

Therapeutic approaches for the protection of neurological synapses in autoimmunity

Citation for published version (APA):

Losen, M. R. (2006). Therapeutic approaches for the protection of neurological synapses in autoimmunity. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2006

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary and general discussion

The postsynaptic membrane of the neuromuscular junction (NMJ) is a highly specialised structure that initiates muscle contraction after activation by the neurotransmitter acetylcholine. Because control of movement is vitally important, the NMJ has been subject to many independent targeted attacks in the course of evolution. Toxins against neuromuscular proteins are used both as a weapon and defence and well known examples include cobra-toxin, curare and botulinum-toxin. The similarity of symptoms caused by these toxins compared to congenital and acquired disorders of muscle movement has helped to find the cause of human diseases involving the NMJ. The first treatment for the muscle weakness of myasthenia gravis (MG) patients was the acetylcholine esterase inhibitor physostigmine, an antidote against curare (Jolly, 1895; Walker, 1934). However, treatment effects of acetylcholine esterase inhibitors are only short lasting and incomplete. Thymectomy was introduced as a treatment for MG following the observation of thymic abnormalities such as thymomas and follicular hyperplasia during autopsies of MG patients (Starr, 1912). Thymectomy proved to be beneficial for some MG patients. The discovery of Patrick and Lindstrom in 1973 that MG is caused in 85% of patients by anti-AChR antibodies attacking the NMJ led to the development of immunosuppression and plasmapheresis therapies (Patrick and Lindstrom, 1973). The latter treatments are efficacious in most MG patients, including those without anti-AChR antibodies, albeit with occasional severe side effects. Intravenous immunoglobulin (IVIg) has also successfully been used to treat MG (Fateh-Moghadam et al., 1984). Unfortunately, none of the aforementioned treatments, alone or in combination, is sufficient to treat all MG patients. Particularly the treatment of MG patients without anti-AChR antibodies is difficult because the pathogenesis is not well understood. The recent discovery of anti-MuSK antibodies in some, but not all patients without anti-AChR antibodies (Hoch et al., 2001), has shown that MG is a heterogeneous disease with different causes and varying responses to treatment. Hence, more efficient and specific treatments are required and the subtypes of MG need further characterisation. For the analysis of MG, not only the changes of the immune system, but also the response of the muscle is of particular interest. The molecular composition of the neuromuscular junction determines the susceptibility to the autoantibody attack. The interaction of the AChR with rapsyn is pivotal for the integrity of the postsynaptic membrane. Gene therapy to increase synaptic rapsyn expression facilitated enhanced resistance and recovery of the treated muscles (Chapters 2 and 3). Because also adverse effects of extrasynaptic rapsyn expression in ongoing chronic EAMG were observed, further research is needed to ensure endplate specific rapsyn expression and to establish safe and efficient gene transfer protocols for muscle therapy.

An alternative therapeutic approach that could potentially be realised with the available biotechnology on a short term is the treatment with neuroprotective recombinant human antibodies (Chapter 5). For this purpose a human IgG4 specific for the AChR was produced. Because this IgG4 can compete with pathogenic IgG1 anti-AChR autoantibodies, and does not by itself damage the postsynaptic membrane, it prevented the disease in a non-human primate model.

Both aforementioned experimental therapies are only applicable to MG with anti-AChR antibodies. MG patients with anti-MuSK antibodies have normal AChR levels (Selcen et al., 2004) and a high proportion of IgG4 autoantibodies (Hoch et al., 2001). Anti-MuSK antibodies do not affect all muscles equally, and the identification of the underlying differences between affected and resistant endplates could help to find targets for therapy. The available diagnostic method for the analysis of anti-MuSK antibodies is an important step for evaluating the efficacy of conventional therapies (Chapter 6). Moreover, it will be important to mimic the clinical effect of these antibodies in an animal model.

Chapter 1 reviews the use of experimental models for MG. Experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) can be induced in a large number of animal species by active immunisation with AChR, by passive transfer of anti-AChR antibodies, by autologous bone marrow transplantation and cyclosporin, or occur spontaneously. Depending on the model used, different immunological mechanisms are operational. In the active immunisation model, the T cell is pivotal in directing the anti-AChR antibody production towards pathogenic, that is, cross-linking and complement-fixing antibodies. Injection of anti-AChR antibodies alone suffices to induce EAMG, excluding the role of specific cell-mediated immune responses in the effector phase of the disease. Aged rats are resistant to the induction of EAMG by passive transfer and active immunisation. This resistance correlates with increased amount of rapsyn and s-laminin (laminin $\alpha 1\beta 2\gamma 1$) relative to the AChR at the neuromuscular junction. In bone marrow transplantation and cyclosporin EAMG, a dysregulation of the immune system in the absence of immunisation is capable of inducing myasthenia.

