



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Immunity against post-translationally modified proteins in autoimmune diseases

Beukel, M.D. van den

Citation

Beukel, M. D. van den. (2025, November 18). *Immunity against post-translationally modified proteins in autoimmune diseases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4283341>

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/1887/4283341>

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

Nederlandse samenvatting

Auto-immuunziekten zijn aandoeningen waarbij het immuunsysteem ten onrechte zijn eigen gezonde cellen, weefsels of organen aanvalt. Dergelijke ziekten worden vaak gekenmerkt door chronische ontstekingen. Aandoeningen zoals reumatoïde artritis (RA), systemische lupus erythematoses (SLE) en auto-immuun leverziekte (AILD) illustreren de diversiteit en complexiteit van auto-immuunziekten. Deze heterogene ziektebeelden worden gekenmerkt door de aanwezigheid van een breed scala aan autoantilichamen. Patiënten met RA hebben antilichamen tegen eiwitten die een post-translationale modificatie (PTM) hebben ondergaan. Antilichamen gericht tegen de modificatie citrullinatie (anti-citrullinated protein antibodies; ACPA) zijn opgenomen in de 2010 reumatoïde artritis classificatie criteria. Antilichamen gericht tegen de modificatie carbamylatie (anti-carbamylated protein; anti-CarP) zijn naar verluidt geassocieerd met radiologische progressie, vooral bij ACPA-negatieve personen. Andere auto-immuunziekten zoals SLE en AILD worden gekenmerkt door de aanwezigheid van onder andere anti-nucleaire antilichamen. Deze antilichamen zijn pathogeen gebleken en geassocieerd met ernstige klinische complicaties bij SLE en helpen bij de diagnose van AILD.

Het is belangrijk om op te merken dat binnen alle drie de auto-immuunziekten (RA, SLE en AILD) veel subgroepen aan patiënten bestaan. Deze subgroepen worden gekarakteriseerd door aanwezigheid van specifieke autoantilichamen, verschillen in de snelheid van progressie en/of door de aanwezigheid van specifieke ziekte manifestaties. Daarnaast kunnen patiënten in dergelijke subgroepen verschillend reageren op specifieke behandelingen. Het is daarom belangrijk om onderzoek te doen naar serologische markers die relevante subgroepen binnen auto-immuunziekten kunnen identificeren om patiënten een betere behandeling te kunnen geven. In dit proefschrift richt ik mij op zes verschillende PTMs namelijk, nitratie (Nt), citrullinatie (Cit), carbamylatie (Ca), acetylatie (Ac), malondialdehyde acetaldehyde adducten (MAA) en advanced glycation end-producten (AGE) in de context van auto-immuniteit. In **Hoofdstuk 2**, hebben we anti-PTM antilichamen gericht tegen MAA- en AGE-gemodificeerde eiwitten onderzocht in een gerenommeerd RA cohort, namelijk het Leiden Early Arthritis Cohort, welke informatie bevatten over ACPA en anti-CarP. We zagen dat de aanwezigheid van anti-MAA en anti-AGE antilichamen een subgroep van RA patiënten identificeerde dat seronegatief was voor anti-CCP2, anti-CarP en reumafactor (RF). Aangezien HLA-DRB1*03 geassocieerd is met seronegatieve RA en met anti-CarP antilichamen in deze subgroep, hebben we de associatie tussen HLA-DRB1*03 en anti-MAA en anti-AGE onderzocht in deze studie. We zagen dat anti-MAA associeerde met HLA-DRB1*03 in het anti-CCP2 negatieve stratum, onafhankelijk van anti-CarP. Anti-AGE volgde dezelfde trend maar bereikte geen significantie. We zagen ook dat anti-MAA associeerde met inflammatie markers in vroege

