

University of Groningen

## B cell phenotype and function in granulomatosis with polyangiitis

Land, Judith

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Land, J. (2016). *B cell phenotype and function in granulomatosis with polyangiitis: Towards prediction of relapse*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# chapter 9

Nederlandse samenvatting



## Achtergrond

Vasculitis is een verzamelnaam die gebruikt wordt voor ziektes waarbij de bloedvaatwanden ontstoken zijn. Binnen de vasculitis bestaat er een subgroep van ziektebeelden die gekenmerkt zijn door de aanwezigheid van autoantilichamen, anti-neutrofiële cytoplasma antilichaam (ANCA) geassocieerde vasculitis (AAV). Deze term omvat onder andere granulomatose met polyangiitis (GPA) en microscopische polyangiitis (MPA). Bij GPA en MPA zijn de aanwezige ANCA gericht tegen eiwitten in de neutrofiële granulocyten en monocyten, genaamd proteïnase 3 (PR3) en myeloperoxidase (MPO). Deze systemische auto-immuun syndromen tasten met name de kleine bloedvaten aan, welke zich bijvoorbeeld bevinden in de nieren en de longen. Door de vaatontsteking raakt de bloedtoevoer belemmerd, en daarmee de aanvoer van essentiële stoffen. Dit kan leiden tot necrose, een vorm van celdood, in weefsels. Bij necrose komt de inhoud van de cel vrij, welke de omliggende cellen kan aantasten. Ook de immuuncellen die aangetrokken worden door dit proces kunnen schade berokkenen aan de omgeving.

AAV kan zich in verschillende organen voor het eerst manifesteren en leidt vaak in eerste instantie tot algemene klachten zoals vermoeidheid en koorts. Daarnaast zijn het zeldzame aandoeningen, zo komt GPA slechts voor in 1 : 8000 inwoners. Als zodanig wordt AAV niet altijd snel gediagnosticeerd. Eén van de belangrijkste stappen in het stellen van een diagnose is het meten van ANCA in het bloed. In de meerderheid van de patiënten met GPA komen PR3-ANCA voor, terwijl het bij MPA meestal MPO-ANCA zijn. Daarnaast wordt er een biopt genomen, waarbij een stukje aangetast weefsel wordt weggenomen voor analyse. Bij AAV begint de behandeling doorgaans met een combinatie van prednison, een bijnierschorsormoon met ontstekingsremmende werking, en cyclofosfamide dat het immuunsysteem onderdrukt. Cyclofosfamide is een agressieve behandeling, welke leidt tot meerdere bijwerkingen. Gezien het toxische effect van de behandeling wordt deze langzaam afgebouwd. Echter, een groot deel van de patiënten krijgt te maken met opvlammingen van ziekteactiviteit, een recidief genoemd. Dit komt vooral voor bij PR3-ANCA positieve GPA patiënten, waarbij ongeveer 50% van de patiënten binnen 5 jaar een recidief meemaakt. Elk recidief gaat gepaard met toenemende schade in de betrokken organen. Indien er een manier zou zijn om een aankomend recidief te voorspellen zouden patiënten tijdig behandeld kunnen worden om de opvlamming mogelijk te voorkomen. Hiervoor wordt gezocht naar biomarkers, kenmerken die objectief gemeten kunnen worden als indicator van het pathogene proces. Het meten van ANCA in het serum is veelvuldig onderzocht op zijn voorspellende waarde voor recidieven. Hierbij wordt het serum in stappen verdund en bepaald bij welke verdunning de antistoffen nog zichtbaar zijn (ANCA-titer), als indicatie voor de hoeveelheid ANCA in de circulatie. De studies hierover zijn echter niet in overeenstemming. Waar sommigen een duidelijke connectie zien tussen het toenemen van de ANCA-titer en een recidief, vinden andere studies deze

connectie niet. Als zodanig is het monitoren van alleen de ANCA-titer onvoldoende om interventies toe te passen.

