



Universiteit
Leiden
The Netherlands

C1q and anti-C1q autoantibodies in (auto)immunity

Dijkstra, D.J.

Citation

Dijkstra, D. J. (2024, May 28). *C1q and anti-C1q autoantibodies in (auto)immunity*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3754750>

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/1887/3754750>

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

Nederlandse samenvatting

Het immuunsysteem kan worden opgedeeld in een aangeboren deel en een verworven deel, die samen zorgen voor bescherming tegen ziektes. Het aangeboren deel herkent een aantal patronen die aanwezig zijn op veel ziekteverwekkers. Hierdoor kan het aangeboren immuunsysteem zeer snel reageren op een nieuwe infectie, maar is het niet zo specifiek. Het verworven immuunsysteem is daarentegen zeer specifiek, maar heeft meer tijd nodig om een reactie te ontwikkelen. Bovendien blijft de specificiteit van het verworven immuunsysteem gedeeltelijk in stand tot wel tientallen jaren nadat het heeft gereageerd op bijvoorbeeld een infectie of vaccinatie. Zo kunnen deze cellen als ‘geheugen’ dienen en sneller reageren als ze hun specifieke doelwit opnieuw tegenkomen. Een belangrijk onderdeel van het verworven immuunsysteem zijn B cellen, die verantwoordelijk zijn voor het maken van antilichamen. Deze moleculen spelen een cruciale rol in de afweer tegen infecties door heel specifieke moleculen (op bijvoorbeeld bacteriën en virussen) te herkennen en vervolgens ofwel af te dekken, of andere delen van het immuunsysteem te activeren tegen dit doelwit. Antilichamen komen voor in verschillende types, die elk via andere effector mechanismen het immuun systeem kunnen activeren.

Een van de delen van het aangeboren immuunsysteem dat door antilichamen geactiveerd kan worden is het complementsysteem. Dit is een groep van enkele tientallen verschillende moleculen die aanwezig zijn in het bloed, en die op verschillende manieren geactiveerd kunnen worden. Het complementsysteem is onderverdeeld in een klassieke, lectine en alternatieve route. De moleculen in iedere route kunnen steeds een volgend molecuul in een kettingreactie activeren, totdat ze samenkomen bij de moleculen C3 en C5. Vanaf daar volgt de kettingreactie voor alle routes hetzelfde pad, waarbij een complex van moleculen samenkomt en een gat kan vormen in het membraan van de cel waar ze aan gebonden zijn. Daarnaast kunnen verschillende geactiveerde complementmoleculen binden aan receptoren op cellen van het immuunsysteem, om deze aan te trekken en aan te zetten tot actie. Het herkennen van doelwitten wordt in de klassieke route van het complementsysteem gedaan door C1q, een molecuul waar een groot deel van dit proefschrift over gaat. Binding van C1q aan ziekteverwekkers kan plaatsvinden doordat C1q direct aan structuren van de pathogeen bindt, of doordat er eerst antilichamen aan de pathogeen binden waaraan vervolgens C1q kan binden. Directe binding van C1q aan dode lichaamseigen cellen speelt daarnaast een belangrijke rol bij het tijdig verwijderen van deze cellen.

Een belangrijk proces in alle delen van het immuunsysteem is het onderscheiden van lichaamseigen en lichaamsvreemde moleculen. Zoals geïntroduceerd in **hoofdstuk 1** gaat

het maken van dit onderscheid helaas wel eens mis en valt het immuunsysteem het eigen lichaam aan; dit noemen we auto-immuniteit. Dit kan veroorzaakt worden door factoren uit de omgeving, genetische afwijkingen die zorgen voor een te actief immuunsysteem, of door cellen van het verworven immuunsysteem die een onderdeel van het eigen lichaam beginnen te herkennen als doelwit. Wanneer deze herkenning van lichaamseigen structuren door B cellen niet geremd wordt, leidt dat tot de productie van antilichamen tegen het eigen lichaam, zogenoemde autoantilichamen. In dit proefschrift worden vooral autoantilichamen beschreven die binden aan C1q. Deze anti-C1q antilichamen komen voor bij een paar procent van de algemene bevolking, maar zijn vooral bekend vanwege hun relatie met de auto-immuunziekte Systemische Lupus Erythematoses (SLE) en specifiek de bijbehorende nieraandoening lupus nefritis. Anti-C1q autoantilichamen herkennen C1q alleen als C1q in een specifieke vorm aanwezig is. Wanneer C1q bindt aan een structuur verandert het een beetje van vorm, wat ook een deel van C1q nieuw beschikbaar maakt wat eerder verborgen was. Deze vorm van C1q noemen we ligand-gebonden C1q. Specifiek het deel van C1q dat in deze vorm beschikbaar komt, wordt herkend door anti-C1q autoantilichamen. Om deze reden kunnen C1q en anti-C1q tegelijk in het bloed voorkomen zonder aan elkaar te binden; dat gebeurt pas nadat C1q een ligand vindt en van vorm verandert. Vanwege het belangrijke aandeel van autoantilichamen en ook het complementsysteem in gezondheid en auto-immuniteit, beschrijft dit proefschrift onderzoeken naar C1q en anti-C1q autoantilichamen in de context van verschillende ziektes. Daarbij komt eerst een literatuuronderzoek aan bod over complement in reumatische ziektes, vervolgens hoofdstukken over C1q in tuberculose en zwangerschap en tot slot autoantilichamen tegen C1q.