Chapter 2 describes the experimental approach to study the role of the postsynaptic protein rapsyn in the stabilisation of the AChR in EAMG. Because the AChR is clustered and anchored in the postsynaptic membrane of the neuromuscular junction by rapsyn, we hypothesised that endogenous rapsyn expression may be an important determinant of AChR loss and neuromuscular transmission failure in the human disease and that upregulation of rapsyn expression could be used therapeutically. To examine first a potential therapeutic application of rapsyn upregulation, we induced acute EAMG in young rats by passive transfer of AChR antibody, mAb 35, and used *in vivo* electroporation to over-express rapsyn unilaterally in one muscle. We looked at the compound muscle action potentials, at rapsyn and AChR expression by quantitative radioimmunoassay and immunofluorescence, and at the morphology of the NMJs, comparing between the electroporated and untreated muscles, as well as between control and EAMG rats. In control rats transfected

muscle fibres had extrasynaptic rapsyn aggregates, as well as slightly increased rapsyn and AChR concentrations at the NMJ. In EAMG rats, despite deposits of the membrane attack complex, the rapsyn-overexpressing muscles showed no decrement in the compound muscle action potentials, no loss of AChR, and the majority had normal postsynaptic folds, whereas endplates of untreated muscles showed typical AChR loss and morphological damage. These data suggest that individual differences in innate rapsyn expression could be the key factor in determining disease severity, more than the concentration of circulating anti-AChR antibodies.

In **Chapter 3** the potential of rapsyn overexpression as a therapy for ongoing chronic EAMG is investigated. Despite of the presence of high titres of anti-AChR antibodies, the rapsyn overexpression resulted in an increase of total membrane AChR levels in ongoing chronic EAMG compared with the contralateral untreated muscles. This increased AChR was localised at endplates and in extrasynaptic membrane aggregates, and bound by rat anti-AChR antibodies. Endplates in transfected fibres of EAMG muscles with a high level of rapsyn recovered from AChR loss and were comparable to endplates from healthy animals, but the average AChR level at the neuromuscular junctions was not changed compared to the contralateral untreated muscles. At the ultrastructural level, a large number of endplates in rapsyn-treated muscles had an increased damage of the postsynaptic membrane. The results suggest that extrasynaptic rapsyn might interfere with synapse recovery in EAMG and possibly MG, while endplate-specific upregulation of rapsyn expression might be therapeutically helpful.

Chapter 4 reviews the role of non-human primate studies in the development of therapies for the treatment of MG. The phylogenetic proximity between higher primate species and humans is reflected by a high degree of immunological similarity. Non-human primates are therefore important experimental models for immune-based diseases in the human population. Non-human primate disease models are becoming increasingly important for the preclinical development and efficacy evaluation of new therapies, in particular those based on biological molecules, which by their high specificity cannot be tested in rodents. For the research of MG, active immunisation with *Torpedo* AChR and passive transfer of human autoantibodies have been used. Active immunisation causes a severe disease and can lead to a high rate of respiratory failure and death. Per contra, passive immunisation leads to milder and reversible MG symptoms and is therefore more suitable for the study of antibody effects on the neuromuscular junction.

Chapter 5 describes a therapeutic approach for the protection of the AChR against a monoclonal human auto-antibody in rhesus monkeys. The human antigen binding fragment Fab 637, which is specific for the human acetylcholine receptor (AChR), protects against loss of AChRs by blocking the binding of pathogenic MG autoantibodies *in vitro*. Fab 637 was used for the production and analysis of whole human IgG1 637 and IgG4 637. These antibodies bound to the human AChR with high affinity. Immunohistochemical studies showed that the antibodies cross-reacted with the muscle AChR of rhesus mon-

keys, but not from lower primates. IgG1 637 bound and activated complement, whereas IgG4 637 did not. Both recombinant antibodies were bivalent and induced degradation of AChR of TE671 cells by antigenic modulation. The pathogenicity of the antibodies was tested in a passive transfer experimental MG model with rhesus monkeys. IgG1 637 induced muscle weakness and a decremental response of the muscle compound action potential after repetitive nerve stimulation. IgG4 637 did not have any pathogenic effect when injected, even at high concentrations tested. Thus, cross-linking of the AChR is not sufficient and complement binding is essential for induction of the disease. The induction of the disease was prevented in animals that received IgG4 637 prior to the challenge with IgG1 637. The results indicate that IgG1 anti-AChR antibodies are sufficient to induce muscle weakness and IgG4 can prevent the pathogenic effects of IgG1 autoantibodies in non human primates. These studies suggest a novel approach for the development of a treatment of patients suffering from MG.

In *Chapter 6* the effect of anti-MuSK antibodies on the clinical manifestation of seronegative patients were studied by comparing clinical features of anti-MuSK positive and anti-MuSK negative MG patients. The aim was to determine if myasthenia gravis (MG) with antibodies to MuSK is a distinct subgroup of seronegative MG. Antibodies to muscle specific tyrosine kinase (MuSK) were assayed in 55 MG patients who had no antibodies to acetylcholine receptors. MG with anti-MuSK antibodies was characterised by a striking prevalence of female patients (15 women, two men). Age at onset ranged from 22 to 52 years, with 70.6% of patients presenting at <40 years of age. The majority of patients (82.4%) had prevalent involvement of facial and bulbar muscles. One third of them did not respond well to anticholinesterase drugs. Steroid immunosuppression was effective in eight patients (44.4%). Nine patients underwent thymectomy; six of these had no thymus pathology, while three had a hyperplastic thymus. At the end of the observation period, six (35.3%) patients were in remission, five (29.4%) improved, four (23.6%) did not change, and two (11.7%) had died. Hence, MG patients with antibodies to MuSK have characteristic clinical features that are different from those of the remaining seronegative MG patients. This emphasises the predictive value of anti-MuSK antibody analysis in seronegative MG patients.

