



**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).

Deutsche Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der chronischen und entzündlichen Gelenkerkrankung Rheumatoide Arthritis (RA), die in unserer Gesellschaft weit verbreitet ist. Rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung, die entsteht, wenn unser Immunsystem, das uns eigentlich vor bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen schützen soll, aus dem Ruder läuft und fälschlicherweise beginnt unser eigenes Körpergewebe anzugreifen. Bei RA wird dabei das Gelenkgewebe von Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen infiltriert, was zu Entzündungen und schließlich zu Knorpel- und Knochenschäden führen kann. Trotz jüngster Fortschritte in der Therapie und der Erkenntnis, dass sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen, ist die Ursache der Autoimmunreaktion bei RA nach wie vor unbekannt. Bis zu 80% der RA-Patienten weisen spezifische Antikörper (lösliche B-Zell-Rezeptoren) auf, die sich gegen körpereigene Proteine (Antigene) richten. Diese Autoantikörper entstehen, weil das Immunsystem nicht hinreichend zwischen körpereigenen und -fremden Antigenen unterscheiden kann. Das häufige Auftreten von Autoantikörpern bei Patienten mit RA und die Wirksamkeit gezielter B-Zell-Therapien deuten darauf hin, dass die zugrundeliegende autoreaktive B-Zell-Reaktion eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung spielt.

Die verschiedenen Klassen von Autoantikörpern, die für die Krankheit charakteristisch sind, werden in der allgemeinen Einleitung (**Kapitel 1**) beschrieben. RA ist durch Autoantikörper gekennzeichnet, die sich gegen posttranslationale Modifikationen (PTM) richten, d.h. gegen biochemische Veränderungen einzelner Aminosäuren eines Proteins, die nach der Übersetzung (Translation) von mRNA in Proteine auftreten. Die Autoantikörper mit der größten Spezifität für RA richten sich gegen die Citrullinierung [anti-citrullinierte Protein-Antikörper (ACPA)], eine enzymatische Umwandlung der Aminosäure Arginin. Neben ACPA werden bei Patienten mit RA auch Autoantikörper gegen carbamylierte [anti-carbamylierte Protein-Antikörper (ACarPA)] und acetylierte [anti-acetylierte Protein-Antikörper (AAPA)] Proteine beobachtet. Beide Modifikationen entstehen durch eine posttranslationale Veränderung der Aminosäure Lysin. In vorherigen Studien wurde festgestellt, dass die verschiedenen Autoantikörpersysteme gleichzeitig bei RA-Patienten auftreten, was auf eine Kreuzreaktivität einer Autoantikörperklasse gegenüber mehreren PTM schließen lässt. Neben ihrer Reaktivität gegen PTM weisen ACPA-Moleküle ein weiteres wichtiges Merkmal auf: sie tragen Zuckerstrukturen (Glykane) in der Region des Antikörpermoleküls, die für die Bindung an die modifizierten Proteine zuständig ist. Glykane bestehen aus einzelnen aneinander gebundenen Zuckerbausteinen (Monosacchariden), die sich zu Ketten verbinden. Die Antikörper (Immunglobuline) der Klasse G (IgG) tragen normalerweise Glykane in der konstanten Domäne (Fc) des Antikörpermoleküls. ACPA-IgG-Moleküle sind jedoch auch in der Antigen-bindenden Region (variablen Domäne) reichlich glykosyliert. Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Studien wollen wir verstehen wie die Merkmale von RA-

spezifischen autoreaktiven B-Zellen - ihre Kreuzreaktivität und die Glykosylierung der variablen Domäne - diesen Zellen dazu verhilft zu überleben und den strengen Kontrollmechanismen in unserem Körper zu entkommen, die normalerweise die Entwicklung von Autoimmunität verhindern.

Daher wird in **Kapitel 2** die aktuelle Literatur zu den Kontrollmechanismen erläutert, die die Entstehung autoreaktiver B-Zellen verhindern. Um Krankheitserreger abwehren zu können, werden sie von unserem Immunsystem als fremd erkannt. Körpereigene Proteine werden hingegen vom Immunsystem toleriert (Selbsttoleranz). Diese Selbsttoleranz entwickelt sich im Thymus und im Knochenmark (zentrale Selbsttoleranz). Auch an anderen Stellen im menschlichen Körper, etwa in den Lymphknoten, gibt es verschiedene Kontrollmechanismen (periphere Selbsttoleranz), die verhindern, dass das Immunsystem „entgleist“. In diesem Kapitel konzentrieren wir uns speziell auf diese „peripheren“ Kontrollmechanismen, die sicherstellen, dass potenziell autoreaktive B-Zellen keine Autoimmunität verursachen. Dabei beleuchten wir die Antigenpräsentation durch folliculäre dendritische Zellen (FDCs), die somatische Hypermutation (SHM) - ein Mechanismus, bei dem sich das Immunsystem durch Mutationen in den variablen Domänen des B-Zell-Rezeptors an neue Antigene anpasst - sowie die Kreuzreaktivität von T/B-Zell-Rezeptoren gegenüber körpereigenen und fremden (mikrobiellen/umweltbedingten) Proteinen. Es wird hervorgehoben, dass autoreaktive B-Zellen in RA potentiell durch ihre Kreuzreaktivität und die Glykosylierung der variablen Domäne dieser Selbsttoleranz entkommen.

