

University of Groningen

B cells in ANCA-associated vasculitides

von Borstel, Anouk

DOI:
[10.33612/diss.93537940](https://doi.org/10.33612/diss.93537940)

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):
von Borstel, A. (2019). *B cells in ANCA-associated vasculitides: from pathogenic players to biomarkers*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.93537940>

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.

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitae

Acknowledgments



Nederlandse Samenvatting

Anti-neutrofiel cytoplasmatische autoantilichaam (ANCA)-geassocieerde vasculitis (AAV) is een zeldzame systemische auto-immuunziekte, die gekenmerkt wordt door de aanwezigheid van necrotiserende ontstekingen (i.e. dermate heftige ontstekingen waarbij weefsel kan afsterven) van kleine en middelgrote bloedvaten. Deze ziekte is in de meeste gevallen fataal zonder immunosuppressieve behandeling. AAV kan worden onderverdeeld met behulp van klinisch-pathologische kenmerken in granulomatose met polyangiïtis (GPA), microscopische polyangiïtis (MPA) en eosinofiele GPA. ANCA spelen een belangrijke rol in de pathogenese van AAV. Deze autoantilichamen zijn meestal gericht tegen proteinase 3 in GPA of myeloperoxidase in MPA patiënten.

Ondanks dat de precieze ziekte etiologie onbekend is, wordt gedacht dat de pathogenese van AAV een complex proces is waarin genetische predispositie, blootstelling aan omgevingsfactoren (bijvoorbeeld infecties) en een wisselwerking tussen meerdere typen immuuncellen een rol spelen. B cellen spelen naast (auto)antilichaam productie een belangrijke antilichaam-onafhankelijke rol in de auto-immuun pathogenese door middel van antigeen presentatie en cytokine productie. Deze antilichaam onafhankelijke functies van B cellen in AAV hebben steeds meer aandacht gekregen sinds de introductie van B cel depletie therapie met rituximab. Rituximab bleek effectief als remissie inductie- en onderhoudstherapie ondanks dat de (autoantilichaam-producerende) plasma cellen niet gedepleteerd worden. Deze bevinding duidt er op dat B cellen ook een belangrijke antilichaam-onafhankelijke rol spelen in de AAV pathogenese. Het is daarom belangrijk om deze functies van B cellen verder te onderzoeken en te bepalen of bevindingen uit dergelijk onderzoek gebruikt kunnen worden voor het identificeren van specifiekere therapeutische targets en biomarkers voor ziekteactiviteit.

Om remissie te induceren en onderhouden worden AAV patiënten behandeld met immunosuppressieve medicatie. Azathioprine (AZA) en mycofenolaat mofetil (MMF) zijn twee immunosuppressieve medicijnen die gebruikt worden voor onderhoudstherapie om opvlamming van de ziekte te voorkomen. Deze medicijnen remmen de proliferatie van respectievelijk alle leukocyten (AZA) of specifiek de lymfocyten (MMF). Het effect van deze medicijnen op B cellen is echter nog niet uitgebreid onderzocht. Daarnaast is het onbekend of een verschil van immunosuppressieve effecten van MMF en AZA op B cellen kan verklaren waarom ziekte recidieven in de onderhoudsfase bij MMF-behandelde patiënten frequenter optreden vergeleken met AZA-behandelde patiënten. Ziekte recidieven in AAV dragen bij aan verdere orgaanschade. Vooral GPA is een recidiverende ziekte waarbij ongeveer 60% van de patiënten één of meer recidieven krijgt gedurende de eerste 5 jaar na diagnose. Het is dus belangrijk om GPA patiënten die risico lopen op het krijgen van een ziekte recidief zo vroeg mogelijk te identificeren, zodat deze recidieven mogelijk voorkomen kunnen worden. Om deze patiënten te identificeren zijn ziekte gerelateerde biomarkers nodig die ziekte recidieven met een

hoge sensitiviteit en specificiteit kunnen voorspellen. Een veelgebruikte en bestudeerde biomarker is de serum ANCA titer. Het meten van de ANCA titer in serum blijkt echter niet betrouwbaar genoeg als biomarker om ook immunosuppressieve behandeling te rechtvaardigen. Daarom is het essentieel om nieuwe en betrouwbare biomarkers te vinden die ziekte recidieven voorspellen in GPA patiënten.