In **hoofdstuk 2** maakten we een overzicht van de rol van complement in verschillende reumatische ziektes. Voor reumatoïde artritis (RA) wordt de rol van complement vooral toegeschreven aan de alternatieve route, terwijl de klassieke route een kleinere rol speelt. In het geval van SLE is de invloed van complement tweezijdig. In het zeldzame geval dat iemand helemaal geen C1q heeft, krijgt diegene bijna altijd SLE. Wat vaker voorkomt is dat ernstige SLE samengaat met grootschalige activatie en neerslag van complement in organen en weefsels. Dit gaat soms zo ver dat een groot deel van de complementmoleculen worden opgebruikt. Op basis van deze feiten zou men verwachten dat complement een grote rol speelt in de ziekteprocessen die RA en SLE veroorzaken. Daarom zijn er verschillende medicijnen zoals eculizumab, een antilichaam dat de activatie van C5 in de kettingreactie stopt, getest in patiënten met deze ziektes. Echter bleek na onderzoek dat deze medicijnen onvoldoende invloed hadden op de ernst van RA en SLE. In een andere auto-immuunziekte, genaamd anti-neutrofiel cytoplasmatisch antilichaam geassocieerde vasculitis (in het

Engels afgekort tot AAV), werd in eerste instantie juist niet verwacht dat complement een grote rol zou spelen. Dit veranderde echter toen men erachter kwam dat aantrekking en stimulatie van neutrofielen (een type immuuncel) door complementmolecuul C5a een cruciaal onderdeel was van het ziekteproces van AAV. Vervolgens heeft verder onderzoek geleid tot de ontwikkeling en goedkeuring van avacopan, een molecuul dat de receptor voor C5a blokkeert zodat neutrofielen minder sterk worden geactiveerd. Activatie van het complementsysteem wordt dus in veel reumatische ziektes gezien, maar het blokkeren van complement met medicijnen is slechts bij enkele van deze ziektes effectief.

Tuberculose (TBC) kan voorkomen als een actieve ziekte, of in latente vorm. De diagnose van TBC is nog altijd lastig te stellen, omdat huidige testen geen onderscheid maken tussen de actieve en de latente vorm, of erg lang duren alvorens een conclusie kan worden getrokken. Dit is vooral een probleem in landen waar TBC veel voorkomt en dus een aanzienlijk deel van de bevolking een latente tuberculose-infectie heeft. TBC komt meestal voor in de longen, maar kan ook andere organen infecteren, waaronder de ogen (genaamd TBC uveitis). Hierbij is diagnose met de huidige testen nog lastiger vanwege de geringe bereikbaarheid. In **hoofdstuk 3** konden we de waarde van C1q als biomarker bevestigen om actieve TBC in de longen aan te tonen en vaststellen dat er een verband is tussen de concentratie van C1q in serum en de aanwezigheid van TBC uveitis. Daarnaast vonden we een negatieve correlatie tussen hoge C1q concentratie in serum enerzijds, en de transcriptie van een eerder gepubliceerde groep genen die door interferon gestimuleerd worden anderzijds. Door te kijken naar de combinatie van de C1q concentratie en de transcriptie van interferon-gestimuleerde genen, konden we gezonde mensen bijna volledig onderscheiden van patiënten met actieve TBC in de longen. Op deze manier kunnen deze testen mogelijk in de toekomst deel gaan uitmaken van TBC diagnostiek.

