

VU Research Portal

Passing a strong message: the IgA Fc receptor in health and disease

Heineke, M.H.

2020

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Heineke, M. H. (2020). *Passing a strong message: the IgA Fc receptor in health and disease*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

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.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Het immuunsysteem beschermt het lichaam tegen ziekteverwekkers zoals bacteriën, virussen, schimmels en parasieten. Verschillende organen, weefsels, cellen en moleculen werken samen om infecties te voorkomen en te bestrijden. Immune cellen (ook wel witte bloedcellen genoemd) circuleren in het bloed en bevinden zich in weefsels en moeten potentieel gevaarlijke ziekteverwekkers opruimen.

Om ziekteverwekkers te herkennen, hebben immune cellen verschillende antennes op hun oppervlakte, die receptoren worden genoemd. Deze receptoren kunnen specifieke moleculen herkennen, en vervolgens signalen binnen de cel doorgeven zodat de cel actie kan ondernemen. Sommige receptoren binden direct aan moleculen die alleen op ziekteverwekkers voorkomen. Andere receptoren (genaamd Fc receptoren) binden indirect via antilichamen, die op hun beurt weer aan de moleculen op ziekteverwekkers binden. Antilichamen vormen dus een brug tussen de immune cel en de ziekteverwekker, omdat ze via de ene kant aan een binnendringer en via de andere kant aan Fc receptoren op immune cellen binden.

Wanneer antilichamen via Fc receptoren aan immune cellen binden, kunnen de cellen geactiveerd raken. Vervolgens worden er binnen in de cel signalen doorgegeven. Deze signaalketens kunnen dan tot verschillende acties leiden, zoals bijvoorbeeld het opeten van bacteriën, het uitscheiden van signaalstoffen voor andere immune cellen of migratie naar de plek van infectie. Welke actie wordt uitgevoerd is afhankelijk van het type immune cel, het type antilichaam en het type Fc receptor dat geactiveerd wordt.

Er worden vijf verschillende soorten antilichamen in ons lichaam aangemaakt, namelijk IgA, IgG, IgE, IgD en IgM. Antilichamen binden aan Fc receptoren via een sleutel en slot principe, waarbij specifieke antilichamen binden aan specifieke Fc receptoren. Ik heb in dit proefschrift het verschil tussen IgA en IgG receptoren onderzocht. IgG is het meest voorkomende antilichaam in het bloed, en komt voor als een enkel molecuul (monomeer). IgG speelt een belangrijke rol tijdens infecties door te binden aan bacteriën, en kan immune cellen activeren door te binden aan IgG Fc receptoren (FcγR).

IgA bevindt zich zowel in het bloed als in de slijmvliezen, en bestaat in verschillende vormen, namelijk secretair IgA, monomeer IgA en dimeer IgA. In het darmlumen komt secretair IgA (SIgA) voor. SIgA heeft als voornaamste functie om aan bacteriën te binden en te voorkomen

dat deze ziekteverwekkers de weefsels in kunnen dringen. SIgA kan echter niet binden aan de IgA Fc receptor (FcαRI) en kan daarom geen immune cellen activeren. In het darmweefsel wordt IgA geproduceerd als twee antilichamen die aan elkaar zijn gelinkt als dimeer IgA (dIgA). In het bloed komt IgA voor als monomeer (mIgA). Als bacteriën in het bloed zitten of de darmweefsels infiltreren, kan mIgA of dIgA aan deze bacteriën binden en immune cellen via FcαRI activeren, waarna bacteriën worden opgeruimd. Zowel monomeer IgA (in het bloed) als dimeer IgA (in het darmweefsel) helpen dus om infecties te voorkomen door immune cellen via FcαRI te instrueren. In **hoofdstuk 1** worden IgA, FcαRI en interacties tussen IgA en FcαRI verder geïntroduceerd.

