



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Anti-citrullinated protein antibody B cells in rheumatoid arthritis: from disease-driving suspects to therapeutic targets

Kroos, S.

Citation

Kroos, S. (2026, February 10). *Anti-citrullinated protein antibody B cells in rheumatoid arthritis: from disease-driving suspects to therapeutic targets*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4289572>

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/1887/4289572>

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



ADDENDUM

**Nederlandse samenvatting
Publications
Curriculum vitae
Acknowledgements**

Nederlandse samenvatting

Reumatoïde artritis (RA) is een chronische auto-immuunziekte waarbij patiënten met name last hebben van gewrichtsontstekingen. Ongeveer één op de honderd tot tweehonderd mensen lijdt aan deze ziekte. Hoewel bestaande medicatie in veel gevallen effectief zijn in het onderdrukken van ziekteactiviteit, gaan deze vaak gepaard met bijwerkingen en zijn ze niet voor alle patiënten werkzaam: in sommige gevallen blijft de ziekteactiviteit, ondanks therapie, hoog. Er is daarom behoefte aan meer toegespitste therapieën die zich specifiek richten op de pathogene mechanismen van RA, zonder het gehele immuunsysteem te onderdrukken. Voor de ontwikkeling van dergelijke therapieën is een beter begrip van de onderliggende ziekteprocessen noodzakelijk.

B-cellen spelen een belangrijke rol in RA. In normale omstandigheden produceren B-cellen antilichamen tegen lichaamsvreemde moleculen, ook wel antigenen genoemd, afkomstig van bijvoorbeeld virussen en bacteriën, die zij herkennen via hun B-celreceptor (BCR). Deze antilichamen faciliteren de eliminatie van indringers, ook wel pathogenen genoemd, door het immuunsysteem. In sommige gevallen treden fouten op, waardoor B-cellen lichaamseigen structuren als vreemd bestempelen. Deze autoreactiviteit kan resulteren in een abnormale immuunrespons en uiteindelijk bijdragen aan het ontstaan van auto-immuunziekten zoals RA. Om beter te begrijpen hoe deze autoreactieve B-cellen ontstaan, persisteren en een aangrijpingspunt kunnen vormen voor therapie, is een gedetailleerde analyse van hun fenotype en functionele kenmerken essentieel.

In RA herkennen autoreactieve B-cellen verschillende veranderingen aan eiwitten die zijn ontstaan na de vorming van het eiwit: de zogenaamde posttranslationele modificaties. De best bestudeerde modificatie is een gevolg van citrullinatie, waarbij een verandering van arginine resulteert in citrulline. Na activatie door gecitrullineerde antigenen produceren deze B-cellen anti-gecitrullineerd eiwit antilichamen (ACPA). Waar normale B-cellen na activatie terugkeren naar een rusttoestand, blijven ACPA-B-cellen opvallend genoeg persisteren in een geactiveerde staat, zelfs bij patiënten in klinische remissie. Deze aanhoudende activatie zou kunnen verklaren waarom veel RA-patiënten een terugval ervaren bij het staken van medicatie. De hypothese is dan ook dat ACPA-B-cellen een drijvende kracht zijn achter de chronische aard van RA, en daarmee een aantrekkelijk therapeutisch doelwit vormen.

Hoofdstuk 1 bevat een overzicht van de B-celbiologie met aandacht voor B-celontwikkeling, BCR-sigtaaltransductie en regulatiemechanismen die onder normale omstandigheden autoreactiviteit voorkomen. Ook komen de verschillende functies van antilichamen aan bod. Vervolgens worden de ziekte RA en de betrokkenheid van ACPA en ACPA-B-cellen geïntroduceerd. De daaropvolgende hoofdstukken behandelen experimenteel onderzoek naar het ontstaan, de activatie en de gerichte bestrijding van deze ACPA-B-cellen.

Hoewel het merendeel van het onderzoek zich richt op de geheugen ACPA-B-cellen, beschrijft **hoofdstuk 2** een analyse van naïeve ACPA-B-cellen: cellen die nog geen antigeen zijn tegengekomen en derhalve niet geactiveerd zijn. Door gebruik te maken van de ACPA-B-cel-specifieke kleuringstechniek konden deze cellen worden geïsoleerd en geanalyseerd. Hierbij werd een aanzienlijke mate van

aspecificiteit vastgesteld met reactiviteit tegen streptavidine, een component van de kleuringsmethode, in plaats van citrulline. Deze bevinding leidde tot aanpassing van de kleuring: sindsdien worden zowel citrulline- als arginine-bevattende peptiden via streptavidine geconjugeerd aan fluorochromen, om reactiviteit tegen streptavidine beter uit te kunnen sluiten. Desondanks werd één echte naïeve ACPA-B-cel geïdentificeerd, zonder somatische hypermutaties en met kruisreactiviteit voor citrulline en homocitrulline. Deze waarneming suggereert dat autoreactieve, zelfs kruisreagerende, B-cellen reeds kunnen bestaan vóór antigeencontact.