The disease mechanisms in MG with anti-MuSK antibodies are not yet understood. One of the key questions is if complement mediated damage is also involved in this disease. The high titres of IgG4 anti-MuSK autoantibodies (McConville et al., 2004) and the intact morphology of endplates found in biopsies (Selcen et al., 2004) suggest that the effector mechanism is entirely different from MG with anti-AChR antibodies. It would be of great value to isolate monoclonal anti-MuSK autoantibodies and to reproduce the patients' clinical features in an animal model.

The effect of AChR antibodies has been analysed in detail using the experimental autoimmune MG animal model. In combination with the aforementioned results, there is accumulating evidence that the changes of the postsynaptic membrane after binding of anti-AChR are the result of a dynamic interaction of the immune system with the muscle.

The muscle actively enhances AChRs turnover and removes AChRs from the cell-membrane that are cross-linked by antibodies (antigenic modulation). This effect of anti-AChR antibodies is insufficient to cause destruction of the NMJ by itself (Chapter 5) and it is not yet clear if it is an essential step of the following steps of the pathogenesis. When human IgG1 or IgG3 bind to AChRs at the NMJ, the antibodies are further cross-linked by the complement molecule C1q. Also this step does not cause the disease directly, but it mediates the activation of the classical cascade of the complement system leading to the insertion of membrane attack complexes (MAC) into the postsynaptic membrane (Tuzun et al., 2003). The membrane attack complex is a transmembrane pore that causes loss of cytoplasmic proteins and depolarisation of the membrane. It is intended for killing pathogens, but upon auto-antibody binding, MAC can also cause depolarisation of the postsynaptic membrane (Mozrzymas et al., 1993). However, nucleated cells can remove autologous complement from the membrane by vesiculation of MAC containing membranes. Because endocytosis is involved in AChR degradation (Kuncl et al., 1993), it is possible that this mechanism is responsible for the loss of postsynaptic membrane folding and AChR loss (Morgan, 1989). The degree of MAC induced AChR loss and postsynaptic membrane damage strongly depends on the anchoring of membrane proteins to the cytoskeleton and the basal lamina. The AChR is clustered in the membrane by rapsyn which, in turn, is linked to the cytoskeleton via β -dystroglycan, utrophin and F-actin (Chapter 1, Figure 1, page 21). Moreover, β -dystro-

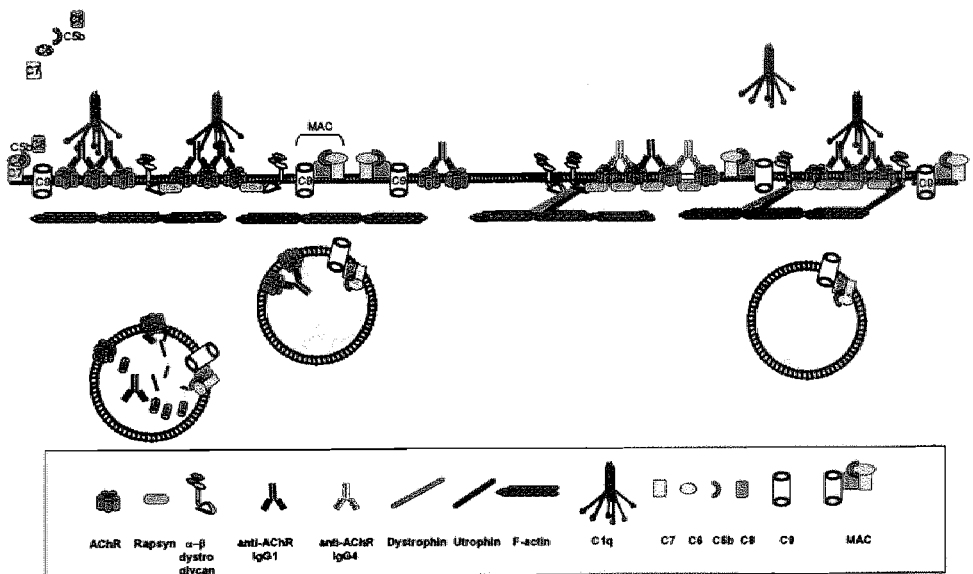


Figure 1. Hypothetical scheme of complement induced degradation of the postsynaptic membrane. Left: The AChR is weakly anchored to the cytoskeleton by rapsyn, dystroglycan and utrophin and internalised by the muscle after complement activation. Right: postsynaptic proteins are protected by IgG4 and stabilised by anchoring to the cytoskeleton. Complement is removed from the membrane, but without concomitant loss of AChR.

glycan is linked to the basal membrane via α -dystroglycan and s-laminin (Bezakova and Ruegg, 2003). Increased rapsyn expression stabilises the NMJ and increases the resistance to complement (Figure 1). Rapsyn expression determines the degree of destruction at the NMJ after antibody binding to the AChR (Chapter 2). This hypothesis can explain why some muscles are more affected than others in MG patients. Similarly, differences in rapsyn expression could influence the severity of MG and explain why anti-AChR antibody titres do not generally correlate well with clinical symptoms. Therefore, it will be interesting to study if rapsyn expression is influenced by promoter polymorphisms and how the rapsyn promoter is regulated by transcription factors such as Kaiso in different muscles and individuals.