Veel typen immuuncellen zijn betrokken bij de pathogenese van AAV, het onderzoek hier beschreven is gericht op de B-cel. De B-cel is een cruciale cel in het ziekteproces van AAV. Ten eerste als de voorloper van de plasmacel, welke de autoantilichamen produceert. Daarnaast kan de B-cel ook pro- en anti-inflammatoire functies uitoefenen door middel van cytokine productie. Cytokines zijn celsignalerende moleculen die de immuunsysteemreactie kunnen moduleren. Op basis van cytokine productie kunnen de B-cellen onderverdeeld worden in effector B-cellen, welke de immuunreactie stimuleren, en regulatoire B-cellen ( $B_{reg}$ ), die de immuunreactie onderdrukken. De laatste categorie wordt gekenmerkt door productie van de cytokine interleukine (IL)10. Dit is een regulerende cytokine, welke productie van pro-inflammatoire cytokines in andere immuuncellen kan inhiberen. Er zijn ook pogingen gedaan om de regulatoire B-cel te definiëren op basis van oppervlakte-markers, hoewel hier nog geen consensus over is. In 2010 werden twee verschillende mogelijke  $B_{reg}$  populaties beschreven. De eerste waren  $CD24^{high}CD38^{high}$  B-cellen, deze cellen produceerden meer IL10 dan andere B-cel populaties en waren in staat om de cytokine productie van T-cellen te remmen. De tweede beschreven populatie waren  $CD24^{high}CD27^{+}$  B-cellen, waar tevens een hogere IL10 productie geconstateerd werd en welke cytokine productie van monocyten kon onderdrukken. Recentelijk zijn echter nog andere B-cel populaties beschreven welke na stimulatie verhoogde productie van IL10 laten zien, zoals  $CD5^{+}$  B-cellen en plasmacellen.

## Dit proefschrift

Het onderzoek in dit proefschrift is voornamelijk gericht op het fenotype en de functie van B-cellen in patiënten met GPA, welke vergeleken zijn tussen patiënten met en zonder opvlaming van ziekteactiviteit. Hierbij is onderzoek gedaan naar de productie van ANCA, cytokines en de distributie van verschillende B-cel populaties.

Allereerst is in hoofdstuk 2 het bewijs voor en tegen een pathogene functie van ANCA beschreven. Meerdere experimenten duiden op een duidelijke pathogene rol van de autoantistoffen in het ontstaan van AAV. Zo is in muismodellen een vasculitis ziektebeeld geïnduceerd door middel van het toedienen van anti-MPO antistoffen. Daarnaast is er *in vitro* werk dat heeft aangetoond dat neutrofielen na stimulatie met pro-inflammatoire cytokines, zoals  $TNF\alpha$ , de antistoffen PR3 en MPO tot expressie brengen op het celmembraan. Wanneer ANCA hieraan binden, resulteert dit in productie van zuurstofradicalen. Vrije zuurstofradicalen zijn agressieve moleculen die schade kunnen aanrichten aan weefsels. Een aantal bevindingen doen twijfelen aan pathogeniciteit van de ANCAs. Zo zijn er autoantistoffen tegen MPO en PR3 gevonden in gezonde individuen, hoewel in veel lagere hoeveelheden dan in personen met AAV. Verder is er een kleine groep patiënten welke negatief test voor aanwezigheid

van ANCA. Een recente studie kan mogelijk deze laatste twee observaties verklaren door te kijken naar epitoopecificiteit. Het epitoopecificiteit is de plaats op het antigeen dat wordt herkend door het antilichaam. ANCA kunnen dus gericht zijn tegen verschillende epitopen op bijvoorbeeld het MPO molecuul. Roth en collega's vonden dat epitoopecificiteit verschilde tussen patiënten en controles en concludeerden dat niet alle ANCA pathogeen zijn, alleen degenen gericht tegen specifieke epitopen.