Het bestuderen van B cellen in de GPA pathogenese kan resulteren in de ontdekking van nieuwe biomarkers en specifiekere therapeutische targets. Deze bevindingen kunnen bijdragen aan het verlagen van de ziektelast en mortaliteit. De doelstellingen van het promotieonderzoek beschreven in dit proefschrift waren om:

1. De functionele rol van regulatoire en effector B cellen in de pathogenese van GPA te bestuderen
2. Het effect van immunosuppressieve therapie op B cel functie in GPA te ontrafelen
3. Het B cel repertoire als biomarker voor toekomstige ziekte activiteit te onderzoeken

Het Proefschrift

T- en B cellen in AAV kunnen, naast de mogelijk schadelijke rol, ook een ziekte-onderdrukkend effect hebben, mogelijk via cytokine productie. Deze ontstekingsremmende functie wordt door regulatoire B- (Bregs) en T cellen (Tregs) uitgeoefend, en deze functie zou verminderd kunnen zijn in AAV. Hierdoor kan de auto-immuun ontsteking wellicht blijven plaatsvinden. In **Hoofdstuk 2** is de literatuur omtrent de rol van Bregs en Tregs in de pathogenese van AAV samengevat en bediscussieerd. Op basis van de analyse van de bestaande wetenschappelijke literatuur postuleren wij dat een disbalans tussen regulatoire en effector functies ten grondslag ligt aan de pathogenese van AAV, en dat deze disbalans verantwoordelijk is voor verminderde remming van auto-immuun ontstekingen.

De rol van Bregs en mogelijke afwijkingen in de ontstekingsremmende werking van deze cellen in AAV is nog onduidelijk. Eerdere studies hebben in het bloed van AAV patiënten een verlaagde Breg frequentie vastgesteld. Of deze Bregs functioneel defect zijn is echter niet bekend. Op basis van de literatuur vormden wij de aanname dat Bregs van GPA patiënten minder effectief zijn in het remmen van de T helper (Th) 17 respons. Dit zou mogelijk de toegenomen frequentie van Th17 cellen in GPA patiënten, welke een belangrijke pathogene rol spelen in het ziekteproces, kunnen verklaren. In **Hoofdstuk 3** analyseerden wij de frequenties van CD24^{hi}CD38^{hi} Bregs en Th17 cellen in de circulatie van GPA patiënten waarna aansluitend het effect van Bregs op *in vitro* Th17 cel expansie werd bestudeerd. Deze experimenten toonden aan dat Bregs van GPA patiënten de Th17 respons kunnen onderdrukken. Op basis van deze resultaten is onze conclusie dat de verstoorde Th17 cel balans in de circulatie van GPA patiënten veroorzaakt wordt door een verlaagd aantal Bregs en niet een gevolg is van een intrinsiek defect van deze cellen. Deze resultaten impliceren ook dat therapieën die de

frequentie van Bregs doen toenemen mogelijk de Th17 cel respons in GPA patiënten kunnen onderdrukken. Vervolgonderzoek zal moeten uitwijzen op welke manier het aantal Bregs verhoogd kan worden. Dit zou mogelijk kunnen leiden tot de ontwikkeling van nieuwe (therapeutische) strategieën om de Th17 cel respons in GPA patiënten te onderdrukken. Daarnaast is het van belang dat consensus bereikt wordt over het precieze Breg fenotype. Alleen na het ophelderen van het Breg fenotype kunnen deze cellen in de toekomst mogelijk gebruikt worden als therapie om de balans in het immuunsysteem te herstellen.