Hoofdstuk 4 beschrijft ons onderzoek naar complement en autoantilichamen tegen complement tijdens zwangerschap en de complicatie pre-eclampsie, ook wel zwangerschapsvergiftiging. Dit is een aandoening die tijdens de tweede helft van de zwangerschap aan het licht komt bij 3% tot 5% van de zwangerschappen en die zich kenmerkt door eiwitverlies in de urine en een te hoge bloeddruk. Deze aandoening stopt pas weer na de bevalling. In dit onderzoek hebben we de concentraties C1q en factor H, een remmer van het complementsysteem, gemeten. Dit deden we in serummonsters van niet zwangere vrouwen, vrouwen met een gezonde zwangerschap en vrouwen met pre-eclampsie tijdens hun zwangerschap, afkomstig uit Nederland, Finland en Noorwegen. In het eerste deel zagen we een hogere concentratie van zowel C1q als factor H in het serum van zwangere vrouwen vergeleken met niet zwangere vrouwen.

Mogelijk wordt dit met opzet door het lichaam gedaan, omdat C1q een rol speelt bij de aanleg van nieuwe bloedvaten en het modelleren van weefsel, beide processen die nodig zijn in een placenta. Factor H kan daarentegen activatie van complement remmen en zou zo onbedoelde schade kunnen voorkomen tijdens de aanleg van de placenta. In **hoofdstuk 4** onderzochten we ook autoantilichamen tegen C1q en factor H, maar de aanwezigheid hiervan verschilde niet tussen vrouwen met en zonder pre-eclampsie. De concentratie van factor H was echter lager in vrouwen met pre-eclampsie dan in vrouwen met een gezonde zwangerschap. Het verschil tussen deze groepen werd voornamelijk veroorzaakt door de gevallen van pre-eclampsie met vroege aanvang, waarbij de bevalling plaatsvindt voor de 34^e week van de zwangerschap voorbij is. De resultaten van dit onderzoek suggereren een rol voor C1q en factor H tijdens zwangerschap, en brengt een verlaagde concentratie factor H in verband met de ziekte pre-eclampsie.

De reumatische ziekte systemische sclerose, die we in **hoofdstuk 5** hebben onderzocht, kenmerkt zich door fibrose, een soort littekenvorming van de huid en interne organen. Dit komt bij veel patiënten ook voor in de longen, waar we het longfibrose noemen, wat bijdraagt aan de ernst van deze aandoening. Een eerder onderzoek bracht autoantilichamen tegen C1q in verband met longfibrose in patiënten met systemische sclerose. Om een betere voorspelling te kunnen maken van welke patiënten longfibrose krijgen, zijn we ook anti-C1q gaan meten in patiënten met systemische sclerose in het Leids Universitair Medisch Centrum. Echter kwamen we tot de conclusie dat anti-C1q autoantilichamen geen goede voorspellende waarde hebben voor longfibrose in systemische sclerose. Bovendien zagen we dat de meerderheid van systemische sclerose patiënten met anti-C1q ook al autoantilichamen had tegen het molecuul topoisomerase. Deze autoantilichamen zijn op zichzelf al geassocieerd met longaandoeningen binnen systemische sclerose, wat helaas af zou doen aan enige toegevoegde waarde van anti-C1q metingen voor systemische sclerose patiënten.

In **hoofdstuk 6** beschreven we het onderzoek naar de moleculaire karakteristieken van anti-C1q autoantilichamen. Hierbij hebben we specifiek de B cellen die anti-C1q produceren geïsoleerd uit gezonde donoren en het genetisch materiaal hier uitgehaald. Daarmee konden we in totaal 9 verschillende anti-C1q antilichamen namaken en onderzoeken. Tot nu toe waren vooral antilichamen in serum van donoren onderzocht, met als nadeel dat men altijd een mix van verschillende antilichamen onderzocht zonder de exacte samenstelling of concentratie te weten. De antilichamen waren allemaal van het IgG type (het meest voorkomende type in menselijk bloed) en hadden een aanzienlijk aantal mutaties in het variabele deel. Dit betekent dat de B cellen die deze antilichamen produceren een behoorlijke ontwikkeling hebben doorgemaakt, waarschijnlijk met hulp

en stimulatie van andere immuuncellen. Verder hebben we bevestigd dat de anti-C1q autoantilichamen inderdaad specifiek zijn voor ligand-gebonden C1q en hebben we binding van anti-C1q aan C1q gemeten terwijl C1q gebonden was aan verschillende natuurlijke liganden, zoals antilichamen, CRP en dode cellen.