In dit proefschrift heb ik mij voornamelijk gefocust op interacties tussen IgA en FcαRI op neutrofielen. Neutrofielen zijn de meest voorkomende immune cellen in ons bloed: ze vormen 60-70% van de circulerende witte bloedcellen. Neutrofielen arriveren als eerste bij een ontstekingshaard, en ze zijn gespecialiseerd in het herkennen en opeten (fagocyteren) van bacteriën. Ze kunnen bacteriën ook doden door giftige stoffen uit te scheiden of door ze te vangen in een soort net. Verder kunnen ze moleculen uitscheiden en zo andere immune cellen alarmeren en activeren. Neutrofielen zijn dus belangrijke spelers in het immuunsysteem die helpen om ziekteverwekkers te vernietigen.

Neutrofielen hebben verschillende soorten Fc receptoren op hun oppervlakte. FcαRI bindt aan IgA moleculen, en verschillende typen FcγR (zoals FcγRIIA en FcγRIIB) binden aan IgG. Uit eerder onderzoek is gebleken dat neutrofielen verschillend kunnen reageren op IgA en IgG. Als een immuuncomplex bestaat uit IgA moleculen die hebben gebonden aan bacteriën, dan eet de neutrofiel de bacterie op en worden lokstoffen uitgescheiden. Deze lokstoffen trekken andere neutrofielen aan, die vervolgens nog meer IgA gebonden bacteriën kunnen herkennen en opruimen. Als een bacterie echter is bedekt met IgG moleculen, wordt de bacterie wel opgegeten, maar worden er vervolgens geen lokstoffen uitgescheiden. Tot nu toe is onduidelijk waarom neutrofielen verschillend reageren op IgA en IgG.

In **hoofdstuk 2** hebben we de verschillende acties (of functies) na neutrofiel activatie via IgA en IgG receptoren nader onderzocht. Door kleine balletjes te bedekken met serum IgA of serum IgG hebben we immuuncomplexen nagebootst. Neutrofielen werden geïsoleerd uit bloed van gezonde donoren, en vervolgens werden de immuuncomplexen aan de neutrofielen gevoerd en werden verschillende functies gemeten. Neutrofielen fagocyteerden (aten) zowel IgA- als IgG-complexen in gelijke mate. Daarna produceerden neutrofielen een gelijke hoeveelheid zuurstofradicalen en neutrofiel extracellulaire vallen,

wat twee methodes zijn die neutrofielen gebruiken om bacteriën te doden. Er waren echter ook verschillen. Na Fc α RI activatie produceerden neutrofielen verschillende moleculen (cytokinen en chemokinen) die andere immuun cellen kunnen activeren en aantrekken. Fagocytose van IgG-complexen leidde echter niet tot uitscheiding van deze moleculen. Hetzelfde gold voor pro-inflammatoire lipiden: activatie via IgA leidde tot een significant hogere productie van deze lipiden dan na activatie via IgG. Om te kijken of dit specifiek was voor neutrofielen, heb ik ook een andere immuun cel, de monocyt, onderzocht. Dit is een ander type witte bloedcel die ook IgA en IgG Fc receptoren op het oppervlakte heeft. Na Fc α RI activatie van monocytten werden ook meer cytokinen, chemokinen en inflammatoire lipiden gemeten dan na activatie via IgG receptoren.

Een simpele verklaring voor de sterkere immuun respons na IgA activatie zou kunnen zijn dat zowel neutrofielen als monocytten meer IgA Fc receptoren dan IgG Fc receptoren op hun oppervlakte hebben. IgA activatie zou dan automatisch tot een sterker signaal leiden, omdat er meer receptoren geactiveerd kunnen worden. Er werden echter meer Fc γ R dan Fc α RI gemeten op zowel neutrofielen als monocytten. Er moet daarom een andere verklaring zijn waarom activatie via IgA tot een sterkere immuunrespons leidt dan activatie via IgG.