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat B cellen van GPA patiënten in een continue geactiveerde staat lijken te zijn. In andere auto-immuun ziekten is aangetoond dat de B cel receptor (BCR) en activatie van de onderliggende signalerings route bijdraagt aan verhoogde B cel activatie. Hierbij bleek dat zowel de BCR gevoeligheid als de signalering verhoogd zijn (gemeten als verhoogde hoeveelheden van het eiwit Bruton's tyrosine kinase en fosforylering hiervan) wat bovendien correleerde met autoantilichaam hoeveelheden. Het was echter nog niet bekend of de BCR signalerings route en mogelijk verhoogde activatie hiervan ook optreedt in GPA patiënten. Daarom hebben wij in **Hoofdstuk 4** de BCR signalering route in B cellen van GPA patiënten bestudeerd. Ons doel was om de eiwit hoeveelheden en fosforylering van BTK – een tyrosine kinase die een belangrijke rol speelt in verdere BCR signalering – te onderzoeken. Ook onderzochten wij verschillende andere signaleringsmoleculen, zowel up- als downstream van BTK, in B cellen van actieve en remissie GPA patiënten en gezonde controles. Tenslotte bestudeerden wij het effect van het remmen van BTK fosforylering op het functioneren van B cellen. Wij vonden dat BTK levels verhoogd waren in B cellen die nog niet blootgesteld zijn aan antigeen (i.e. transitionele en naïeve B cellen) van actieve GPA patiënten. Blokkade van BTK fosforylering in gekweekte B cellen (i.e. *in vitro*) bleek een effectieve manier om B cel activatie te voorkomen in perifere bloed mononucleaire cellen van GPA patiënten. Toekomstig preklinisch en klinisch onderzoek moet uitwijzen of BTK remming een potentiële nieuwe therapie zou kunnen zijn voor GPA. Daarnaast kan ons onderzoek wellicht bijdragen aan het identificeren van nieuwe biomarkers voor (toekomstige) ziekte opvlammingen. Echter, om te bepalen of BTK activiteit in B cellen mogelijk een nieuwe biomarker kan zijn, zal eerst de dynamiek van BTK expressie in B cellen in een grotere (longitudinale) studies in patiënten met en zonder toekomstig recidief bestudeerd moeten worden.

Tegenwoordig worden verschillende immunosuppressieve medicijnen gebruikt om GPA patiënten te behandelen. Verrassend genoeg is het directe effect van deze onderhoudstherapieën op B cellen van AAV patiënten nog niet bestudeerd. **Hoofdstuk 5** was gebaseerd op de hypothese dat MMF, in tegenstelling tot AZA, de regulatoire functie van B cellen remt. Dit zou het verhoogde optreden van ziekte recidieven in MMF behandelde GPA patiënten kunnen verklaren. Om dit te onderzoeken hebben wij *in vitro*

effecten van AZA en MMF op het fenotype en de functie van B cellen onderzocht. Wij lieten zien dat beide medicijnen de *in vitro* B cel proliferatie verlaagden. Daarnaast bleek dat MMF de interleukine 6 productie van B cellen verlaagt, terwijl AZA geen verschil liet zien. Verder onderzoek is nodig om te bepalen of en hoe deze verschillen gerelateerd zijn aan het verschil in risico op ziekte opvlammingen tussen AZA- en MMF-behandelde patiënten.