Experimenten om competitie te meten tussen antilichamen lieten zien dat onze anti-C1q autoantilichamen op te delen zijn in 2 groepen, waarbij elke groep aan een ander deel van C1q bindt. C1q bestaat uit 6 koppen die elk een collageenachtige staart hebben. De staarten zitten aan elkaar vast en vormen samen de collageenachtige regio. In onze experimenten zagen we dat alle anti-C1q autoantilichamen aan de collageenachtige regio van C1q binden. Door middel van elektronenmicroscopie toonden we aan dat een van de antilichamen dichtbij de koppen van C1q bindt, en tevens dat meerdere van deze identieke antilichamen tegelijk aan hetzelfde C1q molecuul kunnen binden. De antilichamen die we in **hoofdstuk 6** hebben nagemaakt waren afkomstig van gezonde donoren, echter is het ook interessant om te weten wat we op basis van deze antilichamen kunnen leren over anti-C1q autoantilichamen in SLE patiënten. Daarom voerden we opnieuw experimenten uit om competitie te bekijken, dit keer tussen onze geïsoleerde anti-C1q en anti-C1q in het serum van SLE patiënten. Hieruit bleek dat beide groepen anti-C1q binden op dezelfde of vergelijkbare plekken op C1q.

Wanneer antilichamen binden aan hun doelwit, kunnen ze verschillende andere delen van immuunsysteem activeren, afhankelijk van het type antilichaam. Antilichamen van het type IgG1, zoals onze nagemaakte anti-C1q, kunnen zowel C1q binden om complement te activeren alsook om Fc receptoren op immuuncellen activeren. In hoeverre beide ook daadwerkelijk gebeurt hangt af van verschillende omstandigheden, zoals de manier waarop het antilichaam aan zijn doelwit bindt. Daarom onderzochten we welke mechanismen geactiveerd worden wanneer anti-C1q aan ligand-gebonden C1q bindt. De toevoeging van anti-C1q aan ligand-gebonden C1q zorgde niet voor extra activatie van complement, maar wel voor binding en activatie van immuuncellen via Fc receptoren. Op basis van deze gegevens konden we een hypothese opstellen voor de rol van anti-C1q in het ziekteproces van nierontsteking in SLE patiënten (lupus nefritis). Uit de literatuur is bekend dat immuuncomplexen (dat zijn clusters van antilichamen en hun doelwitten) in de nieren cruciaal zijn voor de ziekmakende invloed van anti-C1q. Bovendien zijn zowel complement activatie als Fc receptoren nodig. Aan de immuuncomplexen bindt C1q, wat zorgt voor complement activatie. Volgens onze hypothese zorgt deze complement activatie niet meteen voor de schade aan de nier, maar geactiveerde stukjes van complementmoleculen trekken wel immuuncellen aan. De Fc receptoren op deze immuuncellen kunnen echter niet aan de immuuncomplexen

binden, omdat C1q daar al op zit en de bindingsplaats blokkeert. Wanneer anti-C1q autoantilichamen vervolgens aan C1q binden, kunnen Fc receptoren op hun beurt aan anti-C1q antilichamen binden. Hierdoor raken de immuuncellen met Fc receptoren geactiveerd en scheiden ze schadelijk stoffen uit, die de nieren beschadigen. Dit hele proces is echter afhankelijk van de aanwezigheid van immuuncomplexen die neerslaan in de nier; in SLE patiënten komen deze immuuncomplexen vaak voor. Gezonde personen, zoals de donoren waaruit wij anti-C1q autoantilichamen hebben geïsoleerd, hebben normaalgesproken vrijwel geen immuuncomplexen in hun bloed, waardoor ze geen nierontsteking ontwikkelen ondanks de anti-C1q autoantilichamen.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek laat zien dat complement, en met name C1q, naast zijn traditionele rol in de afweer tegen infecties ook ziekmakende effecten heeft, bijdraagt aan gezonde fysiologie en een therapeutisch doelwit en een diagnostisch hulpmiddel is. Daarnaast hebben de studies naar anti-C1q autoantilichamen geleid tot nieuw inzicht in hun moleculaire kenmerken en immunologische invloed. Met dit werk hopen we aanleiding te geven tot verder onderzoek naar C1q en anti-C1q autoantilichamen, en een basis te vormen voor toekomstige klinische toepassing.