Increased rapsyn expression does not only protect but can help to recover the AChR levels of the damaged NMJ in ongoing EAMG (Chapter 3). In the presence of autoantibodies, only synaptic expression of rapsyn increases AChR levels in the postsynaptic membrane. For this reason, it will be interesting to study the therapeutic effect of rapsyn expression under the control of the endplate specific promoter of the AChR ϵ -subunit.

Because anti-AChR antibodies do not directly damage the NMJ, but elicit a pathogenic effect via the MAC, the prevention of complement binding to the endplate could potentially treat MG. Human IgG4 does not bind complement, and AChR specific IgG4 blocks the binding of IgG1 (and likely IgG3) auto-antibodies (Chapter 5). This effect is potentially therapeutic at 3 levels: firstly by decreasing complement binding at the NMJ, secondly by protecting AChR-expressing myoid cells in the thymus and thirdly by inhibition opsonisation of AChR immune complexes by B-cells via complement receptors. All these processes could limit the immune-response to the AChR. Because antibody titres of MG patients are in the nano-molar range, small amounts of IgG4 would probably suffice for an effective competition with auto-antibodies, thus making it feasible to treat patients for longer periods. This would be an advantage over IVIg which is only effective in high concentrations and is usually only prescribed in severe MG because of the limited availability of donor blood.

References

- Bezakova G, Ruegg MA. New insights into the roles of agrin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 295–308.
- Fateh-Moghadam A, Wick M, Besinger U, Geursen RG. High-dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *Lancet* 1984; 1: 848–9.
- Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001; 7: 365–8.
- Jolly F. Über myasthenia gravis pseudoparalytica. *Berl. Klin. Wochenschr* 1895; 32: 1–7.
- Kuncel RW, Drachman DB, Adams R, Lehar M. 3-Deazaadenosine: a therapeutic strategy for myasthenia gravis by decreasing the endocytosis of acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 582–9.
- McConville J, Farrugia ME, Beeson D, Kishore U, Metcalfe R, Newsom-Davis J, et al. Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2004; 55: 580–4.

- Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J* 1989; 264: 1–14.
- Mozzrymas JW, Lorenzon P, Riviera AP, Tedesco F, Ruzzier F. An electrophysiological study of the effects of myasthenia gravis sera and complement on rat isolated muscle fibres. *J Neuroimmunol* 1993; 45: 155–62.
- Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 1973; 180: 871–2.
- Selcen D, Fukuda T, Shen XM, Engel AG. Are MuSK antibodies the primary cause of myasthenic symptoms? *Neurology* 2004; 62: 1945–50.
- Starr MA. Myasthenia gravis. *J. Nerv. Men. Dis.* 1912; 39: 721–731.
- Tuzun E, Scott BG, Goluszko E, Higgs S, Christadoss P. Genetic evidence for involvement of classical complement pathway in induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol* 2003; 171: 3847–54.
- Walker MB. Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. *Lancet* 1934; 1: 1200–1.