De mechanismen achter de inductie van ANCA zijn echter nog niet geheel duidelijk. Klinische observaties geven aan dat infecties een belangrijke rol spelen in de pathogenese van AAV. Zo werd in GPA een link gevonden tussen chronische aanwezigheid van *Staphylococcus aureus* in de neus en het risico op een recidief. Een veel grotere proportie van GPA patiënten (64%) draagt deze bacterie bij zich dan gezonde controles (20%) en behandeling met de antibiotica co-trimoxazole kan recidieven voorkomen. Immuncellen kunnen bacteriële producten herkennen via de Toll-like receptoren (TLR) wat mogelijk bijdraagt aan de inductie van ANCA productie. Dit werd onderzocht in hoofdstuk 3. Hier werden geïsoleerde perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC) gekweekt in aanwezigheid van IL21 en B-cel activerende factor (BAFF). In de literatuur is beschreven dat de combinatie van IL21 en BAFF leidt tot differentiatie van B-cellen naar antistof producerende plasmacellen. Stimulatie van PBMC *in vitro* met IL21 en BAFF leidde tot B-cel proliferatie, formatie van plasmacellen en de productie van PR3-ANCA. Wanneer hier de TLR9 agonist CpG-oligodeoxynucleotiden (CpG-ODN) aan toegevoegd werd, nam de productie van PR3-ANCA verder toe. CpG-ODN zijn korte synthetische DNA moleculen welke een vergelijkbaar effect geven als stimulatie met bacterieel DNA. Daarnaast resulteerde stimulatie met CpG-ODN ook in toegenomen expressie van IL21 en BAFF receptoren. Dit resultaat onderschrijft het belang van infecties in activatie van autoantistof productie in GPA.

Waar de ANCA gemeten in het serum een reflectie zijn van accumulatie over tijd, is het mogelijk dat een *in vitro* systeem het actuele pathogene proces beter weergeeft. Dit werd in meer detail onderzocht in hoofdstuk 4. Hierin wordt een prospectieve studie beschreven in 84 PR3-ANCA positieve GPA patiënten die tot 2 jaar gevolgd zijn. Bij elk bezoek aan de polikliniek werd bloed afgenomen en meerdere tests uitgevoerd. Zo werden beide de ANCA-titer en de *in vitro* productie van PR3-ANCA bepaald. Dit laatste niet alleen in PBMC gestimuleerd met de combinatie van CpG-ODN, BAFF en IL21 maar ook in cellen die gekweekt werden zonder extra stimulatie. Tijdens de studie werd in 16 patiënten een recidief waargenomen. Op moment van inclusie in de studie werden geen significante verschillen waargenomen tussen patiënten die wel en niet een recidief kregen tijdens de studie. Echter, in het laatste sample genomen voor het recidief waren hogere ANCA-titers en *in vitro* ANCA productie zichtbaar vergeleken met samples van patiënten zonder recidief. Verder werd gekeken naar de verandering over tijd, waarbij het verschil tussen de samples bij inclusie en het laatste sample voor de relapse werd bepaald en dit werd vergeleken met de veranderingen over tijd in

patiënten zonder recidief. Bij deze analyse was alleen een significante toename van de ANCA-titer zichtbaar en niet van *in vitro* PR3-ANCA. Dit laatste komt waarschijnlijk doordat in een aantal patiënten een zeer duidelijke toename van *in vitro* PR3-ANCA zichtbaar was voor het recidief, maar dit in anderen constant bleef of geen *in vitro* ANCA geproduceerd werd. Dit geeft aan dat het meten van *in vitro* ANCA productie geen goede maat voor het voorspellen van een recidief is voor alle GPA patiënten. Tevens is het niet efficiënter dan het meten van ANCA-titers, zeker niet gezien ANCA-titer bepalingen vele malen simpeler uit te voeren zijn. Het is echter interessant om te speculeren dat er een subgroep van patiënten bestaat waarin het meten van PR3-ANCA wel een recidief kan voorspellen, hoewel het een uitdaging zal zijn deze groep goed te identificeren.