Omdat cellen sterker geprikkeld werden door IgA dan door IgG, vermoedden we dat signaalketens in de cel sterker en wellicht anders worden geactiveerd na Fc α RI dan na Fc γ R activatie. Het doorgeven van signalen gebeurt (onder andere) door fosforylering van moleculen, wat betekent dat er een fosfaatgroep aan een molecuul wordt geplakt. Het gefosforyleerde ofwel geactiveerde molecuul kan vervolgens een signaal doorgeven aan andere moleculen. Om te meten welke signaalmoleculen geactiveerd raakten en in welke mate, werd in **hoofdstuk 3** massa spectrometrie toegepast. Met deze techniek kunnen gefosforyleerde (geactiveerde) eiwitten in een cel worden geïdentificeerd. Neutrofielen werden gestimuleerd via Fc α RI of via Fc γ RIIA, de activerende Fc γ R op neutrofielen. Na Fc α RI activatie werden er meer gefosforyleerde eiwitten gemeten dan na Fc γ RIIA activatie, en ook werden er andere signaalmoleculen geactiveerd.

Het is onbekend waarom neutrofielen sterker op IgA dan op IgG reageren. Van sommige andere receptoren weten we dat ze een complex vormen met moleculen die de signalering kunnen versterken. Als zulke receptoren dan geactiveerd raken, zorgen deze moleculen voor een versterkt signaal en dit leidt dan tot een sterkere immuun respons. In **hoofdstuk 4** is onderzocht of Fc α RI een complex vormt met zogenaamde versterkende (of amplificerende) moleculen. Het Fc α RI complex werd door middel van massa spectrometrie onderzocht en

alle moleculen in het complex werden geïdentificeerd. De Fc receptor gamma keten werd gemeten, maar van dit amplificerende molecuul was al bekend dat het een complex vormt met Fc α RI. Er werden nog 149 andere eiwitten gevonden die betrokken zijn bij verschillende functies zoals signalering, metabolisme, cel beweging en organisatie van het cel membraan. Of deze moleculen een belangrijke rol spelen in het versterken van Fc α RI signalering is nog onbekend. Een interessante bijvangst in deze studie was dat er verschillende moleculen werden gevonden waarvan bekend is dat ze belangrijk zijn voor bloedplaatjes. In een vorige studie werd al gevonden dat bloedplaatjes Fc α RI op hun oppervlakte hebben. Welke rol Fc α RI speelt op bloedplaatjes moet nog verder worden uitgezocht.

Als IgA aan Fc α RI bindt, wordt het receptor complex geïnternaliseerd. Dit betekent dat het receptor complex van buiten de cel naar binnen gaat, waarna het vervolgens kan worden gerecycled naar het membraan, of het complex kan worden afgebroken. Receptor internalisatie heeft een effect op de cel activatie, en het is daarom belangrijk om te begrijpen hoe dit precies gereguleerd is. Voor verschillende receptoren is bekend dat bepaalde sequenties belangrijk zijn voor receptor internalisatie, zoals bijvoorbeeld di-leucine sequenties. In **hoofdstuk 5** hebben wij in de staart van Fc α RI het LLAIL-motief geïdentificeerd, dat een di-leucine sequentie bevat. Mutatie van het di-leucine motief leidde tot verminderde internalisatie, wat suggereert dat het LLAIL-motief belangrijk is voor de internalisatie van Fc α RI. Het exacte internalisatie mechanisme van Fc α RI moet nog verder worden onderzocht, en ook of het LLAIL-motief invloed heeft op functies gemedieerd via Fc α RI.

Het is nuttig dat IgA immuun cellen sterk activeert wanneer er een infectie is, omdat bacteriën dan snel kunnen worden opgeruimd. Wanneer IgA echter gericht is tegen lichaamseigen moleculen tijdens auto-immuunziektes, kunnen deze sterke immuun responsen tot weefselschade leiden. Neutrofielen verwarren in dat geval een lichaamseigen molecuul met een vreemde ziekteverwekker, en vallen vervolgens dit molecuul aan. Deze IgA-gemedieerde pro-inflammatoire reacties dragen bij aan weefselschade in ziektes zoals reuma en IgA-gemedieerde blaas ziekten. In **hoofdstuk 6** wordt een andere auto-immuunziekte besproken waarbij IgA complexen worden gevonden, namelijk IgA Vasculitis (of Henoch-Schönlein Purpura). Patiënten met IgA vasculitis hebben kleine rode vlekjes op de huid, en er ontstekingen in weefsels zoals huid, darmen en nieren kunnen optreden. Omdat er bij deze patiënten in de bloedvatwand IgA complexen en neutrofielen aanwezig zijn, vermoedden wij dat interacties tussen IgA, Fc α RI en neutrofielen ook een rol speelt tijdens IgA vasculitis. Uit een andere studie is gebleken dat jonge IgA vasculitis patiënten