Hoofdstuk 3 beschrijft een onderzoek naar de potentiële betrokkenheid van het Epstein-Barr virus (EBV) bij het ontstaan van ACPA-B-cellen. EBV infecteert B-cellen en blijft levenslang latent aanwezig. Aangezien RA-patiënten een afwijkende immuunrespons op EBV vertonen, werd onderzocht of het virus zich specifiek in ACPA-B-cellen bevindt en deze cellen zodoende immuunselectie kunnen omzeilen. ACPA-B-cellen werden geïsoleerd met behulp van de ACPA-B-cel kleuringstechniek, *in vitro* vermenigvuldigd en geanalyseerd voor de aanwezigheid van EBV-DNA. Hoewel positieve controles het virus aantoonbaar maakten, kon EBV niet worden gedetecteerd in ACPA-B-cellen. Dit wijst erop dat EBV niet op directe wijze bijdraagt aan het ontstaan of voortbestaan van ACPA-B-cellen.

Hoofdstuk 4 behandelt de actieve status van ACPA-B-cellen. De hypothese dat deze cellen voortdurend antigeen tegenkomen en daardoor via hun BCR geactiveerd blijven, werd getoetst door de mate van activatie van intracellulaire signaalmoleculen stroomafwaarts van de BCR te meten. Er wordt een methode beschreven om dit op een gestandaardiseerde manier uit te voeren en artefacten, door de kleuring zelf, te vermijden. Vervolgens werd deze methode toegepast op B-cellen van RA-patiënten. ACPA-B-cellen vertoonden hogere niveaus van BCR-gerelateerde geactiveerde eiwitten dan controle B-cellen gericht tegen tetanus toxoïde. Deze bevinding ondersteunt de hypothese dat ACPA-B-cellen chronisch antigeen-gemedieerd geactiveerd zijn, wat mogelijk ten grondslag ligt aan het immunologisch actieve karakter van RA.

Hoofdstuk 5 beschrijft een literatuurstudie naar bestaande en opkomende antigeenspecifieke strategieën om autoreactieve B-cellen selectief te elimineren, zonder de gehele B-celpopulatie te onderdrukken. Onder andere antigen-drug-conjugaten, die specifiek binden aan autoreactieve B-cellen en celdood induceren en celtherapieën met gemodificeerde afweercellen (bijv. CAR-T en CAAR-T cellen) worden besproken. De diverse benaderingen worden geëvalueerd op werkzaamheid, specificiteit, ontwikkelingsstatus en klinisch potentieel.

Hoofdstuk 6 en **hoofdstuk 7** beschrijven experimentele studies naar twee antigeenspecifieke therapieën gericht tegen ACPA-B-cellen. In **hoofdstuk 6** wordt CCP4, een gecitrullineerd peptide, gekoppeld aan de cytotoxische stof monomethyl auristatin E (MMAE), onderzocht. Aanvankelijk werden CCP4-dimeren gegenereerd met één MMAE molecuul per dimeer, maar deze induceerden geen specifieke celdood, ondanks succesvolle opname en verwerking in de target cellen. Vervolgens werden CCP4-MMAE-polymeren ontwikkeld, met 13 CCP4-moleculen per polymeer en variabele MMAE-belading. Deze polymeren veroorzaakten wel effectieve, dosisafhankelijke celdood van ACPA-B-celmodellen, terwijl niet-ACPA-B-cellen gespaard bleven. Dit bevestigt de haalbaarheid van antigeenspecifieke B-celdepletie via cytotoxische conjugaten.

In **hoofdstuk 7** wordt een alternatieve strategie onderzocht: een "bispecific complement engager" (BiCE) waarin CCP4 gekoppeld is aan een nanobody die gericht is tegen complement component C1q. Deze BiCEs bleken in staat om complementafhankelijke celdood specifiek in ACPA-B-celmodellen te veroorzaken. Hoewel circulerende ACPA-antilichamen de effectiviteit van BiCEs *in vitro* deels konden neutraliseren, bleek dosisverhoging dit effect te kunnen compenseren. Tenslotte werden BiCEs getest op afweercellen van ACPA-positieve RA-patiënten en wordt het potentieel van deze antigeenspecifieke therapie onderschreven.

Tenslotte worden in **hoofdstuk 8** alle resultaten en inzichten van dit proefschrift samengevat en bediscussieerd in de context van bestaande literatuur.