artritis in zowel RA en non-RA artritis patiënten. Eerdere studies toonden aan dat anti-CarP geassocieerd was met verhoogde bot erosie bij anti-CCP2-negatieve RA patiënten. Om deze reden onderzochten we de associaties met radiologische gewrichtsschade bij deze patiënten. We zagen dat in patiënten met ACPA-negatieve RA, anti-AGE associeerde met radiologische progressie onafhankelijk van anti-CarP, wat kan suggereren dat deze anti-PTM een andere subgroep kan onderscheiden. Tot slot zijn er correlatie analyses gedaan om associaties tussen anti-PTM antilichaam positiviteit en aanhoudende medicatie vrije remissie te onderzoeken. Hier vonden we geen associatie tussen anti-MAA of anti-AGE met aanhoudende medicijnvrije remissie, ook niet na stratificeren voor ACPA status. Concluderend zijn anti-MAA en anti-AGE antilichamen beide relevant voor patiënten met RA, en andere inflammatoire reumatische aandoeningen. Hoewel niet specifiek voor RA, correleren ze beide met specifieke parameters. Anti-MAA associeert met HLA-DRB1*03 in ACPA-negatieve (RA) patiënten, onafhankelijk van anti-CarP, en associeert met inflammatie. Anti-AGE associeert met HLA-DRB1*03 in patiënten met ACPA-negatieve RA en associeert met een slechtere radiologische progressie, vooral bij patiënten met ACPA-negatieve en anti-CarP negatieve RA. In deze studie, hebben we een seropositieve subgroep (anti-MAA en anti-AGE positief) gekarakteriseerd binnen een heterogene groep van patiënten met RA dat tot op heden werd beschouwd als seronegatief (ACPA-, anti-CarP en RF-negatief).

Nu we hebben vastgesteld dat in RA, naast antilichaamresponsen tegen eiwitten gemodificeerd met citrulline of homocitrulline door citrullinatie en carbamylatie, respectievelijk, ook eiwitten gemodificeerd met andere PTMs kunnen worden herkend door autoantilichamen, hebben we dit daarom ook in andere auto-immuunziekten onderzocht. Auto-immuunziekten zoals SLE en AILD worden gekenmerkt door een breed scala aan autoantilichamen gericht tegen lichaamseigen eiwitten. Het is daarom aannemelijk dat deze patiënten antilichamen hebben die binden aan PTM-gemodificeerde eiwitten. In **Hoofdstuk 3**, hebben we anti-PTM antilichaam reactiviteiten onderzocht tegen alle zes de verschillende modificaties (Nt, Cit, Ca, Ac, MAA en AGE), in SLE patiënten. SLE patiënten staan bekend om hun brede verlies van zelftolerantie. Het is daarom aannemelijk dat anti-PTM antilichamen aanwezig zullen zijn. Aangezien het Leids Universitair Medisch Centrum een tertiair verwijscentrum is voor SLE-patiënten met neuropsychiatrische manifestaties (NPSLE), hadden wij de unieke gelegenheid om deze specifieke manifestatie nader te onderzoeken. Het identificeren van patiënten met NPSLE in het complexe ziektebeloop van SLE is een uitdaging en het zou zeer wenselijk zijn om serologische biomarkers te hebben om de diagnose te ondersteunen. In het gehele SLE cohort zagen we dat anti-MAA, anti-AGE en anti-CarP levels en positiviteit significant verhoogd waren ten opzichte van gezonde controles. Bovendien, anti-MAA en anti-AGE antilichaam levels correleerde negatief met complement C3 en C4 levels en correleerde positief met erythrocytbezinkingssnelheid (erythrocyte sedimentation rate; ESR), welke