Waar verder onderzoek naar gedaan is in **hoofdstuk 4**, is de B-cel subset distributie. In dezelfde PR3-ANCA positieve GPA patiënt populatie werd onderzocht of bepaalde B-cellen, of veranderingen in de distributie van de B-cellen, een recidief konden voorspellen. Hierbij werd gekeken naar de totale B-cellen, en deze werden verder onderverdeeld in transitionele B-cellen, naïeve B-cellen, geheugen B-cellen en mogelijke regulatoire B-cellen.

Eerst werden alle patiënten vergeleken met gezonde controles. Hieruit werd duidelijk dat GPA patiënten minder geheugen en CD24<sup>high</sup>CD27+ B-cellen en meer naïeve B-cellen hebben. Wanneer patiënten met en zonder opvlamming van ziekteactiviteit vergeleken werden, zagen wij voor het recidief een afname in het percentage geheugen B-cellen en een toename in het percentage naïeve B-cellen. Ook één van de beschreven mogelijke B<sub>reg</sub> populaties, de CD24<sup>high</sup>CD27+ B-cellen, namen af voor het recidief. De patiënten die een recidief krijgen, wijken dus meer af van de controles dan patiënten zonder recidief. Deze resultaten geven aan dat het monitoren van de B-cel subset distributie, vooral de geheugen B-cellen, interessant is met betrekking tot het voorspellen van opvlammingen van ziekteactiviteit.

Het belangrijkste kenmerk van de B<sub>reg</sub> is de productie van de immuunregulerende cytokine IL10. Productie van IL10 is in meerdere studies vergeleken tussen AAV patiënten en gezonde controles, zonder overeenstemmende conclusie. Nog onbekend was of voor een recidief nog veranderingen in de productie van IL10 optreden. Daarnaast kunnen B-cellen ook pro-inflammatoire cytokines produceren, zoals TNF $\alpha$ , IL2 en IFN $\gamma$ . In **hoofdstuk 5** is de productie van pro- en anti-inflammatoire cytokines door B-cellen vergeleken in GPA patiënten en controles en gerelateerd aan de B-cel subset distributie en toekomstige recidieven. De B-cellen van GPA patiënten maakten significant minder vaak de pro-inflammatoire cytokine TNF $\alpha$  dan controles, een verschil dat het meest uitgesproken was in de groep met een recidief in de nabije toekomst. Productie van TNF $\alpha$  correleerde sterk met de aanwezigheid van geheugen B-cellen, een indicatie dat deze verantwoordelijk zijn voor de productie van dit cytokine. Aangezien GPA patiënten minder geheugen B-cellen in de circulatie hebben, zou dit de verminderde hoeveelheid TNF $\alpha$  producerende B-cellen kunnen verklaren. Een mogelijk mechanisme

hierachter is een toegenomen migratie van de geheugen B-cellen naar de weefsels, waar de ontsteking zich bevindt. Dit idee wordt ondersteund door verhoogde levels van CCL19 die gevonden werden bij patiënten. CCL19 is een chemokine dat met name de geheugen B-cellen stimuleert tot migratie.

Productie van IL10 was vergelijkbaar in patiënten en controles, echter in individuele patiënten werd een afname van het percentage IL10 producerende B-cellen waargenomen voor een opvlamming. Dit kan betekenen dat een afname van immuunregulatie een rol speelt in het krijgen van een recidief. Om dit definitief vast te stellen zijn verdere studies nodig.

