antilichamen (AMPA) geïntroduceerd. Deze bevinding werd verkregen door het genereren van monoklonale antilichamen. De BCR sequenties die de basis vormen voor deze monoklonale antilichamen werden geïsoleerd uit B-cellen van RA-patiënten. De binding van deze antilichamen aan verschillende moleculen (eiwitten en peptiden) met gecitrullineerde, gecarbamylerde of geacetylerde aminozuren werd geanalyseerd. Alle monoklonale antilichamen vertonen een hoge kruisreactiviteit tegen ten minste twee verschillende modificaties. De studies beschreven in dit hoofdstuk laten ook zien dat B-cellen die oorspronkelijk gericht zijn tegen gecitrullineerde eiwitten ook gestimuleerd kunnen worden door geacetylerde of gecarbamylerde eiwitten. Deze bevindingen suggereren dat autoreactieve B-cellen afkomstig van mensen met RA geactiveerd kunnen worden door meerdere eiwitten die verschillende modificaties kunnen dragen. Dit wil zeggen dat verschillende PTM’s betrokken kunnen zijn bij de initiële inbreuk op de zelftolerantie, zoals bijvoorbeeld geacetylerde eiwitten die tijdens een infectie door bacteriën geacetylerd zijn geraakt.

Naast de kruisreactiviteit op diverse PTM’s, dragen ACPA IgG’s zelf ook post-translationele modificaties in de vorm van glycanen die zijn geplaatst in de variabele domeinen. In het werk dat staat beschreven in **Hoofdstuk 4** en **Hoofdstuk 5**, waren we in staat om een belangrijke functie van deze glycanen in de ontwikkeling van de RA op te helderen. Eerdere bevindingen wezen er al op dat VDG een voordeel bieden aan autoreactieve B-cellen die ACPA aanmaken. Deze bevindingen hadden al aangetoond dat VDG selectief zijn ingebouwd na T-cel hulp en SHM.

Ook wisten we al dat de aanwezigheid van VDG in ACPA de kans verhogen dat een persoon, indien nog klachtenvrij, later RA ontwikkelt. De resultaten beschreven in deze hoofdstukken tonen aan dat de aanwezigheid van VDG geassocieerd is met de belangrijkste genetische risicofactor voor ACPA-positieve RA. Dit zijn de HLA (humaan leukocytenantigenen) allelen die betrokken zijn bij de rekrutering van de T-celhelp die nodig is voor de ontwikkeling van een “volwaardige” B-celreactie. Het is daarom waarschijnlijk dat deze glycanen tijdens SHM in de variabele domeinen van de autoreactieve B-cel-receptoren worden ingebracht na signalen te hebben ontvangen van T-cellen die nodig zijn om de B-celreactie te laten ontsporen.

Deze nadelige “T-cel hit” kan meerdere malen voorkomen, zoals blijkt uit de toenemende frequentie van VDG op autoreactieve B-cellen in de tijd die voorafgaat aan ontwikkeling van ziekte. Dit staat beschreven in **Hoofdstuk 6**. De aanwezigheid van VDG op ACPA werd geanalyseerd in 1498 monsters van personen in verschillende klinische ziektestadia. De aanwezigheid van VDG op ACPA IgG nam toe van 56% bij gezonde personen tot 75% bij patiënten met gewrichtspijn tot 93% bij patiënten met beginnende RA. Als ziekte eenmaal aanwezig is, hebben de ACPA moleculen van RA patiënten een constant hoge aanwezigheid van VDG, hoewel er een lichte daling optreedt na behandeling. De bevindingen beschreven in dit hoofdstuk tonen ook aan dat de “kwaliteit” van de ACPA immuunrespons, d.w.z. de frequentie van VDG op ACPA IgG bij het begin van de ziekte, voorspellend kan zijn voor de ontwikkeling van chronische persisterende ziekte of de kans dat RA patiënten medicijnvrije remissie bereiken op een later tijdstip.

