

University of Groningen

## Modulation of T and B cell function in Granulomatosis with polyangiitis

Lintermans, Lucas Leonard

**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:*

2019

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

*Citation for published version (APA):*

Lintermans, L. L. (2019). *Modulation of T and B cell function in Granulomatosis with polyangiitis: Targeting Kv1.3 potassium channels*. [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 8

NEDERLANDSE SAMENVATTING

## Granulomatose met polyangiïtis

Granulomatose met polyangiïtis (GPA) is een ernstige systemische auto-immuunziekte die wordt gekenmerkt door ontstekingen van de kleine en middelgrote bloedvaten en wordt daarom ook wel kleine vaten vasculitis genoemd. Deze kleine vaten vasculitis is sterk geassocieerd met de aanwezigheid van autoantilichamen gericht tegen eiwitten in de korrels van witte bloedcellen welke collectief anti-neutrofiële cytoplasmatische autoantilichamen (ANCA) worden genoemd. Bij GPA is het merendeel van de ANCA gericht tegen een eiwit, genaamd proteïnase 3 (PR3), dat opgeslagen ligt in de korrels van neutrofiële granulocyten en monocyten. Het klinisch spectrum van GPA is zeer divers. De auto-immuunziekte kan zich lokaal manifesteren waarbij de ziekteverschijnselen zich beperken tot de bovenste en onderste luchtwegen, terwijl in de systemische vorm van GPA meerdere organen aangedaan zijn en er vaak weefselschade optreedt in de nieren. In veel gevallen begint de ziekte lokaal en gaat geleidelijk over naar een systemische vorm, terwijl slechts enkele patiënten in het gelokaliseerde ziektestadium blijven. Histopathologisch wordt GPA gekenmerkt door necrotiserende vasculitis met granulomen. Karakteristiek zijn de opeenhoping van ontstekingscellen (granulomen) in de longen en de aanwezigheid van ontsteking en celdood in de kleinste bloedvaatjes in de nieren (glomeruli). Dit wordt glomerulonefritis genoemd.

Tot op heden is de etiologie van GPA onbekend. Wel is duidelijk dat de ziekte een multifactoriële oorzaak heeft waarbij zowel omgevingsfactoren, genetische aanleg als een verstoorde balans in het cellulaire immuunsysteem bijdragen aan de ontwikkeling en progressie van de ziekte.

De huidige behandeling van GPA is erop gericht het ontstekingsproces en de daarmee gepaard gaande weefselschade te stoppen door het immuunsysteem te onderdrukken. Dit behandeltraject bestaat uit twee fasen, een inductiebehandeling en een onderhoudsbehandeling. De inductiebehandeling heeft als doel de ziekteactiviteit zo snel mogelijk te controleren om onomkeerbare weefselbeschadiging te voorkomen; we noemen dit het induceren van remissie. Vervolgens start de onderhoudsbehandeling gericht op het voorkomen van een opvlaming van de ziekteactiviteit, een recidief. De huidige behandelingsstrategie stelt de patiënten bloot aan langdurige, breed werkende en agressieve immuunsysteem onderdrukkende geneesmiddelen (zoals cyclofosfamide en glucocorticoiden). Hoewel deze aanpak de overleving van patiënten aanzienlijk heeft verbeterd, krijgt een groot deel van de patiënten te maken met meerdere bijwerkingen zoals een verhoogd risico op het krijgen van infecties en toxiciteit als gevolg van de gebruikte medicijnen. Gezien de toxiciteit van de behandeling wordt deze langzaam afgebouwd en zo mogelijk gestaakt. Echter, hierdoor krijgt een belangrijk deel van de patiënten te maken met een recidief van de ziekte. Elk recidief is geassocieerd met een verhoogd risico op cumulatieve weefselschade en verlies van kwaliteit van leven. Dit benadrukt de noodzaak voor meer specifieke behandelingsmethoden met als doel de toxische neveneffecten van de behandeling en het risico op hernieuwde ziekteactiviteit voor de GPA patiënten zoveel mogelijk te beperken.