IgA in hun bloed hebben dat gericht is tegen endotheelcellen. Dit zijn cellen die zich in de bloedvatwand bevinden, en ervoor zorgen dat bloed niet uit het bloedvat kan lekken. Wij vermoedden daarom dat de IgA gericht tegen de bloedvatwand neutrofielen kan activeren via Fc α RI, en dat dit uiteindelijk leidt tot puntbloedingen. Dit wilden wij verifiëren voor volwassen IgA patiënten in **hoofdstuk 7**. Een deel van de patiënten had inderdaad IgA dat gericht was tegen bloedvatwand cellen. Toen neutrofielen en bloed van deze IgA patiënten bij een kweek van bloedvatwand cellen werd gevoegd, gingen de bloedvatwand cellen dood. Deze bevindingen ondersteunen onze hypothese dat IgA en Fc α RI interactie op neutrofielen bijdraagt aan weefselschade tijdens IgA vasculitis.

Omdat IgA neutrofielen zo sterk kan activeren, hebben we in **hoofdstuk 8** onderzocht of we de interactie tussen IgA en Fc α RI kunnen blokkeren. Deze blokkering kan dan neutrofiel activatie inhiberen, en zo weefselschade tijdens IgA-gemedieerde auto-immuunziektes kunnen voorkomen. Samen met chemici hebben we kleine stukjes eiwitten (genaamd peptiden) gemaakt die heel erg op IgA of Fc α RI moleculen lijken. Hierdoor raken alle bindingsplaatsen bezet, en kan IgA niet meer aan Fc α RI binden. Wanneer deze peptiden werden toegevoegd aan neutrofielen, konden neutrofielen niet meer geactiveerd raken door IgA complexen. Door deze peptiden toe te voegen aan een zalf en deze zalf op de huid aan te brengen, konden de peptiden in de huid komen. Deze peptiden zouden daarom gebruikt kunnen worden als een nieuwe therapie voor mensen met IgA-gemedieerde huidziekten.

Conclusie

In dit proefschrift heb ik IgA-Fc α RI interacties nader onderzocht. Zowel neutrofielen als monocytten raakten zeer sterk geactiveerd door IgA. Stimulatie met IgA leidde tot een sterkere signalering en resulteerde in een grotere uitscheiding van pro-inflammatoire cytokinen, chemokinen en lipiden dan stimulatie met IgG. Immune activatie is gewenst wanneer bacteriën het lichaam infiltreren, en IgA in het bloed of in het darmweefsel aan bacteriën kan binden. Als IgA echter gericht is tegen onderdelen van het eigen lichaam tijdens auto-immuunziektes, kan immune activatie tot weefselschade leiden. Naast reuma en IgA-gemedieerde blaarziekten vermoeden wij dat deze buitensporige neutrofiel activatie een rol speelt tijdens IgA vasculitis. Het blokkeren van interacties tussen IgA en Fc α RI is dan ook een veelbelovende nieuwe therapie voor verschillende IgA-gemedieerde ziektes. Daarnaast zou toediening van IgA specifiek gericht tegen tumorcellen kunnen helpen om het immuunsysteem te activeren, zodat kankercellen gedood worden. Neutrofielen kunnen dan via Fc α RI geactiveerd raken en andere immune cellen aantrekken en activeren, om zo een immune respons op gang te brengen. De bevindingen in dit proefschrift kunnen daarom bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor IgA-gemedieerde immuunziektes en kanker, waarbij neutrofiel activatie dan wel geremd of geïnduceerd wordt.