Productie van pro- en anti-inflammatoire cytokines kan ook een factor zijn die de productie van ANCA beïnvloed. Om dit te onderzoeken werden in **hoofdstuk 6** samples positief en negatief voor *in vitro* ANCA productie vergeleken op productie van cytokines. Hoewel de variatie tussen individuen groot was, leken een aantal cytokines positief gerelateerd aan ANCA productie. Verrassend genoeg was één van deze cytokines IL10, in samples met meer ANCA productie werden hogere IL10 concentraties gevonden. Echter, wanneer extra IL10 toegevoegd werd aan de celkweek werd juist een afname van de ANCA productie waargenomen. Deze resultaten lijken tegenstrijdig en leiden tot de hypothese dat IL10 verschillende functies heeft tijdens de *in vitro* productie van ANCA. Het is bekend dat IL10 naast zijn immuunregulerende functie ook als overlevingsfactor functioneert voor plasmacellen. De plasmacel is verantwoordelijk voor productie van immunoglobulinen (Ig), waaronder de PR3-ANCA IgG. Als zodanig is het aannemelijk dat in de vroege fase van de celkweek, wanneer er weinig tot geen plasmacellen aanwezig zijn, IL10 een regulerende impact heeft. Terwijl na de formatie van de plasmacellen *in vitro* IL10 door deze cellen gebruikt wordt als overlevingsfactor, wat verhoogde PR3-ANCA productie kan opleveren.

Verscheidene nieuwe therapeutische opties voor auto-immuun ziektes zijn gericht op de B-cellen. Zo is recent rituximab goedgekeurd voor behandeling van AAV. Rituximab is een anti-CD20 monoklonaal antilichaam en behandeling hiermee leidt tot een depletie van de B-cellen. Dit heeft effect op zowel de effector als de regulerende functies van de B-cel. Wellicht zouden betere strategieën ontwikkeld kunnen worden welke specifiek de effector functies van B-cellen remmen, zodat de regulerende mechanismen in stand blijven. Een mogelijkheid hiervoor ligt in de verschillende expressie van kalium kanalen op B-cellen. Waar de class-switched geheugen B-cellen het Kv1.3 kanaal tot expressie brengen, is dit in veel mindere mate het geval bij andere B-cellen. Door het specifiek blokkeren van het Kv1.3 kalium-kanaal worden dus voornamelijk de class-switched geheugen cellen geremd, welke pro-inflammatoire cytokines produceren en kunnen differentiëren naar (auto)antistof producerende plasmacellen. In **hoofdstuk 7** is het effect van een specifieke Kv1.3 kanaal blokker (ShK-186) getest voor het effect op B-cellen. Het incuberen van PBMCs met ShK-186 resulteerde in een lagere totaal IgG en PR3-ANCA specifieke IgG productie. Dit wordt waarschijnlijk niet veroorzaakt door een afname van B-cel proliferatie, aangezien ShK-186 hier geen direct effect op leek



te hebben. Ook werd gekeken naar het effect op cytokine productie, waar een sterke afname van de pro-inflammatoire cytokines  $TNF\alpha$ , IL2 en  $IFN\gamma$  werd gezien. Hoewel ook een afname van IL10 productie zichtbaar was in GPA patiënt samples, was dit een veel minder uitgesproken effect. Gezien het effect op de effector functies van B-cellen is Kv1.3 kanaal blokkade een intrigerende nieuwe behandeloptie voor AAV.

## Conclusies

In dit proefschrift wordt beschreven dat er verschillen zichtbaar zijn in de B-cel functie en B-cel subset distributie tussen patiënten met en zonder een aankomend recidief. Zo neemt in een aantal patiënten de PR3-ANCA productie toe voor een recidief. Daarnaast wijken patiënten voor opvlamming van ziekteactiviteit het meeste af van gezonde controles wat betreft de B-cel subset distributie, met lage percentages geheugen en  $CD24^{high}CD27+$  B-cellen. Dit maakt het monitoren van de B-cel subset distributie interessant voor het helpen voorspellen van opvlammingen. Tevens zijn er verschillen in de B-cel cytokine productie, GPA patiënten hebben minder  $TNF\alpha$  producerende B-cellen in de circulatie en in individuele patiënten neem het percentage IL10+ B-cellen af voor recidief.