Uitgangspunt voor het ontwikkelen van een meer specifieke therapie voor GPA is dat dergelijke therapieën zich selectief zouden moeten richten op immuuncellen die een belangrijke rol spelen in de pathogenese van GPA. Hiervoor is echter een beter begrip van de immuunpathofysiologie van GPA vereist. In de afgelopen twee decennia is het duidelijk geworden dat verstoringen in de cellulaire immuniteit een kritische rol spelen in de pathogenese van GPA. Verschillende typen immuuncellen zijn betrokken bij de pathogenese van GPA waaronder neutrofielen, B-cellen en T-cellen. Neutrofielen zijn dragers van het auto-antigeen PR3, B-cellen zijn verantwoordelijk voor de productie van antilichamen waaronder de ANCA auto-antilichamen, zoals PR3-ANCA, terwijl de T-cellen een rol spelen in de ontwikkeling van weefselschade. Tevens kunnen T- en B-cellen pro-inflammatoire (ontstekingsbevorderende) en anti-inflammatoire (ontstekingsremmende) functies uitoefenen door middel van cytokine productie. Cytokinen zijn signaalstoffen die de immuunsysteemreactie kunnen aanzwengelen of afremmen. Afhankelijk van het type cytokine dat door een T- of B-cel wordt geproduceerd kunnen de T- en B-cellen worden onderverdeeld in verschillende subsets.

Observationele studies naar zowel T-cellen in de weefsels, als T-cellen in de circulatie (bloedsomloop) van GPA patiënten suggereren dat verschillende T-cel subsets kunnen bijdragen aan de pathogenese van GPA. Onze onderzoeksgroep heeft een sleutelrol aangetoond voor een specifieke groep T-cellen genaamd effector T geheugen ( $T_{EM}$ ) cellen. Echter, de onderliggende effector mechanismen worden tot op heden slechts ten dele begrepen. Daarnaast hebben recente studies bij GPA patiënten veranderingen in circulerende B-cellen aangetoond die de antilichaamonafhankelijke effector B-celfuncties kunnen beïnvloeden. Dus verstoringen in zowel het T- als het B-cel compartiment van het immuunsysteem spelen, naar alle waarschijnlijkheid, een sleutelrol in de pathogenese van GPA.

### **Dit proefschrift**

In dit proefschrift hebben we een mogelijke nieuwe therapeutische strategie voor GPA onderzocht. Deze potentiële behandeling is specifiek gericht tegen  $T_{EM}$  cellen en effector B geheugencellen, terwijl andere cellen van het immuunsysteem onaangetaast blijven. De basis voor deze nieuwe therapeutische strategie ligt in het feit dat activatie van zowel  $T_{EM}$  cellen en effector B geheugencellen afhankelijk is van de activiteit van zogenaamde Kv1.3-kaliumkanalen. In dit proefschrift is onderzocht of het blokkeren van deze kanalen met de zeer krachtige Kv1.3-kanaal blokker, ShK-186, de pro-inflammatoire functies van deze cellen kan onderdrukken. Tevens hebben we het fenotype van circulerende  $T_{EM}$  cellen in meer detail onderzocht om een beter inzicht te krijgen in het immuun mechanisme van deze T-cellen tijdens het ziekteverloop van GPA. Tot slot, hebben we in meer detail gekeken naar de relatie tussen B- en T-cellen in GPA.

### **T-cellen en GPA**

T-cellen spelen een sleutelrol in de regulatie van immuun responsen. Een verstoorde regulatie van T-cel responsen kan bijdragen aan pathogene effecten die onder andere kunnen leiden tot chronische bloedvatontstekingen en weefselschade die kenmerkend zijn voor aandoeningen

zoals GPA. In **hoofdstuk 2** hebben we allereerst de huidige kennis met betrekking tot de verschillende subsets van T-cellen die betrokken zijn bij de pathogenese van GPA beschreven en samengevat. In het bijzonder is de significante rol van  $T_{EM}$  cellen uitgelicht en is beschreven op welke manieren deze cellen het ontstaan van weefselschade beïnvloeden. Daarnaast is beschreven op welke manier deze  $T_{EM}$  cellen specifiek therapeutisch onderdrukt zouden kunnen worden wat mogelijk als behandelstrategie voor GPA patiënten zou kunnen dienen.