Die in **Kapitel 3** beschriebenen Daten bekräftigen die Hypothese, dass die drei für RA charakteristischen Autoantikörperklassen (ACPA, ACarPA und AAPA) kreuzreagieren und somit möglicherweise zu einer Familie von Antikörpern gehören. Wir haben daher den Term anti-modifizierte Protein-Antikörper (AMPA) eingeführt. Diese Erkenntnis wurde durch die Generierung von monoklonalen Antikörpern erlangt. Die B-Zell-Rezeptor-Sequenzen, die die Grundlage für diese monoklonalen Antikörper bilden, wurden aus B-Zellen von RA-Patienten isoliert. Die Bindung dieser Antikörper an verschiedene Antigenkandidaten (Proteine und Peptide), die citrullinierte, carbamylierte oder acetylierte Aminosäuren tragen, wurde analysiert. Alle monoklonalen Antikörper zeigten eine hohe Kreuzreaktivität gegen mindestens zwei verschiedene Modifikationen. In diesem Kapitel zeigen wir zudem, dass B-Zellen, die sich ursprünglich gegen citrullinierte Proteine richten, auch durch acetylierte oder carbamylierte Antigene stimuliert werden können. Diese Daten deuten darauf hin, dass autoreaktive B-Zellen in RA durch mehrere Proteine aktiviert werden können, die unterschiedliche Modifikationen tragen. Demnach können verschiedene PTM an der anfänglichen Verletzung der Selbsttoleranz beteiligt sein, wie zum Beispiel körpereigene acetylierte Proteine, die möglicherweise während einer bakteriellen Infektion acetyliert wurden.

Neben ihrer Kreuzreaktivität gegenüber verschiedenen PTM tragen ACPA-IgG selbst posttranslationale Modifikationen, da sie Glykane in ihren variablen Domänen aufweisen. In den in **Kapitel 4** und **Kapitel 5** beschriebenen Studien konnten wir eine wichtige Funktion dieser variablen Domänenglykane (VDG) bei der Entstehung von RA aufklären. Frühere Erkenntnisse deuteten bereits darauf hin, dass VDG autoreaktiven B-Zellen, die ACPA produzieren, einen Vorteil verschaffen. Diese Ergebnisse zeigten, dass VDG selektiv nach T-Zell-Hilfe und SHM in die ACPA-Antigenbindungsdomänen eingefügt werden. Auch war bereits bekannt, dass das Vorhandensein von VDG in ACPA die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass eine Person, die noch symptomfrei ist, später RA entwickelt. Die in diesen Kapiteln beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass das Vorhandensein von VDG mit dem wichtigsten genetischen Risikofaktor für ACPA-positive RA assoziiert ist. Dabei handelt es sich um die Humanen Leukozytenantigen (HLA)-Allele, die für sogenannte „shared epitopes“ (SE) kodieren. Sie sind an der Rekrutierung der T-Zell-Unterstützung beteiligt, die für die Entwicklung einer 'vollwertigen' B-Zell-Reaktion erforderlich ist. Es ist demnach wahrscheinlich, dass diese Glykane während der SHM in die variablen Domänen der autoreaktiven B-Zell-Rezeptoren eingefügt werden, nachdem sie Signale von T-Zellen erhalten haben, die auf die für die Krankheit prädisponierenden HLA-Moleküle beschränkt sind.

Dieser ungünstige „T-Zell Hit“ erfolgt möglicherweise mehrfach, wie die in **Kapitel 6** aufgezeigte zunehmende Häufigkeit von VDG auf autoreaktiven B-Zellen im Verlauf der Krankheitsentwicklung zeigt. Die prozentuale Glykosylierung der variablen Domäne wurde in 1498 Proben von Personen in verschiedenen klinischen Krankheitsstadien analysiert. Die Glykosylierung der variablen Domäne von ACPA-IgG stieg stetig an, angefangen mit 56% bei gesunden Personen, die bereits Autoantikörper aufweisen, bis zu 75% bei Patienten mit Gelenkschmerzen (Arthralgie) und 93% bei Patienten mit beginnender RA. Ist die Krankheit erst einmal ausgebrochen (etablierte RA), weisen ACPA-IgG-Moleküle von RA-Patienten eine durchgängig hohe Expression von VDG auf, wobei jedoch ein leichter Rückgang bei Immunsuppression zu verzeichnen ist. Die in diesem Kapitel beschriebenen Daten zeigen außerdem, dass die „Qualität“ der ACPA-Immunantwort, d.h. die Häufigkeit von VDG auf ACPA-IgG bei Krankheitsbeginn, prädiktiv sein kann für die Entwicklung einer chronischen, persistierenden Krankheit oder der Chance von RA-Patienten, zu einem späteren Zeitpunkt eine medikamentenfreie Remission zu erreichen.