Samenvatting en algemene discussie

Het postsynaptische membraan van de neuromusculaire junctie (NMJ) is een zeer gespecialiseerde structuur die de betreffende spier laat samentrekken na activering door de neurotransmitter acetylcholine. Aangezien bewegingscontrole van vitaal belang is, heeft de NMJ gedurende de evolutie blootgestaan aan diverse gerichte aanvallen. Toxinen tegen neuromusculaire eiwitten zijn zowel als wapen als ter verdediging ingezet. Bekende voorbeelden zijn cobragif, curare en botulinumgif. De overeenkomst tussen de symptomen die deze toxinen teweegbrengen en congenitale of verworven spierziekten heeft ertoe bijgedragen dat de oorzaak is ontdekt van ziekten bij de mens waarbij de NMJ is betrokken. De acetylcholinesteraseremmer fysostigmine, een antidotum tegen curare, was het eerste medicijn dat werd gebruikt voor de behandeling van spierzwakte bij patiënten met myasthenia gravis (MG) (Jolly, 1895; Walker, 1934). Het behandelingseffect van acetylcholinesteraseremmers is echter slechts tijdelijk en onvolledig. Thymectomie werd als behandeling van MG toegepast nadat bij obductie van overleden MG-patiënten afwijkingen aan de thymus, zoals thymomas en folliculaire hyperplasie, waren vastgesteld (Starr, 1912). Bij sommige MG-patiënten bleek thymectomie een gunstig effect te hebben. In 1973 ontdekten Patrick en Lindstrom dat MG bij 85% van de patiënten wordt veroorzaakt door antistoffen tegen acetylcholinereceptoren (AChR) die de NMJ aanvallen. Dit heeft geleid tot de ontwikkeling van behandelingen met immunosuppressie en plasmaferese (Patrick and Lindstrom, 1973). Beide behandelingen zijn bij de meeste MG-patiënten effectief, ook bij patiënten zonder antistoffen tegen AChR. In sommige gevallen kunnen echter ernstige bijwerkingen optreden. Ook behandeling met intraveneuze immunoglobuline (IVIg) is met succes toegepast bij MG-patiënten (Fateh-Moghadam et al., 1984). Maar ook in combinatie is geen van deze behandelingen werkzaam bij alle MG-patiënten. Vooral MG-patiënten zonder antistoffen tegen AChR blijven moeilijk te behandelen, omdat bij hen de pathogenese niet geheel duidelijk is. De recente ontdekking van antistoffen tegen MuSK, die bij sommige, maar niet alle patiënten zonder antistoffen tegen AChR (Hoch et al., 2001) worden aangetroffen, heeft aangetoond dat MG een heterogene aandoening is met diverse oorzaken en een wisselende respons op behandeling. Een efficiëntere en meer specifieke behandeling is daarom noodzakelijk en de MG subtypen dienen verder te worden gespecificeerd. Om MG verder te onderzoeken zijn niet alleen de veranderingen van het immuunsysteem maar is ook de spierreactie van groot belang. De moleculaire samenstelling van de NMJ bepaalt de gevoeligheid voor de aanval van autoantistoffen. De interactie van AChR met rapsyne is bepalend voor de integriteit van het postsynaptische membraan. Genetherapie, waarmee de synaptische rapsyne-expressie wordt verhoogd, leidt tot een grotere resistentie en beter herstel van de behandelde spieren (hoofdstuk 2 en 3) in proefdieren met experimentele auto-immune myasthenia gravis (EAMG). Aangezien bij actieve, chronische

EAMG ook een verergering van de ziekte optrad door extrasynaptische rapsyne-expressie, is nader onderzoek noodzakelijk om eindplaatspecifieke rapsyne-expressie te garanderen en om veilige en efficiënte gentransferprotocollen voor spierbehandeling vast te stellen.

Een alternatieve therapeutische benadering is behandeling met neuroprotectieve humane recombinant antistoffen (hoofdstuk 5). Een dergelijke behandeling is met de huidige biotechnologische mogelijkheden in principe op korte termijn te realiseren. Hiervoor is een AChR-specifiek humaan IgG4 geproduceerd. Dit IgG4 kan met pathogene IgG1 anti-AChR-autoantistoffen concurreren en beschadigt het postsynaptische membraan niet, waardoor het myasthenie in een niet-humaan primatenmodel kan voorkomen.

Beide bovengenoemde experimentele behandelingen kunnen alleen worden toegepast bij MG-patiënten met antistoffen tegen AChR. Patiënten met antistoffen tegen MuSK hebben een normaal AChR-gehalte (Selcen et al., 2004) en een hoog IgG4-autoantistoffengehalte (Hoch et al., 2001). De antistoffen tegen MuSK hebben niet op alle spieren hetzelfde schadelijke effect. Het bepalen van de onderliggende verschillen tussen aangetaste en resistente eindplaten zou daarom kunnen helpen om targets voor behandeling te vinden. De beschikbare diagnostische methode om antistoffen tegen MuSK te analyseren is belangrijk om de werkzaamheid van conventionele behandeling te kunnen evalueren (hoofdstuk 6). Bovendien is het van belang het klinische effect van deze antistoffen te kunnen nabootsen in een diermodel.

In **hoofdstuk 1** wordt het gebruik van experimentele modellen voor MG besproken. EAMG kan bij een groot aantal diersoorten worden opgewekt door actieve AChR-immunisatie, door passieve transfer van antistoffen tegen AChR, door autologe beenmergtransplantatie en cyclosporine of kan spontaan optreden. Afhankelijk van het gebruikte model treden verschillende immunologische mechanismen in werking. Bij een actief immunisatiemodel spelen de T-cellen een cruciale rol bij de initiatie van de productie van pathogene antistoffen tegen AChR, die complement fixeren en kunnen crosslinken. Het inspuiten van antistoffen tegen AChR is al voldoende om EAMG op te wekken. Hierbij wordt dan de rol van een specifieke, door de cel gemedieerde immuunreactie in de effectorfase van de ziekte omzeild. Oudere ratten worden door passieve overdracht en actieve immunisatie resistent tegen EAMG. Deze resistentie correleert met een verhoogd gehalte rapsyne en s-laminine (laminine $\alpha 1\beta 2\gamma 1$) in verhouding tot de AChR ter hoogte van de neuromusculaire junctie. Bij de overdracht van EAMG via beenmergtransplantatie en cyclosporine raakt het immuunsysteem ontregeld door het ontbreken van immunisatie en kan myasthenia worden opgewekt.