In **hoofdstuk 3** hebben we ingezoomd op de circulerende  $T_{EM}$  cellen in de bloedsomloop van GPA patiënten. We hebben gekeken naar de distributie van verschillende  $T_{EM}$  cel subsets op basis van de expressie van chemokine receptoren op het oppervlak van de cel. Chemokine receptoren zijn in het bijzonder interessant omdat deze receptoren een rol spelen in de migratieprocessen van T-cellen naar de weefsels. Daarnaast zijn deze receptoren gerelateerd aan de specifieke effector functies van de T-cel. Zodoende kunnen we op basis van het chemokine receptor repertoire op het oppervlak van de T-cel verschillende fenotypen van de  $T_{EM}$  cellen in de circulatie van GPA patiënten onderscheiden en vergelijken met dat van gezonde individuen. Door gebruik te maken van het expressie patroon van vier verschillende chemokine receptoren kunnen we onderscheid maken tussen  $T_{EM}1$ ,  $T_{EM}17$ ,  $T_{EM}17.1$  en  $T_{EM}2$  cellen. We hebben laten zien dat in het bloed van GPA patiënten in verhouding meer  $T_{EM}17$  cellen circuleren ten opzichte van gezonde mensen. Daarnaast hebben we gezien dat de GPA patiënten in verhouding minder circulerende  $T_{EM}1$  hebben in vergelijking met gezonde mensen. Echter, GPA patiënten met systemische manifestaties hebben in verhouding meer circulerende  $T_{EM}17$  cellen terwijl GPA patiënten met lokale manifestaties meer  $T_{EM}1$  cellen in de circulatie hebben. Er lijkt dus een associatie te zijn tussen de verhouding  $T_{EM}17$  en  $T_{EM}1$  cellen met de ziekteprogressie van GPA. Deze associatie wordt tevens benadrukt door het feit dat GPA patiënten met meerdere opvlammingen van de ziekte tijdens het ziekteproces een sterker  $T_{EM}17$  cel profiel laten zien. Opvallend in deze studie is dat een positieve serologie voor het cytomegalovirus (CMV) de afwijkende distributie van  $T_{EM}17$  en  $T_{EM}1$  cellen in GPA patiënten lijkt te moduleren.

Vervolgens hebben we in **hoofdstuk 4** de mogelijkheid onderzocht om de specifieke groep  $T_{EM}$  cellen in haar activiteit te remmen. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat in het bloed van GPA patiënten meer  $T_{EM}$  cellen aanwezig zijn dan in gezonde mensen. Tevens zijn deze cellen overactief wat kan resulteren in toenemende weefselschade tijdens het ziekteverloop van GPA. Daarom is het doelgericht onderdrukken van deze  $T_{EM}$  cellen voor GPA patiënten een mogelijk therapeutisch aangrijppingspunt. Een interessant gegeven is dat  $T_{EM}$  cellen voor hun activatie afhankelijk zijn van Kv1.3 kaliumkanalen. Wanneer een  $T_{EM}$  cel wordt geactiveerd door een stimulus gaat de cel in hoge mate Kv1.3 kaliumkanalen tot expressie brengen. Dit in tegenstelling tot de andere typen T-cellen (zoals naïeve T-cellen, of centrale T geheugen cellen) die veel minder Kv1.3 kaliumkanalen tot expressie brengen. Door de Kv1.3 kaliumkanalen te gebruiken als therapeutisch aangrijppingspunt kan dus, naar alle waarschijnlijkheid, de activiteit van  $T_{EM}$  cellen specifiek worden beïnvloed. Bijzonder aan de middelen die kaliumkanalen blokkeren voor de behandeling van auto-immuunziekten is dat deze middelen voor het eerst zijn aangetoond in het gif van schorpioenen, slangen en giftige zeeanemonen. In de jaren negentig van de vorige

eeuw is ontdekt dat het gif van de zeeanemoon, *Stichodactyla helianthus*, een eiwit bevat dat specifiek de Kv1.3 kaliumkanalen aanwezig op T<sub>EM</sub> blokkeert. Het eiwit, genaamd ShK-186, wordt inmiddels synthetisch geproduceerd. Daarnaast is het ook geoptimaliseerd om zeer specifiek en met hoge affiniteit de Kv1.3 kaliumkanalen te blokkeren op T<sub>EM</sub> cellen. Laboratoriumonderzoek heeft aangetoond dat voor verschillende auto-immuunziekten waaronder reumatoïde artritis (RA), multiple sclerose (MS) en type-1 diabetes, het blokkeren van de Kv1.3 kaliumkanalen op T<sub>EM</sub> cellen de productie van pro-inflammatoire cytokinen kan normaliseren. Daarnaast is in rat modellen van RA en MS ook aangetoond dat behandeling met ShK-186 de ziekteactiviteit op een veilige manier kan onderdrukken.