systemische inflammatie impliceren. Interessant genoeg zagen we dat anti-MAA en anti-CarP meer voorkwamen in patiënten met major NPSLE dan in patiënten met andere SLE orgaan manifestaties. Daarbovenop, correleerde anti-MAA en anti-AGE met witte stof volume (white matter volume; WMV) en totaal brein volume (total brain volume; TBV), en anti-CarP met witte stof hyperintensiteit volume. Omdat WMV, TBV en witte stof hyperintensiteit volume objectieve markers zijn voor de betrokkenheid van het centrale zenuwstelsel bij SLE, leveren zij objectief bewijs, naast de multidisciplinaire beoordeling, om deze patiënten te diagnosticeren. Alle andere NPSLE activiteitsmarkers zijn meer subjectief, zoals bijvoorbeeld stemming. Samengenomen, anti-PTM antilichamen zouden kunnen helpen bij de diagnose en/of subgroepering van (NP)SLE. Toekomstige studies moeten de potentiële rol van anti-PTM antilichamen in (NP)SLE vaststellen.

In **Hoofdstuk 4** onderzochten we anti-PTM antilichaam responsen tegen onze set van zes PTM-gemodificeerde eiwitten in patiënten met autoimmuun lever ziektes (AILD). AILD is een heterogene groep van cholestatische en hepatocellulaire ziekten, bestaande uit primaire biliare cholangitis (PBC), primaire scleroserende cholangitis (PSC), auto-immuun hepatitis (AIH) en overlappende varianten. PBC, PSC en AIH worden vaak gezien als (auto-)immuun gemedieerde ziekten en AIH en PBC worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van autoantilichamen en verhoogd totaal immunoglobuline. Daarnaast worden autoantilichamen tegenwoordig gebruikt in de diagnostische work-up, maar zijn ze niet ziekte specifiek. We observeerden dat anti-PTM antilichamen gericht tegen Ca-, Ac-, MAA- en AGE-gemodificeerde eiwitten waren verhoogd in patiënten met AILD ten opzicht van gezonde controles. Naast enkel-positiviteit werd ook positiviteit voor meer dan één anti-PTM antilichamen geanalyseerd. We zagen dat patiënten met AILD vaker minstens één type anti-PTM antilichaam hadden ten opzichte van niet-AILD en gezonde controles. Omdat AILD uit drie subgroepen bestaat, zijn anti-PTM antilichaam responsen vastgesteld in deze subgroepen. Patiënten met AIH waren significant vaker positief voor anti-MAA, anti-AGE, anti-CarP en anti-Cit vergeleken met patiënten met cholestatische lever ziekten (PBC en PSC). Binnen patiënten met AIH correleerde de aanwezigheid van anti-MAA en anti-AGE positief met complete biochemische remissie (CBR) na 3 maanden. Daarnaast associeerde anti-MAA, anti-AGE, en anti-CarP positief met het bereiken van CBR na 12 maanden. Gebaseerd op de bevinding dat positiviteit voor meerdere anti-PTM antilichamen meer voorkwam in patiënten met AIH, hebben we gepoogd de klinische relevantie van het hebben van deze meerdere anti-PTM reactiviteiten te onderzoeken. Na 3 maanden behandeling hadden significant meer AIH patiënten met minstens drie anti-PTM antilichamen CBR bereikt. Na 12 maanden behandeling was het verschil nog steeds significant. Over het geheel genomen werd een trend naar significantie voor de tijd tot CBR (in jaren) gevonden wanneer patiënten positief waren voor meerdere anti-PTM antilichamen. Samenvattend zijn anti-PTM antilichamen aanwezig in patiënten met AILD. Sommige patiënten zijn positief voor meerdere anti-PTM antilichamen. Het hebben

van drie of meer anti-PTM antilichaam responsen is geassocieerd met een gunstigere reactie op de behandeling in AIH. Direct na publicatie van onze bevindingen in Hoofdstuk 4 werd er een reactie gepubliceerd (toegevoegd aan **Hoofdstuk 4**) waarin de auteurs zich afvroegen of we enkel anti-PTM antilichamen detecteerde of (ook) polyreactive IgG. In een antwoord op dit commentaar (toegevoegd aan **Hoofdstuk 4**) verduidelijkte wij onze methoden en konden we toelichten dat we in onze experimentele set-up mock-gemodificeerde FCS includeerde om te kunnen corrigeren voor reactiviteit tegen FCS. Dit bevestigd dat we IgG antilichamen detecteerde die specifiek gericht zijn tegen PTM gemodificeerde eiwitten.