In **hoofdstuk 2** wordt de experimentele onderzoeksbenadering beschreven voor de rol die het postsynaptische eiwit rapsyne speelt bij de stabilisering van de AChR. Rapsyne zorgt voor clustering en verankering van AChR in het postsynaptische membraan van de NMJ. Daarom veronderstellen wij dat endogene rapsyne-expressie mogelijk een belangrijke bepalende factor is voor AChR-verlies en storing van neuromusculaire signaaloverdracht bij humane MG en dat verhoging van rapsyne-expressie als behandeling kan worden toegepast. Om eerst de mogelijke therapeutische toepassingen van rapsyne te onderzoeken, heb-

ben we acute EAMG in jonge ratten opgewekt door middel van passieve overdracht van een AChR-antistof, mAb 35, en hebben we met *in vivo* elektroporatie unilaterale rapsyne-overexpressie in één spier bewerkstelligd. Vervolgens is met behulp van kwantitatieve radioimmunoassay en immunoflorescentie gekeken naar de samengestelde spieractiepotaal bij rapsyne- en AChR-expressie en naar de morfologie van de NMJ's, waarbij spieren met en zonder elektroporatie in EAMG-ratten en controle ratten met elkaar werden vergeleken. In de getransfecteerde spiervezels van controle ratten hebben we extrasynaptische rapsyne-aggregaten aangetroffen en licht verhoogde rapsyne- en AChR-gehalten ter hoogte van de NMJ. Bij EAMG-ratten vertoonden de spieren met rapsyne-overexpressie, ondanks afzettingen van geactiveerd complement, geen afname van het spieractiepotaal, geen verlies van AChR en had de meerderheid normale postsynaptische plooien, terwijl bij de eindplaten van onbehandelde spieren typisch AChR-verlies en morfologische beschadiging optrad. Deze gegevens doen vermoeden dat de individuele verschillen in aangeboren rapsyne-expressie de bepalende factor kunnen zijn voor de ernst van de ziekte, meer dan de concentratie circulerende antistoffen tegen AChR.

In **hoofdstuk 3** wordt de mogelijkheid onderzocht om actieve, chronische EAMG te behandelen met rapsyne-overexpressie. Ondanks de aanwezigheid van hoge titers van antistoffen tegen AChR leidde rapsyne-overexpressie bij actieve, chronische EAMG tot een toename van de totale AChR-gehalten in het membraan vergeleken met de contralaterale, onbehandelde spieren. Deze toename was te zien bij eindplaten en in aggregaten van het extrasynaptische membraan. Een grote hoeveelheid antistoffen tegen AChR was aan de AChR in de celmembraan gebonden. De eindplaten in getransfecteerde EAMG-spiervezels met een hoog rapsyne gehalte herstelden van het AChR-verlies en waren te vergelijken met de eindplaten van gezonde dieren. Het gemiddelde AChR-gehalte ter hoogte van de neuromusculaire juncties was echter niet veranderd vergeleken met contralaterale, onbehandelde spieren. Op ultrastructureel niveau bleek het postsynaptische membraan bij een groot aantal eindplaten in met rapsyne behandelde spieren grotere schade te hebben opgelopen. Uit deze resultaten blijkt dat extrasynaptische rapsyne het herstel van de synaps bij EAMG en mogelijk MG kan belemmeren, terwijl eindplaatspecifieke verhoging van rapsyne-expressie als behandeling kan dienen.

In **hoofdstuk 4** wordt ingegaan op de rol van studies met niet-humane primaten om therapieën voor MG te ontwikkelen. De filogenetische verwantschap tussen hogere primate-soorten en de mens komt tot uitdrukking in een sterke mate van overeenkomst tussen de immunologie van beide soorten. Niet-humane primaten vormen daarom een belangrijk experimenteel model voor immuunziekten bij de mens. Ziektemodellen met niet-humane primaten zijn van belang voor de preklinische ontwikkeling en evaluatie van de werkzaamheid van nieuwe therapieën, vooral behandelingen die op biologische moleculen zijn gebaseerd en vanwege de specificiteit niet bij knaagdieren kunnen worden getest. Binnen het MG-onderzoek is actieve immunisatie met *Torpedo* AChR en passieve overdracht van humane antistoffen toegepast. Actieve immunisatie leidt tot ernstige ziekte en in sommige dieren tot respiratoir falen en overlijden. Passieve immunisatie veroorzaakt daarentegen

lichtere en reversibele MG-symptomen en is daarom geschikter om het effect van antistoffen op de NMJ te onderzoeken.

Hoofdstuk 5 is een beschrijving van de experimentele therapie waarbij de bescherming van AChR tegen monoklonale humane autoantistoffen in resusapen wordt getest. Het humane antigenbindende fragment Fab 637, specifiek voor de menselijke acetylcholinereceptor (AChR), beschermt tegen AChR-verlies door de binding tussen pathogene myasthenia gravis-autoantistoffen *in vitro* te blokkeren. Fab 637 werd gebruikt om een volledig humaan IgG1 637 en IgG4 637 te produceren en te analyseren. Deze antistoffen binden met hoge affiniteit aan humane AChR. Uit immunohistochemisch onderzoek blijkt dat de antistoffen een kruisreactie aangaan met AChR in de spieren van resusapen, maar niet bij lagere primaten. IgG1 637 bindt en activeert complement, terwijl IgG4 637 dat niet doet. Beide recombinant antistoffen waren bivalent en wekten AChR-degradatie van TE671-cellen op door antigene modulatie. De pathogeniciteit van de antistoffen werd in een model met resusapen getest waarin EAMG passief werd overgebracht. Door IgG1 637 ontstond spierzwakte en een verlaagde respons van de samengestelde spieractiepotaal na herhaalde zenuwstimulatie. Bij inspuiting heeft IgG4 637 geen pathogeen effect, zelfs niet bij de hoge concentraties die in het onderzoek werden gebruikt. Crosslinking van de AChR is dus niet voldoende, maar complementbinding is essentieel om de ziekte te kunnen opwekken.