In **hoofdstuk 4** hebben we allereerst laten zien dat de T-cellen van GPA patiënten overactief reageren wanneer deze cellen *in vitro* worden geactiveerd. Vergeleken met T-cellen afkomstig van gezonde mensen, is de productie van pro-inflammatoire cytokinen door T-cellen van GPA patiënten significant hoger. Behandeling van de T-cellen van GPA patiënten *in vitro* met ShK-186 normaliseerde de productie van pro-inflammatoire cytokinen naar een niveau dat vergelijkbaar is met een gezonde situatie. Om aan te tonen dat ShK-186 specifiek T<sub>EM</sub> cellen activiteit remt hebben we vervolgens de verschillende T-cel subsets geïsoleerd en afzonderlijk gestimuleerd en behandeld met ShK-186. Uit deze resultaten blijkt dat voornamelijk de T<sub>EM</sub> cellen verantwoordelijk zijn voor de pro-inflammatoire cytokine productie en dat ShK-186 met name de cytokine productie van T<sub>EM</sub> cellen kan onderdrukken. Het lijkt er dus op dat de overige T-cel subsets ontsnappen aan de effecten van ShK-186 behandeling en hun functies kunnen blijven uitvoeren. Dit heeft als voordeel dat patiënten mogelijk in mindere mate te maken krijgen met bijwerkingen als gevolg van behandeling met Kv1.3 remmers.

## B-cellen en GPA

Naast T-cellen brengen ook geactiveerde B-cellen Kv1.3 kaliumkanalen tot expressie en het blokkeren van deze kanalen op B-cellen zou mogelijk B-cel functies kunnen moduleren. Evenals T-cellen kunnen we B-cellen onderverdelen in verschillende subsets. De meest interessante B-cel subset voor het blokkeren van het Kv1.3 kaliumkanaal is de *class-switched* B geheugencel. Deze B-cel subset heeft in vergelijking met de andere typen B-cellen een zeer hoge expressie van Kv1.3 kaliumkanalen op het celoppervlak. Bovendien zijn de *class-switched* B geheugencellen voorlopers van de (auto)antilichaam producerende plasmacellen en zijn ze verantwoordelijke voor het uitscheiden van pro-inflammatoire cytokinen. Het doelgericht remmen van deze specifieke B-cellen is naar verwachting dan ook mogelijk therapeutisch interessant voor GPA patiënten.

In **hoofdstuk 5** is het effect van ShK-186 getest op de verschillende functies van B-cellen. We hebben onder andere onderzocht of ShK-186 invloed had op de antilichaam productie van B-cellen en in het bijzonder de PR3-ANCA productie. Tevens is er gekeken naar het effect van ShK-186 op de proliferatie en cytokine productie van B-cellen. Het incuberen van perifere bloed mononucleaire cellen (PBMCs) met ShK-186 resulteerde in een lagere IgG antilichamen productie maar tevens ook een verminderde productie van de specifieke PR3-ANCA IgGs. Dit

effect wordt waarschijnlijk niet veroorzaakt door een afname van de proliferatie en differentiatie van B-cellen aangezien ShK-186 hier geen directe invloed op lijkt te hebben. Tot slot hebben we laten zien dat ShK-186 de cytokine productie van de B cellen beïnvloedt. Aanwezigheid van ShK-186 tijdens stimulatie van B cellen *in vitro* resulteerde in een sterke afname van de productie van de pro-inflammatoire cytokines TNF $\alpha$ , IL-2 en IFN $\gamma$ . Tegelijkertijd werd de productie van het anti-inflammatoire cytokine IL-10 in mindere mate geremd. Gezien de significante effecten van ShK-186 op de effector functies van B-cellen is Kv1.3 kanaal blokkade mogelijk een interessante nieuwe behandeloptie voor GPA.