Interessant is dat veel patiënten met auto-immuunziekten, waaronder RA, SLE en AIH, baat hebben bij B-cel gerichte therapie, wat wijst op een (pathogene) rol voor B-cellen en/of antilichamen. Wat deze B-cellen aanzet tot autoreactiviteit staat momenteel ter discussie. In **Hoofdstuk 5** wordt beschreven dat PTM-gemodificeerde eiwitten het complement systeem kunnen activeren welke op haar beurt kan leiden tot klaring, chronische inflammatie en/of auto-immuniteit.

In deze context hebben we onze set van zes PTMs (Nt, Cit, Ca, Ac, MAA and AGE) onderzocht op hun vermogen om complement eiwitten te binden en te activeren. Eiwitten (fetal calf serum) gemodificeerd met deze PTMs werden eerder gebruikt om IgG antilichaam reactiviteit te bepalen in de RA, SLE en AILD cohorten beschreven in de **Hoofdstukken 2, 3 en 4**. We hebben nu de antilichaam profielen zoals gevonden in RA, SLE en AILD tegen alle zes de PTMs gecombineerd in **Hoofdstuk 5** om zo de aanwezigheid van combinaties van anti-PTM antilichamen in auto-immuniteit te onderzoeken. Interessant genoeg, zagen we dat antilichamen tegen Cit-, Ca-, Ac-, MAA- en AGE-gemodificeerde eiwitten het vaakst samen voorkwamen. Om te bestuderen hoe PTM-gemodificeerde eiwitten betrokken zouden kunnen zijn bij deze chronische auto-immuunziekten zijn we op zoek gegaan naar plasma eiwitten die binden aan PTM-gemodificeerde eiwitten. Met behulp van massa spectrometrie hebben we vanuit humaan serum vooral complement factoren geïdentificeerd die specifiek binden aan PTM-gemodificeerde eiwitten met de PTMs Ca, Ac, MAA en AGE in vergelijking met niet-gemodificeerde eiwitten. Om directe binding en activatie van complement op Ca-, Ac-, MAA- en AGE-gemodificeerde eiwitten aan te tonen hebben we bindingsassays met gezuiverd complement eiwitten en complement activatie assays uitgevoerd. We bevestigde dat complement inderdaad direct bindt aan PTM-gemodificeerde eiwitten, zonder de tussenkomst van antilichamen. Aangezien het complement systeem bestaat uit drie activatie routes (klassieke, lectine en alternatieve) hebben we ernaar gestreefd om te kunnen vaststellen welke complement route betrokken was bij complement activatie door de verschillende types PTM-gemodificeerd eiwitten. We zagen dat Ca-, MAA- en AGE-gemodificeerde eiwitten de klassieke route activeerde en verifieerde dat Ac-gemodificeerde eiwitten de lectine route activeren.