Die in **Kapitel 7** beschriebene Studie konzentriert sich auf die funktionelle Bedeutung von VDG für autoreaktive B-Zellen und ihre sezernierten Autoantikörper. Die Daten zeigen, dass die Anwesenheit von VDG die Bindung von autoreaktiven B-Zell-Rezeptoren und Autoantikörpern an citrullinierte Proteine verringern kann. Das Vorhandensein von VDG hatte keinen Einfluss auf die Bindung von citrullinierten Proteinen die mit hoher Affinität erkannt werden, verringerte jedoch die Bindung an citrullinierte Proteine, die weniger gut erkannt werden und demnach eine geringe Affinität aufweisen. Strukturanalysen und die Modellierung der

Wechselwirkungen zwischen Autoantikörper und Antigen bestätigten, dass VDG mit dem Teil des Antikörpers interagieren, der an der Erkennung von Citrullin beteiligt ist. Darüber hinaus zeigten die Daten, dass VDG den Aktivierungsstatus autoreaktiver B-Zellen erhöhen. Dies ist möglicherweise eine Folge der verringerten Internalisierung von glykosylierten B-Zell-Rezeptoren nach der Bindung an citrullinierte Proteine. Diese wichtigen funktionellen Folgen von VDG - sowohl die verringerte Bindung an niedrig-affine (potenziell körpereigene) Antigene, während die Bindung an hoch-affine (potenziell fremde) Antigene beibehalten wird, als auch die geringere Aktivierungsschwelle - könnten es den autoreaktiven B-Zellen ermöglichen, wichtige Kontrollmechanismen zu überwinden und damit die Selbsttoleranz zu durchbrechen.

In **Kapitel 8** wird beschrieben, dass VDG, neben ihrer funktionellen Bedeutung für B-Zell-Rezeptoren, auch die Effektorfunktionen sekretierter Antikörper beeinflussen können. In dieser Studie beobachteten wir eine geringere Bildung von Hexameren bei glykosylierten ACPA-IgG, was folglich zu einer geringeren Bindung an das Effektormolekül C1q und somit zu einer geringeren Aktivierung des klassischen Komplementsystems führt. Das Komplementsystem ist eines der wichtigsten Netzwerke innerhalb des Immunsystems, das für die Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen verantwortlich ist. Ob diese verringerte Komplementaktivierung von glykosylierten ACPA-IgG Auswirkungen auf die Pathogenese der Krankheit hat und ACPA möglicherweise weniger „aktiv“ (immunogen) macht, oder ob es sich nur um einen Nebeneffekt handelt, kann nur spekuliert werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Dennoch kann geschlussfolgert werden, dass VDG auf IgG-Antikörpern genutzt werden können, um die Antikörper-abhängigen klassische Komplementaktivierung herunterzuregulieren.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse werden in **Kapitel 9** diskutiert und in den Kontext der aktuellen Literatur gestellt. Die Fähigkeit von RA-spezifischen Autoantikörpern an verschiedene modifizierte Proteine zu binden wird anhand der Strukturanalysen von ACPA-Molekülen aufgezeigt und erklärt. ACPA interagieren spezifisch mit der Citrullin-Modifikation und nicht oder nur in geringem Ausmaß mit den flankierenden Aminosäuren, die diese Modifikation umgeben. Da die Modifikationen, die nach der Carbamylierung und Acetylierung von Proteinen entstehen (Homocitrullin und Acetyllysin), strukturell sehr ähnlich zu Citrullin sind, kann ACPA auch diese posttranslationalen Modifikationen „promiskuitiv“ erkennen. Darüber hinaus werden die selektive Einführung von Glykanen in die variable Domäne von ACPA-IgG und ihre funktionellen Konsequenzen diskutiert. Die in dieser Thesis beschriebenen Daten haben zu der Hypothese geführt, dass VDG autoreaktiven B-Zellen dazu verhelfen können Toleranzkontrollpunkte zu umgehen, indem sie die Bindung an modifizierte Proteine und die Aktivierung von B-Zellen beeinflussen. Abschließend wird erörtert, dass autoreaktive B-Zell-Reaktionen bei RA höchstwahrscheinlich aus sequenziellen Ereignissen („multiplen Hits“) resultieren, bei denen die Kreuzreaktivität von B-Zell-Rezeptoren und AMPA und die reichliche Expression von VDG eine wichtige Rolle spielen. Dieser neue „Glykan-Mechanismus“

könnte nützlich sein, um die frühzeitige Diagnose von RA - vor Entstehen der Erkrankung - zu verbessern. Dieses Wissen ist zudem wertvoll, um zu verstehen, wie das Immunsystem "entgleist" und wie Autoimmunität entsteht. Es ist jedoch noch viel mehr Forschung erforderlich, um zu verstehen wie und warum sich Autoimmunerkrankungen wie RA entwickeln (*bitter*) und um die wichtige Rolle von Glykanmodifikationen (*sweet*) bei dieser Krankheitsentwicklung zu entschlüsseln.