Toch werd opwekking van de ziekte volledig voorkomen bij dieren die IgG4 637 kregen toegediend voorafgaand aan de challenge met IgG1 637. Deze resultaten tonen aan dat IgG1 antistoffen tegen AChR voldoende zijn om spierzwakte op te wekken en dat IgG4 de pathogene effecten van IgG1-autoantistoffen bij niet-humane primaten kan voorkomen. Deze studies geven bovendien een nieuwe benadering aan om behandelingen van MG-patiënten te ontwikkelen.

In **hoofdstuk 6** wordt het effect van antistoffen tegen MuSK op de klinische manifestatie bij seronegatieve patiënten bestudeerd. Hierbij worden de klinische kenmerken van anti-MuSK-positieve en anti-MuSK-negatieve MG-patiënten vergeleken. Het doel hiervan was vast te stellen of myasthenia gravis (MG) met antistoffen tegen MuSK een afzonderlijke subgroep van seronegatieve MG vormt. Antistoffen tegen spierspecifieke tyrosine kinase (MuSK) werden bij 55 MG-patiënten onderzocht die geen antistoffen hadden tegen acetylcholinereceptoren. MG met antistoffen tegen MuSK kwam opvallend vaak voor bij vrouwen (15 vrouwen, twee mannen). De leeftijd bij het ontstaan van de ziekte liep uiteen van 20 tot 52 jaar, waarbij 70,6% van de patiënten jonger was dan 40 jaar. Bij de meeste patiënten (82,4%) waren vooral de gezichtsspieren en bulbair spieren aangedaan. Een derde van hen reageerde niet goed op anticholinesterase-middelen. Bij acht patiënten (44,4%) bleek steroïde immunosuppressie effectief. Negen patiënten ondergingen thymectomie, zes van hen hadden geen afwijkende thymus, drie vertoonden hyperplasie van de thymus. Aan het einde van de observatieperiode waren zes patiënten (35,3%) in remissie, vertoonden vijf patiënten (29,4%) een verbetering, vier (23,6%) geen verandering en waren twee patiënten (11,7%) overleden. Hieruit blijkt dat MG-patiënten met antistoffen tegen MuSK bepaalde

klinische kenmerken hebben die verschillen van die van andere seronegatieve MG-patiënten. Dit benadrukt de voorspellende waarde van tests op antistoffen tegen MuSK bij seronegatieve MG-patiënten.

Het ziektemechanisme van MG met antistoffen tegen MuSK wordt nog niet geheel begrepen. Een van de hoofdvragen is of beschadiging door complement ook een rol speelt bij deze vorm van MG. De hoge titers van IgG4 autoantistoffen tegen MuSK (McConville et al., 2004) en de morfologisch intacte eindplaten in biopten (Selcen et al., 2004) doen vermoeden dat het effectormechanisme totaal verschilt van dat bij MG met antistoffen tegen AChR. Het zou zeer waardevol zijn om de monoklonale autoantistoffen tegen MuSK te isoleren en om de klinische kenmerken van patiënten in een diermodel te reproduceren.

Het effect van AChR-antistoffen is met behulp van het experimentele diermodel voor MG in detail onderzocht. In combinatie met de hiervoor genoemde resultaten levert dit een steeds sterker bewijs dat de veranderingen van het postsynaptische membraan na anti-AChR-binding het gevolg zijn van een dynamische interactie tussen het immuunsysteem en de spier. De spier zorgt actief voor verhoging van de omzetting van AChR en verwijdering van AChR uit het celmembraan dat door antilichamen is gebonden (antigene modulatie).

Dit effect van antistoffen tegen AChR is op zich onvoldoende om de NMJ te beschadigen (hoofdstuk 5) en het is nog niet duidelijk of het een essentiële stap is in de pathogenese. Wanneer humaan IgG1 of IgG3 bindt aan AChR in de NMJ vindt verdere crosslinking plaats van de antistoffen door complementmolecuul C1q. Deze stap leidt niet direct tot de ziekte maar activeert de klassieke cascade van het complementsysteem, waardoor membrane attack complexes (MAC) in het postsynaptische membraan gevormd worden (Tuzun et al., 2003). Het MAC vormt een porie in het membraan waardoor verlies van cytoplasmatische eiwitten en depolarisatie van het membraan optreedt. Het MAC is bedoeld om pathogenen te doden, maar door binding aan autoantistoffen kan het ook depolarisatie van het postsynaptische membraan veroorzaken (Mozrzymas et al., 1993).