Het complement systeem staat bekend om haar opruimfunctie maar is ook bekend als link tussen aangeboren en verworven immuniteit via complement receptoren. We zijn daarom begonnen met het onderzoeken van cellen uit volbloed en THP-1 macrofagen, als model voor meer weefsel macrofagen. Voor dit doel hebben we PTM-gemodificeerde eiwitten gekoppeld aan beads om langlevende eiwitten na te bootsen die PTMs kunnen accumuleren. Vervolgens hebben deze beads geïncubeerd met complement actief serum om de beads te opsoniseren met complement. We zagen dat leukocyten en THP-1 macrofagen een verhoogde binding en opname van complement geopsoniseerde PTM-gemodificeerde eiwit gekoppelde beads lieten zien ten opzichte van niet-geopsoniseerde PTM-gemodificeerde eiwit gekoppelde beads of niet-gemodificeerde eiwit gekoppelde beads. Als laatste hadden we de mogelijkheid om data betreffend single nucleotide polymorfismen (SNPs) van complement genen in een set van RA patiënten, waarin we ook anti-PTM reactiviteiten hebben gemeten, te gebruiken. Hiervoor hebben we associatiestudies uitgevoerd tussen de aanwezigheid van anti-PTM antilichamen en SNPs in complement genen waarvan bekend is dat ze belangrijk zijn bij de activiteit van het complement systeem. We zagen dat minor allel factor H SNPs, waarvan eerder was aangetoond dat ze de complementactiviteit verhogen, geassocieerd waren met de aanwezigheid van anti-Ac, -MAA en -AGE. Aanwezigheid van het minor allel van rs2230199 (C3) associeerde met de aanwezigheid van anti-CarP. Deze data suggereert inderdaad een link tussen het zogenaamde "complotype" en het ontstaan van anti-PTM antilichamen. Met deze studie benadrukken we dat complement geactiveerd wordt door specifieke PTMs en dat verschillende complement activatie routes geactiveerd worden door verschillende PTMs. Concluderend kunnen we stellen dat PTM-gemodificeerde eiwitten complement binden en activeren, wat inflammatie en fagocytose verhoogd, en wat kan bijdragen aan de vorming van anti-PTM antilichamen.

Zoals samengevat en bediscussieerd in **Hoofdstuk 6**, laat het onderzoek beschreven in dit proefschrift zien dat PTMs en anti-PTM antilichamen associëren met ziekte progressie en respons op behandeling. Daarnaast kan detectie van anti-PTM antilichamen worden gebruikt om subgroepen te onderscheiden in een aantal auto-immuunziekten. Verdere studies moeten worden uitgevoerd om de potentiële diagnostische en prognostische waarde binnen elke groep vast te stellen. Het is duidelijk geworden dat sommige PTMs en anti-PTM antilichamen betrokken zijn bij (chronische) inflammatie, omdat we in de verschillende cohorten terugkerende associaties zagen tussen anti-PTM antilichamen en markers van inflammatie. Of deze antilichamen ontstekingen veroorzaken of een gevolg zijn van (chronische) ontstekingen moet in de toekomst worden onderzocht. Wij hebben echter vastgesteld dat complement eiwitten direct binden aan PTM-gemodificeerde eiwitten en dat zij daarmee klaring verhogen. Afhankelijk van het complotype kan dit proces leiden tot (aanhoudende) inflammatie en autoantilichaam productie. Het gepresenteerde onderzoek dringt daarom aan op verder onderzoek naar complement

in de inductie van anti-PTM antilichamen *in vivo* en daarbij gebruik te maken van complement deficiënte muizen. Naast dit fundamentele onderzoek moeten ook studies naar therapeutische mogelijkheden worden opgezet. Strategieën moeten worden ontwikkeld om specifiek anti-PTM reactive B cellen te depletieren en ook mogelijkheden om specifiek complement activatie gedreven door PTMs te inhiberen. Ons team heeft recent bispecifieke antilichamen ontwikkeld welke met één arm binden aan het PTM-gemodificeerde eiwit en met de andere arm een endogene complement inhibitor aantrekt om zo complement activatie te remmen op de PTMs. Deze strategie zou passen in de voorgestelde interventies die gericht zijn op aanhoudende immunologische remissie die leidt tot aanhoudende (geneesmiddelvrije) remissie.

Alles bij elkaar genomen, wordt in dit proefschrift bewijs geleverd dat immuniteit tegen PTMs een rol speelt in een variëteit aan auto-immuunziekten. Verder onderzoek naar PTMs en anti-PTM antilichaam inductie is nodig om specifiek gerichte behandelingsopties vast te stellen voor patiënten die streven naar aanhoudende immunologische remissie.