Na inductie van remissie in GPA patiënten wordt de immunosuppressieve medicatie afgebouwd. Tijdens het afbouwen of stoppen van deze immunosuppressieve medicijnen krijgt het merendeel ($\pm 60\%$) van de GPA patiënten te maken met een opvlamming van ziekteactiviteit. Zoals eerder genoemd, dragen ziekte recidieven aanzienlijk bij aan ziektelast en mortaliteit in AAV patiënten. Tot nu toe zijn een aantal markers gevonden die ziekte recidieven kunnen voorspellen, echter geen enkele marker is betrouwbaar genoeg om een herstart van de immunosuppressieve behandeling te rechtvaardigen. Omdat B cellen een belangrijke rol spelen in de AAV pathogenese – zowel als antilichaam- en cytokine-producerende cellen – veronderstelden wij dat de frequentie van plasmablasten (de voorlopers van antilichaam-producerende cellen) in het bloed gecorreleerd zouden kunnen zijn aan toekomstige opvlammingen van ziekteactiviteit. In **Hoofdstuk 6** onderzochten wij frequenties van verschillende B cel subsets, inclusief plasmablasten, en verschillen in deze frequenties als mogelijke (bio)marker voor toekomstige ziekte opvlammingen. Onze resultaten wezen uit dat circulerende plasmablast frequenties tijdens remissie geassocieerd waren met een ziekteverloop vrij van ziekte opvlammingen en wellicht een nieuwe indicator zou kunnen zijn voor toekomstige ziekteactiviteit in GPA patiënten. Vervolgonderzoek, dat grotere en andere patiënten cohorten includeert, moet uitwijzen of plasmablast frequenties daadwerkelijk voorspellend zijn voor ziekte opvlammingen in GPA patiënten. Daarnaast zal moeten worden onderzocht of dit ook geldt voor ANCA specifieke plasmablasten.

Tenslotte worden in **Hoofdstuk 7** de resultaten van dit proefschrift samengevat en bediscussieerd in de context van de (recente) wetenschappelijke literatuur en worden een aantal suggesties gedaan voor vervolgonderzoek. Concluderend onderstrepen de studies beschreven in dit proefschrift het belang van (auto)antilichaam onafhankelijke functies van B cellen in de pathogenese van GPA. De verworven kennis geeft ons meer inzicht in de rol van B cellen in het ziekteproces in GPA en kan uiteindelijk mogelijk bijdragen aan de ontwikkeling van meer specifieke therapieën en biomarkers voor het voorspellen van toekomstige ziekte activiteit.

Curriculum Vitae



Anouk von Borstel was born on the 7th of May, 1991 in the beautiful city of Luzern, Switzerland. She moved back and forth from Switzerland to the Netherlands twice during her childhood. She started her secondary education in Switzerland (Kantonsschule Alpenquai Luzern), which she finished in 2010 in the Netherlands (Atheneum, Schravenlant Lyceum Schiedam).

In the same year, she started her BSc Animal Sciences at the Wageningen University and continued with the MSc Animal Sciences. During these five years, she was involved in several committees of the study association “de Veetelers”. During her Master’s degree, Anouk became intrigued by Immunology and thereby choose to conduct two research projects in this field. During her first MSc thesis (36 ECTS), she investigated the effect of dextran sodium sulfate on the mucosal immune system of chicks, as a challenge model to study the health status of broilers and layers later in life at the Adaptation Physiology group at the Wageningen University. Although she enjoyed veterinary immunology, she discovered that she was more passionate about human immunology. She wished to work in translational immunology, investigating the complex role of immune cells in disease pathogenesis. Therefore, during her second MSc thesis, she went to the Immunology department at the Erasmus MC, Rotterdam. Here, she investigated circulating immune cell subsets as specific novel diagnostic tool for mature T cell leukemias. This research project confirmed her interest and passion for human immunology and her wish to continue her research training in the form of a PhD.

In 2015, she started her PhD at the UMCG that focused on the balance between regulatory and effector B cells in ANCA-associated vasculitis. During the past three years, she presented her work at several international conferences such as the ANCA and Vasculitis workshop in Tokyo, Japan and the Annual meeting of the ACR in San Diego, USA. After her PhD, Anouk wanted to pursue her passion for human immunology and gain expertise in fundamental research. Therefore, she joined the group of prof. dr. J. Rossjohn at Monash University, Melbourne, Australia in November 2018. Here she is currently working as a postdoctoral researcher investigating the role of $\gamma\delta$ T cells in microbial infections.