De studies beschreven in **Hoofdstuk 7**, richtten zich op de functionele betekenis van VDG op autoreactieve B-cellen en de afgescheiden auto-antilichamen. De bevindingen tonen aan dat de aanwezigheid van VDG de binding van autoreactieve B-cel-receptoren en ACPA aan gecitrullineerde eiwitten kunnen verminderen. De aanwezigheid van VDG had geen invloed op herkenning van gecitrullineerde eiwitten die goed werden herkend, maar verminderde de binding aan gecitrullineerde eiwitten die minder goed werden herkend. Structuuranalyse en modellering van interacties tussen auto-antilichaam en gecitrullineerd eiwit bevestigden dat VDG een interactie aangaan met het gedeelte van het antilichaam dat betrokken is bij de herkenning van citrulline. Daarnaast hebben onze bevindingen laten zijn dat VDG de activeringsstatus van autoreactieve B-cellen verhogen. Dit is mogelijk een gevolg van een verminderde opname van de BCR door de B-cel na binding van gecitrullineerde eiwitten. Deze belangrijke functionele gevolgen van VDG, zowel de verminderde binding aan (potentieel lichaamseigen) gecitrullineerde eiwitten die al minder goed werden herkend, terwijl binding aan (potentieel vreemde) gecitrullineerde eiwitten die goed worden herkend behouden blijft, als de lagere activeringsdrempel, kunnen autoreactieve B-cellen in staat stellen belangrijke controlemechanismen te omzeilen. Op deze wijze zouden ze kunnen ontsnappen aan zelftolerantie.

In **Hoofdstuk 8** wordt beschreven dat VDG ook de effectormechanismen van uitgescheiden antilichamen kunnen beïnvloeden. Wij constateren in deze studie een geringere vorming van hexameren van geglycosyleerd ACPA IgG. Dit leidt tot een geringere binding aan het effectormolecuul C1q. Hierdoor vindt een verminderde activering plaats van het complementcascade, een belangrijk route binnen het immuunsysteem voor de activatie en rekrutering van immuuncellen. Of deze verminderde complementactivatie van geglycosyleerd ACPA IgG invloed heeft op de pathogenese van de ziekte en ACPA mogelijk minder "actief" maken, of dat het slechts een bijeffect is, is niet duidelijk. Dit moet verder worden onderzocht. Niettemin kan worden geconcludeerd dat IgG VDG gebruikt kunnen worden om de antilichaamafhankelijke complementactivatie te doen verminderen.

De resultaten beschreven in dit proefschrift worden in **Hoofdstuk 9** besproken en geplaatst in de context van de huidige literatuur. Het vermogen van RA-specifieke auto-antilichamen om aan verschillende gemodificeerde eiwitten te binden wordt belicht en verklaard aan de hand van de structuuranalyse van ACPA-moleculen. ACPA gaan een specifieke interactie aan met de citrulline modificatie en niet, of slechts in geringe mate, met de flankerende aminozuren rond deze modificatie. Aangezien de modificaties die ontstaan na carbamylering en acetylering (homocitrulline en acetyl-lysine) van eiwitten structureel zeer vergelijkbaar zijn met citrulline, kunnen ACPA deze modificaties ook herkennen. Daarnaast worden de selectieve introductie van glycanen in het variabele domein van ACPA IgG en de functionele gevolgen daarvan in dit hoofdstuk besproken. Het werk beschreven in dit proefschrift heeft geleid tot de hypothese dat VDG autoreactieve B-cellen helpen om de "tolerantiecontrolepunten" te omzeilen doordat ze de binding aan gemodificeerde eiwitten en de activatie van B-cellen beïnvloeden. Tot slot wordt besproken dat autoreactieve B-celresponsen bij RA hoogstwaarschijnlijk het gevolg zijn van opeenvolgende gebeurtenissen ("multiple hits") waarbij het kruisreactieve karakter van de BCR en AMPA en de overvloedige introductie van VDG een belangrijke rol spelen. Dit nieuwe "glycaanmechanisme" zou nuttig kunnen zijn om de diagnose van RA al voor de ziekte is ontstaan te verbeteren. Ook is deze kennis belangrijk om te kunnen begrijpen hoe het immuunsysteem ontspoorde en hoe auto-immuniteit zich ontwikkelt. Er is echter veel meer onderzoek nodig om te begrijpen hoe en waarom auto-immuunziekten zoals RA zich ontwikkelen (*bitter*) en om de belangrijke rol van glycaanmodificaties (*sweet*) in ziekte-ontwikkeling te ontrafelen.