Zoals eerder genoemd spelen B-cellen een centrale rol in de pathogenese van GPA. B cellen zijn voorloper cellen van de ANCA producerende plasmacellen, en ze kunnen pro-inflammatoire en anti-inflammatoire functies uitoefenen door middel van cytokine productie. Interessant is dat de cytokines uitgescheiden door B-cellen de T-cel functies kunnen beïnvloeden. Op deze manier kunnen B-cellen de effector functies van T-cellen moduleren en door middel van productie van anti-inflammatoire cytokinen immuun regulerende T-cel functies aansturen. Voor de anti-inflammatoire cytokine producerende B-cellen, ook wel regulatoire B ( $B_{REG}$ ) cellen genoemd, is beschreven dat zij de effector functies van T-cellen kunnen onderdrukken. Zo is aangetoond dat  $B_{REG}$  cellen de activatie van  $T_H1$  cellen en de differentiatie van  $T_H17$  cellen kunnen remmen, terwijl gelijktijdig de ontwikkeling van een regulatoire T cel fenotype wordt bevorderd. Het mechanisme hierachter is nog niet volledig opgehelderd maar wel is beschreven dat de  $B_{REG}$  cellen in verminderde aantallen aanwezig zijn in de circulatie van GPA patiënten. Om die reden hebben we in **hoofdstuk 6** onderzocht of de verlaagde aantallen  $B_{REG}$  cellen een mogelijke verklaring kunnen zijn voor de verhoogde  $T_H17$  response bij GPA patiënten. Deze studie laat zien dat er een omgekeerde correlatie bestaat tussen  $T_{EM}17$  cellen en  $B_{REG}$  cellen in GPA patiënten. Deze observatie suggereert dat de verlaagde  $B_{REG}$  cel populatie  $T_{EM}17$  cellen de mogelijkheid geeft om zich te vermenigvuldigen. Om dit aan te tonen werden T- en B-cellen van GPA patiënten geïsoleerd. Daarnaast werd in een deel van de geïsoleerde B-cellen specifiek de  $B_{REG}$  subset verwijderd. Vervolgens werden de T- en B-cellen weer samen in kweek gebracht waarbij in de ene kweek T-cellen in aanwezigheid van  $B_{REG}$  cellen werden gekweekt terwijl in de andere kweek T-cellen werden gemengd met B cellen waaruit de  $B_{REG}$  subset was verwijderd. Op deze manier kunnen we onderzoeken wat specifiek het effect is van  $B_{REG}$  cellen op de T-cel populaties. De resultaten van deze experimenten laten zien dat het aantal IL-17 producerende T-cellen ( $T_H17$  cellen) significant toeneemt wanneer  $B_{REG}$  cellen afwezig zijn in deze gemengde kweken. Deze observatie impliceert dus een mogelijke relatie tussen de  $B_{REG}$  cellen en de  $T_H17$  cellen hoewel het exacte mechanisme hierachter in verdere studies opgehelderd dient te worden.

## Conclusies en suggesties voor vervolgonderzoek

De studies beschreven in dit proefschrift dragen bij aan onze kennis over de effector functies van T- en B-cellen in de pathofysiologie van GPA. Deze studies laten zien dat er een verstoorde balans bestaat binnen het T geheugencel compartiment in GPA patiënten waarbij de verstoorde balans tussen  $T_{EM}1$  en  $T_{EM}17$  cellen lijkt te zijn geassocieerd met de ernst van de ziekte. Daarnaast is aangetoond dat een vermindering van het aantal  $B_{REG}$  cellen kan bijdragen aan een verhoogde  $T_H17$  respons bij GPA patiënten.

De verhoogde expressie van Kv1.3 kaliumkanalen op het oppervlak van T geheugencellen en *class-switched* B geheugencellen in combinatie met de belangrijke rol die deze celtypen spelen in de pathogenese van GPA, impliceert dat specifieke Kv1.3 kaliumkanaal blokkade een aantrekkelijk therapeutische optie kan zijn. We hebben laten zien dat de Kv1.3 blokker ShK-186, pro-inflammatoire effector functies van T-cellen en B-cellen van GPA patiënten kan onderdrukken. In het geval van de T-cellen remde ShK-186 voornamelijk de cytokine productie van  $T_{EM}$  cellen. Voor de B-cellen lijkt incubatie met ShK-186 met name de pro-inflammatoire functies te remmen terwijl de anti-inflammatoire functies relatief intact blijven. Hierdoor lijkt er onder invloed van Kv1.3 blokkade een verschuiving op te treden in de activiteit van B-cellen waarbij de regulerende functies van deze cellen wordt bevorderd. Gezien de beperkte gegevens die tot op heden beschikbaar zijn zullen vervolgstudies moeten uitwijzen of en hoe ShK-186 de functies van regulerende T- en B-cellen rechtstreeks beïnvloed. Er zou bijvoorbeeld gekeken moeten worden naar de langdurige immuun modulerende effecten van ShK-186, aangezien een langdurige ShK-186 behandeling een polariserende werking op de ontstekingsremmende regulerende T- en B-cellen zou kunnen hebben. Dergelijke vervolgonderzoeken kunnen waardevolle informatie opleveren over de vraag of een versterkt regulatorisch immuunsysteem veilig is.

Concluderend ondersteunen de resultaten in dit proefschrift de hypothese dat selectieve immuun modulatie van effector T en B geheugencellen middels het blokkeren van Kv1.3 kanalen met ShK-186 in de toekomst van waarde kan zijn voor de behandeling van GPA. Vervolgonderzoek, in zowel het laboratorium als de kliniek, is echter noodzakelijk om vast te stellen of Kv1.3 kaliumkanaal blokkade een effectieve en veilige behandelstrategie is voor GPA patiënten.