Toch kunnen celkern bezittende cellen autoloog complement uit een membraan verwijderen door vesiculatie van MAC-bevattende membranen. Omdat er bij AChR-degradatie sprake is van endocytose (Kuncl et al., 1993), is het mogelijk dat dit mechanisme verantwoordelijk is voor het verlies van postsynaptische plooiing en AChR-verlies (Morgan, 1989). De mate van AChR-verlies en beschadiging van het postsynaptische membraan door MAC hangt sterk af van de verankering van de membraaneiwitten aan het cytoskelet en de basale lamina. AChR wordt in het membraan geclusterd door rapsyne, dat weer via β -dystroglycan, utrofine en F-actine gekoppeld is aan het cytoskelet (hoofdstuk 1, figuur 1, pagina 21). Bovendien is β -dystroglycan via α -dystroglycan en s-laminine aan het basale membraan gekoppeld (Bezakova and Ruegg, 2003). Door verhoogde rapsyne-expressie wordt de NMJ gestabiliseerd en de resistentie tegen complement vergroot (general discussion, figuur 1, pagina 111). Rapsyne-expressie bepaalt de mate van beschadiging aan de NMJ nadat de antistoffen aan AChR binden (hoofdstuk 2). Deze hypothese kan een verklaring zijn voor het feit dat sommige spieren bij MG-patiënten sterker worden aangetast

dan andere. Zo kunnen de verschillen in rapsyne-expressie ook de ernst van de ziekte bij MG-patiënten beïnvloeden en verklaren waarom er geen goede correlatie is tussen de titers van antistoffen tegen AChR en de klinische symptomen. Het zou daarom interessant zijn te onderzoeken of rapsyne-expressie door promotor polymorfismen wordt beïnvloed en hoe de promotor van rapsyne in verschillende spieren en individuen wordt gereguleerd door transcriptiefactoren als Kaiso.

Verhoogde rapsyne-expressie kan daarnaast ook bijdragen aan het herstel van het AChR-gehalte van een beschadigde NMJ bij actieve EAMG (hoofdstuk 3). Bij aanwezigheid van autoantistoffen wordt alleen door synaptische rapsyne-expressie de AChR-gehalten in het postsynaptische membraan verhoogd. Het zou daarom interessant zijn onderzoek te verrichten naar het therapeutische effect van rapsyne-expressie onder controle van de eindplaat-specifieke promotor van de AChR- ϵ -subunit.

Aangezien antistoffen tegen AChR de NMJ niet direct beschadigen maar een pathogeen effect opwekken via de MAC, kan preventie van complementbinding aan de eindplaat mogelijk een behandeling zijn bij MG. Humaan IgG4 bindt geen complement en AChR-specifieke IgG4 verhindert de binding van IgG1- (en waarschijnlijk ook van IgG3-) antistoffen (hoofdstuk 5). Dit effect kan op drie niveaus een therapeutische werking hebben: allereerst door de complementbinding ter hoogte van de NMJ te verminderen, ten tweede door de AChR-expressie van myoïde cellen in de thymus te beschermen en ten derde door de opsonisatie van AChR-immuuncomplexen door B-cellen via complementreceptoren te remmen. Al deze processen kunnen de immunreactie op AChR beperken. Omdat de antistoftiters bij MG-patiënten in het nanomolaire bereik liggen, zullen kleine hoeveelheden IgG4 waarschijnlijk voldoende zijn voor een effectieve competitie met autoantistoffen. Hierdoor is het mogelijk om patiënten gedurende langere tijd te behandelen. Dit zou een voordeel kunnen zijn ten opzichte van IVIg, dat alleen in hoge concentratie effectief is en meestal slechts bij ernstige MG wordt voorgeschreven in verband met het beperkte aanbod van donorbloed.

Referenties

- Bezakova G, Ruegg MA. New insights into the roles of agrin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 295-308.
- Fateh-Moghadam A, Wick M, Besinger U, Geursen RG. High-dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *Lancet* 1984; 1: 848-9.
- Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001; 7: 365-8.
- Jolly F. Über myasthenia gravis pseudoparalytica. *Berl. Klin. Wochenschr* 1895; 32: 1-7.
- Kuncl RW, Drachman DB, Adams R, Lehar M. 3-Deazaadenosine: a therapeutic strategy for myasthenia gravis by decreasing the endocytosis of acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 582-9.
- Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J* 1989; 264: 1-14.

- Mozzrymas JW, Lorenzon P, Riviera AP, Tedesco F, Ruzzier F. An electrophysiological study of the effects of myasthenia gravis sera and complement on rat isolated muscle fibres. *J Neuroimmunol* 1993; 45: 155-62.
- Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 1973; 180: 871-2.
- Selcen D, Fukuda T, Shen XM, Engel AG. Are MuSK antibodies the primary cause of myasthenic symptoms? *Neurology* 2004; 62: 1945-50.
- Tuzun E, Scott BG, Goluszko E, Higgs S, Christadoss P. Genetic evidence for involvement of classical complement pathway in induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol* 2003; 171: 3847-54.
- Walker MB. Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. *Lancet* 1934; 1: 1200-1.

